Investigating the Effect of Various Extraction Methods on the Antioxidant Properties of Green Tea Extract

Pages 87-103

Reza Esmaeilzadeh Kenari[1] and Razie Razavi[2]

1 &2) Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Mazandaran, Iran.

*Corresponding author**: razavirazie@yahoo.com**

Received date: 2023.09.20 **Accepted date: 2023.12.12**

Abstract

Nowadays, there is an increasing focus on natural antioxidant compounds as alternatives to synthetic types. Green tea is one of the most well-known medicinal plants. In this research, green tea leaf extract was obtained using maceration, ultrasound, subcritical water, supercritical fluid, and microwave extraction methods. The extraction efficiency, total phenolic content, flavonoids, antioxidant activity and oxidative stability of the extracts were measured. The results showed that the highest extraction efficiency (23.18 %), total phenolic content (28.57 mg GA/g DM) and flavonoid content (5.21 mg QE/g DM) were obtained from the extract using microwave > supercritical > ultrasound > subcritical water methods. As the concentration of the extract increased the antioxidant activity increased in all methods studied, due to the higher amounts of bioactive compounds. The findings suggest that the microwave method is recommended for extracting bioactive compounds from green tea leaves. The obtained extract can be used as a natural antioxidant in the food industry.

Keywords: Extraction, Antioxidant, Bioactive compounds and Green tea.

بررسی تاثیر روش‌های مختلف استخراج بر خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره چای سبز

شماره صفحات
۱۰۳-۷۹

رضا اسماعیل زاده کناری[۱] و راضیه رضوی[۲*]

۱و ۲) گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

*نویسنده مسئول: **razavirazie@yahoo.com**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۱

چکیده

امروزه توجه به ترکیبات آنتی اکسیدانی طبیعی به عنوان جایگزین برای انواع سنتزی افزایش یافته است. چای سبز یکی از شناخته شده ترین گیاهان دارویی است. در این پژوهش عصاره برگ گیاه چای سبز با استفاده از روش‌های ماسراسیون، اولتراسوند، آب زیر بحرانی، سیال فوق بحرانی و ماکروویو استخراج گردید. بازده استخراج، میزان ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، خاصیت آنتی اکسیدانی و پایداری اکسایشی عصاره‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد بیشترین بازده استخراج (۲۳/۱۸ ٪)، میزان ترکیبات فنولی (۲۸/۵۷ mg GA/g DM) و فلاونوئیدی (۵/۲۱ mg QE/g DM) به ترتیب مربوط به عصاره استخراج شده با روش به ترتیب با استفاده از روش‌های مایکروویو> فوق بحرانی> اولتراسوند> آب زیر بحرانی بود. با افزایش غلظت عصاره به دلیل افزایش میزان ترکیبات زیست فعال، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره در تمام روش‌های مورد بررسی افزایش یافت. نتایج این تحقیق استفاده از روش ماکروویو را برای استخراج ترکیبات زیست فعال از برگ چای سبز پیشنهاد می‌نماید. عصاره استخراجی می‌تواند به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی در صنعت غذا مورد استفاده قرار بگیرد.

واژه‌های کلیدی: استخراج، آنتی اکسیدان، ترکیبات زیست فعال و چای سبز.

مقدمه

چای با مصرف روزانه بیش از ۳ میلیارد فنجان، محبوب ترین نوشیدنی روزانه در سراسر جهان است (Zaman et al., 2023). مزایای سلامتی آن نیز توسط مطالعات پیش بالینی و اپیدمیولوژیک تایید شده است. چای یکی از منابع اصلی دریافت کافئین از طریق یک رژیم غذایی است. چندین گونه چای مانند چای سیاه، سبز و سفید از برگهای گیاه *Camellia sinensis* تهیه می‌شود که در حداقل ۳۰ کشور در سراسر جهان رشد می‌کند (Banerjee & Chatterjee, 2015; Li *et al*., 2021). زادگاه چای چین است (Fujioka *et al*., 2022). از میان کل چای تولیدی در دنیا، ۷۸ درصد چای سیاه است که عمدتاً در کشورهای غربی و برخی کشورهای آسیایی مصرف می‌شود. ۲۰ درصد چای سبز است که در آسیا، آمریکای شمالی و کشورهای خاورمیانه مصرف می‌شود و ۲٪ چای اولانگ است که عمدتا در جنوب چین تولید می‌شود (Butt *et al*., 2015). پرتغالی‌ها به نمایندگی از هلندی‌ها این چای را برای اولین بار در سال ۱۶۱۰ به اروپا آوردند. چای قرمز یکی دیگر از گونه‌های چای است که در آفریقای جنوبی کشت می‌شود. این نوع چای حاوی آسفالیتین است که در مقایسه با سایر انواع چای، ماده منحصر به فردی است (Wilkinson *et al*., 2024). این جوشانده محبوب به دلیل کاربردهای متعدد و فوایدی که برای سلامتی انسان دارد، موضوع مطالعه دانشمندان متعددی است. مطالعات تحقیقاتی متعدد ثابت کرده اند که این عصاره‌ها دارای خواص ضد قارچی، ضد ویروسی، آنتی اکسیدانی، ضد جهش زایی و ضد التهابی هستند (Zhang *et al*., 2014). این مزایا از برخی ترکیبات مختلف موجود مانند پلی فنول‌ها، آلکالوئیدها، ویتامین‌ها، تانن‌ها و فلاونوئیدها ناشی می‌شود (Sereshti *et al*., 2014). نوع چای از تیمار برگ‌های *Camelia sinensis* که در سه سال اول زندگی گیاه جمع آوری می‌شوند، تعیین می‌شود. برای تولید چای سیاه برگها از دو تا سه روز اکسیده می‌شوند که برخلاف چای سبز که برگها اکسید نمی‌شوند. به همین دلیل، چای سبز حاوی محتوای بالایی از پلی فنول‌ها است (Keneth Iceland, 2021). در مراحل اولیه تولید چای سیاه، برگ‌ها حاوی کاتچین و آنزیم‌های اکسیداسیون هستند که در نقاط مختلف برگ یافت می‌شوند. طعم و رنگ مشخص چای سیاه بر اساس تولید تئافلاوین و تئاروبیگین است (Fernandes *et al*., 2021). تولید چای سفید با چای سبز به دلیل زمان متفاوتی که در آن برگ‌های کاملیا سیننسیس برداشت می‌شود متفاوت است. در مورد چای سفید، جمع آوری برگ‌ها در مراحل اولیه رشد گیاه انجام می‌شود. این برخلاف چای سبز است که شامل جمع آوری برگ‌ها می‌شود تا در مراحل بعدی رشد گیاه انجام شود (Lisko *et al*., 2017). در مورد چای اولانگ، برگ‌ها اکسید می‌شوند اما نه به همان درجه اکسیداسیونی که در رابطه با برگ‌های چای سیاه (که نیمه تخمیر شده‌اند) رخ می‌دهد (Ng *et al*., 2018). فرآیندهای استخراج سنتی به میزان بسیار زیادی به استفاده از حلال‌های آلی، زمان‌های طولانی فرآوری، دماهای بالا و صرف انرژی زیاد متکی هستند که ممکن است بر سلامت انسان و محیط زیست تأثیر منفی بگذارد. برای غلبه بر این محدودیت‌ها، فرآیندهای نوآورانه پیشنهاد شده و به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است

(Razavi & Kenari, 2021). نویدبخش ترین تکنیک‌های استخراج نوآورانه عبارتند از استخراج با سیال فوق بحرانی (SFE[1])، استخراج به کمک آب زیر بحرانی (SCW[2])، استخراج به کمک مایکروویو (MAE[3])، استخراج با کمک اولتراسوند (UAE[4])، همگن سازی با فشار بالا (HPH[5])، میدان‌های الکتریکی پالسی (PEF[6])، تخلیه الکتریکی ولتاژ بالا (HVED[7]) (Carpentieri *et al.*, 2021). امروزه آگاهی مصرف کنندگان نسبت به اثرات مضر استفاده از ترکیبات نگهدارنده‌های سنتزی افزایش یافته است. مصرف کنندگان و تولید کنندگان تمایل به استفاده از ترکیبات نگهدارنده طبیعی دارند. نتایج بررسی در مطالعاتی که تاکنون انجام شده است نشان می‌دهد که عصاره چای سبز به دلیل دارا بودن ترکیبات زیست فعال دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قوی در محصولاتی نظیر گوشت و فرآورده‌های گوشتی، روغن‌های گیاهی، همبرگر و ماهی استفاده شده است. همچنین عصاره چای سبز با موفقیت در پوشش‌ها و فیلم‌های خوراکی مختلف استفاده شده است (Karaosmanoglu & Kilmartin, 2015). امروزه گیاه چای سبز به دلیل نقشی که در جلوگیری از بیماری‌های قلبی و سرطان بازی می‌کند توجه افراد بسیاری را به خود جلب کرده است و این خاصیت مرتبط با ترکیبات پلی فنولی چای خصوصا فلاوانول است (Fernandes *et al.*, 2021). از آنجاییکه روش استخراج تاثیر زیادی بر خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره دارد و بایستی به درستی انتخاب شود، تعیین روش بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره نیز مهم است. روش‌های ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی متفاوت هستند و لازم است برای صحت اطلاعات از چند روش به طور همزمان استفاده شود. اثرات آنتی اکسیدانی گیاهان دارویی تنها مرتبط با تغییر در عطر و طعم ماده غذایی نیست بلکه از تغییرات بافتی که در ماده غذایی رخ می‌دهد و همچنین جلوگیری از سرطان، تب و تصلب شراین از دیگر مزایای استفاده از گیاهان دارویی است. با توجه به اینکه رادیکال‌های سنتزی DPPH نمی‌توانند با سوبسترای اکسیژن بیولوژیکی ترکیب شوند. بنابراین اطلاعات دقیق و مشخصی از فعالیت مهار رادیکال ها در عصاره نمی‌دهند. به این علت است که برای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره از روش بتا کاروتن/ امولسیون اسید لینولئیک استفاده می‌شود (Esmaeilzadeh Kenari *et al.*, 2014).

در روش بیرنگ کردن بتاکاروتن:لینولئیک اسید فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیب مورد نظر، با میزان مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید مورد سنجش قرار می‌گیرد. در سیستم مدل بتاکاروتن لینولئیک اسید، بتاکاروتن در غیاب آنتی اکسیدان سریعاً بی رنگ می‌شود که به دلیل اکسیداسیون بتاکاروتن و لینولئیک اسید و تشکیل رادیکال آزاد م باشد. رادیکال آزاد لینولئیک اسید پس از جدا شدن اتم هیدروژن توسط مولکول‌های غیر اشباع بتاکاروتن ایجاد می‌گردد. سپس خود بتاکاروتن اکسید و تا حدودی تجزیه گردیده و رنگ نارنجی آن از بین می‌رود که این رویداد توسط اسپکترومتری قابل ارزیابی می‌باشد (Xie *et al.*, 2014).

[1] Supercritical Fluid
[2] Subcritical Water
[3] Microwave
[4] Ultrasonic Assisted
[5] High Pressure Homogenizer
[6] Pulsed Electric Field
7 High Voltage Electrical Discharges

روش احیا آهن برای بررسی توانایی عصاره‌ها در احیا آهن سه ظرفیتی به دو ظرفیتی به کار می‌رود. در این روش احیا کمپلکس-های فری سیانید توسط عوامل احیا کننده مثل آنتی‌اکسیدان‌ها انجام می‌شود که بسته به قدرت احیا کنندگی عصاره‌های مورد بررسی عصاره‌ها از رنگ زرد به درجات مختلفی از رنگ‌های سبز و آبی تغییر رنگ می‌دهند (Masek *et al*., 2017).

با توجه به اینکه خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های گیاهی به نوع و مقدار ترکیبات زیست فعال آنها بستگی دارد، لذا روش استخراج تاثیر به سزایی در کارایی عصاره‌ها دارد. در این پژوهش عصاره برگ چای سبز با استفاده از روش‌های نوین استخراج و خاصیت آنتی اکسیدانی آن با آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ[8] مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها

آزمایشات مربوط به پژوهش حاضر در آزمایشگاه صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شده است. چای سبز از یک مزرعه تحت نظارت سازمان جهاد کشاورزی در شهرستان تنکابن استان مازندران تهیه شد. برگ سبز چای در محیط خشک و تاریک به دور از نور خورشید و در جریان هوا خشک شد و با آسیاب (پارس خزر-ایران) به‌صورت پودر درآمد و با الک مش ۸۰ (۸۰۰ میکرون) الک شد و تا زمان استفاده در کیسه پلی اتیلنی دو لایه تیره در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Razavi & Kenari, 2021). روغن سویای بدون آنتی اکسیدان از شرکت کشت و صنعت شمال تهیه شد. مواد شیمیایی و حلال‌ها دارای درجه تجزیه‌ای بودند و از شرکت مجللی تهیه شدند.

روش‌ها

استخراج عصاره

روش ماسراسیون

۲۰ گرم پودر برگ چای سبز پس از توزین در یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد. سپس به نسبت ۱ به ۱۰ (۲۰ گرم پودر برگ چای سبز و ۲۰۰ میلی لیتر حلال) با حلال اتانول:آب (۵۰:۵۰) مخلوط شد. مخلوط به مدت ۴۸ ساعت در شیکر (FanAzmaGostar-Iran) با سرعت ۱۶۰۰ دور در دقیقه ترکیب شد تا عصاره استخراج شود. عصاره سپس به کمک کاغذ صافی واتمن شماره ۱، قیف بوخنر و پمپ خلأ صاف شد. حلال اضافی به وسیله روتاری اواپراتور (RV10- IKA-Germany) در ۴۵ درجه سانتیگراد تبخیر و تا زمان استفاده در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتیگراد نگهداری شد (Esmaeilzadeh Kenari *et al*., 2014).

روش استخراج با کمک سیال فوق بحرانی

عصاره‌گیری توسط دی اکسید کربن فوق بحرانی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱۰۰ اتمسفر به مدت ۳۰ دقیقه و

[8] -Tert Butyl Hydro Quinone

.با استفاده از دستگاه (Suprex MPS/225 Multipurpose) انجام شد. ۲۰ گرم پودر برگ چای سبز پس از توزین در یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد. از اتانول:آب (۵۰:۵۰) به عنوان حلال تعدیل کننده استفاده شد. عصاره استخراج شده بعد از تبخیر حلال توسط روتاری اواپراتور (۴۵ درجه سانتی‌گراد)، در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Goli *et al.*, 2005).

روش استخراج با کمک امواج اولتراسوند

۱۰ گرم نمونه پودر شده برگ چای سبز با ترازو توزین شد و در ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری با ۱۰۰ میلی‌لیتر (۱:۱۰) حلال اتانول-آب (۵۰:۵۰) مخلوط گردید و در حمام اولتراسوند مدل (Elmas model 690/H) به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و فرکانس ۳۵ کیلو هرتز قرار گرفت. عصاره سپس به کمک کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد و حلال اضافی با استفاده از روتاری اواپراتور (۴۵ درجه سانتی‌گراد) تبخیر شد. عصاره تغلیظ شده تا زمان استفاده در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Esmaeilzadeh Kenari & Razavi, 2022).

استخراج با کمک آب زیر بحرانی

۱۰ گرم نمونه پودر شده برگ چای سبز درون سل مخصوص دستگاه استخراج آب زیربحرانی پژوهشکده صنایع غذایی مشهد توزین شد. آب به میزان ۵۰ میلی لیتر به تانک آب افزوده شد. عصاره‌گیری توسط آب زیر بحرانی تا دمای ۱۶۰ درجه‌سانتی گراد و فشار ۶/۸۹ مگاپاسکال و سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. عصاره به دست آمده در شرایط یکسان تغلیظ و تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد (Zakaria & Kamal, 2016).

استخراج با کمک ماکروویو

۱۰ گرم نمونه پودر شده برگ چای سبز در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری با ۱۰۰ میلی‌لیتر (۱:۱۰) حلال اتانول-آب (۵۰:۵۰) مخلوط گردید و در دستگاه مایکروویو (ME6194SD، Malaysia, Samsung) قرار گرفت. مایکروویو مورد استفاده دارای کندانسور برای خروج و سرد کردن بخارات و برگشت حلال به بالن استخراج و همزن مغناطیسی بود. همزمان با مخلوط شدن محتویات بالن با کمک همزن مغناطیسی، اشعه دهی با فرکانس ۲۴۵۰ مگاهرتز با قدرت ۸۰۰ وات در طی ۱۵ دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انجام شد. عصاره حاصل به کمک کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد و حلال اضافی با استفاده از روتاری اواپراتور (۴۵ درجه سانتی‌گراد) تبخیر شد. عصاره تغلیظ شده تا زمان استفاده در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Flórez *et al.*, 201).

بازده استخراج عصاره

برای اندازه‌گیری راندمان عصاره‌گیری روش‌های ذکر شده بر حسب ماده خشک، ۵ میلی لیتر عصاره درون بالن ته گرد ریخته شد و وزن آن ثبت گردید (مقدار کمتر نمونه اولیه باعث بالا رفتن دقت کار جهت تعیین بازده عصاره‌گیری شد). بالن

سپس در روتاری اواپراتور با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس در آون با دمای ۱۰۵-۱۰۳ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. راندمان عصاره‌گیری بر حسب گرم عصاره در ۱۰۰ گرم عصاره خشک بیان گردید (Esmaeilzadeh Kenari & Razavi, 2022).

رابطه ۱: $$\text{بازده عصاره‌گیری} = \frac{\text{وزن عصاره خشک شده}}{\text{وزن ماده اولیه}} \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری فنول کل عصاره چای سبز

مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره از طریق روش طیف سنجی با معرف فولین- سیوکالتیو مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بر اساس میلی گرم اسید گالیک بر گرم عصاره بیان شد. در این روش مقدار ۰/۵ میلی لیتر از عصاره با ۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالچو که به نسبت ۱به۱۰ با آب مقطر رقیق شده بود، مخلوط گردید. سپس ۴ میلی لیتر سدیم کربنات (۱مولار) به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آبی با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا فاز آبی گسترش یابد و سپس جذب آن در ۷۶۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV-Vis خوانده شد.

اندازه‌گیری توکوفرول عصاره

مقدار کل توکوفرول‌های عصاره با استفاده از روش رنگ سنجی مورد بررسی قرار گرفت. محلول‌های ۲-۲- بی پریدین ۰/۰۷درصد و آهن۳ کلرید شش آبه ۰/۲درصد تهیه شد. به ترتیب مقدار ۰/۰۷ گرم ۲-۲- بی پریدین و ۰/۲ گرم آهن ۳ کلرید توزین و در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول حل شد. سپس ۰/۲ گرم از عصاره با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر توزین شد. ۵ میلی لیتر تولوئن به آن اضافه و به‌خوبی بهم زده شد. ۰/۵ میلی لیتر محلول آهن ۳ کلرید و ۳/۵ میلی لیتر محلول ۲-۲- بی پریدین به آن افزوده شد و نهایتا با اتانول به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. بعد از یک دقیقه با استفاده از دستگاه طیف سنج نوری (PG-Instruments-Ltd-USA) جذب نمونه در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد و از طریق معادله خط مقدار توکوفرول‌های موجود در عصاره محاسبه شد (Flórez *et al*., 2015).

اندازه‌گیری فلاونوئید عصاره

ترکیبات فلاونوئیدی عصاره به روش کیم و همکاران (۲۰۲۳) اندازه‌گیری شد. به این ترتیب که به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره، ۰/۱ میلی‌لیتر از کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد افزوده سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از استات پتاسیم ۱ مولار، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول و در پایان ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و بعد از گذشت مدت زمان ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه جذب آن‌ها در ۴۱۵ نانومتر قرائت و مقدار فلاونوئید بر اساس منحنی استاندارد کوئرستین بر حسب میلی گرم کوئرستین بر ۱۰۰ گرم عصاره گزارش شد (Kim *et al*., 2023).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره

مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره

۰/۳ میلی لیتر از عصاره با غلظت‌های مختلف با ۲/۷ میلی لیتر محلول متانولی (۶×۱۰^{-۵}) DPPH مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق در مکان تاریک نگهداری شد و جذب در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. نمونه شاهد حاوی تمام ترکیبات و شرایط ذکر شده بدون افزودن عصاره است. آنتی اکسیدانی سنتزی TBHQ به میزان ppm۱۰۰ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (Masek *et al*., 2017).

رابطه ۲: درصد مهار رادیکال آزاد DPPH= (جذب DPPH-جذب نمونه)/جذب DPPH

بیرنگ شدن بتاکاروتن:لینولئیک اسید عصاره

ابتدا یک محلول پایه از بتاکاروتن- لینولئیک اسید به صورت زیر تهیه گردید: ۵ میلی گرم از بتاکاروتن در ۱۰ میلی لیتر کلروفرم حل شد، ۶۰۰ میکرو لیتر از محلول تهیه شده به مخلوط ۴۰ میلی گرم لینولئیک اسید و ۴۰۰ میلی گرم توئین ۴۰ اضافه شد. سپس با روش تبخیر در خلا کلروفرم جدا گردید و ۱۰۰ میلی لیتر آب اکسیژنه به آن اضافه و شدیدا هم زده شد. ۵ میلی لیتر از امولسیون تهیه شده فوق به لوله آزمایش منتقل و ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره به لوله آزمایش اضافه گردید. یک نمونه بدون عصاره نیز به عنوان ترکیب شاهد در نظر گرفته شد. تمامی مراحل در مورد TBHQ به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد انجام شد. جذب نوری نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در ۴۷۰ نانومتر در زمان صفر و همچنین بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای اتاق قرائت شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره به عنوان درصد بازداری بیان می‌شود (Xie *et al*., 2014).

خاصیت احیا کنندگی آهن عصاره

برای اندازه‌گیری توان آنتی اکسیدانی احیاء آهن از روش ماسک با اندکی تغییر استفاده شد. در لوله آزمایش به ۰/۰۲ میلی لیتر عصاره (با غلظت‌های مختلف بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر) یا محلول استاندارد آبی سولفات آهن (غلظت ۰/۳۷- ۰/۱۸۵ میکرومول)، ۱ میلی لیتر از محلول کاری اضافه و مخلوط شد. مخلوط فوق ۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد و سپس جذب نوری نمونه‌ها قرائت شد. فعالیت احیاکنندگی عصاره بر حسب میکرو مول آهن در میلی گرم محاسبه شد. آنتی اکسیدانی سنتزی TBHQ به میزان ppm ۱۰۰ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (Masek *et al*., 2017).

پایداری اکسایشی عصاره

برای تعیین پایداری اکسایشی نمونه‌های روغن از دستگاه رنسیمت (Metrohm, 743- Switzerland) استفاده شد. به این منظور عصاره به همراه ۳ گرم نمونه روغن در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد مورد آزمایش قرار گرفت. سرعت هوادهی ۱۵

لیتر بر ساعت تنظیم شد. داده‌های به دست آمده بر حسب طول دوره القا مورد مقایسه قرار گرفت (Razavi & Kenari, 2021).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده از آزمایش‌های مختلف با استفاده از طرح کاملا تصادفی و آزمون آنووا در قالب دانکن در سطح اطمینان ۹۵ ٪ در نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ باهم مقایسه شدند. برای ترسیم نمودارها از نرم افزار اکسل نسخه ۲۰۱۹ استفاده شد.

نتایج و بحث

بازده استخراج، میزان ترکیبات فنولی، توکوفرولی و فلاونوئید عصاره چای سبز

نتایج مربوط به استخراج عصاره با استفاده از پنج روش مختلف در جدول ۱ نشان می‌دهد که بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و همچنین بازده استخراج عصاره به ترتیب در روش‌های استخراج به وسیله مایکروویو>فوق بحرانی> اولتراسوند> آب زیر بحرانی> ماسراسیون به‌دست آمد و تمامی روش‌های استخراج با یکدیگر اختلاف معنی دار آماری داشتند. از نظر میزان ترکیبات توکوفرولی استخراج شده، روش استخراج ماسراسیون کمترین میزان توکوفرولی را داشت و با سایر روش‌های استخراج اختلاف معنی دار آماری ($P<0.05$) داشت. بیشترین میزان توکوفرول به ترتیب با استفاده از روش‌های اولتراسوند> مایکروویو> فوق بحرانی> آب زیر بحرانی به‌دست آمد. محققان مقادیر ترکیبات فنولی و فلاونوئید چای سبز که با استفاده از حلال متانول و روش ماسراسیون استخراج شده بود را به ترتیب ۲/۲۶۲ و ۱/۵۵۷ گرم بر کیلوگرم محاسبه نمودند که میزان فنول به‌دست آمده کمتر از نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر است و در مورد میزان فلاونوئید با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (Kopjar *et al.*, 2015). در تحقیقی دیگر ترکیبات فنولی عصاره چای سبز را که به روش مایکروویو و با استفاده از حلال آب استخراج شده بود را در محدوده ۲۰/۶۸ تا ۲۳/۹۷ درصد اعلام شد که کمتر از میزان حاصل شده در پژوهش حاضر است. می‌توان گفت اختلاف در نوع حلال به‌کار رفته که در اینجا از اتانول:آب استفاده شده است را دلیلی برای بالاتر بودن مقدار ترکیبات فنولی در پژوهش حاضر دانست (Tram *et al.*, 2015). در تحقیقی دیگر روش استخراج متداول را با روش استخراج با کمک اولتراسوند حمام و پروب برای ترکیبات فعال چای زرد مقایسه شد و مشخص گردید که استفاده از اولتراسوند منجر به افزایش استخراج ترکیبات فلاونوئیدی عصاره میشود که مطابق با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر است (Horžić *et al.*, 2012). افزایش زمان استخراج عصاره به علت اینکه ترکیبات فنولی به زمان‌ها و دماهای بالای استخراج حساس هستند منجر به کاهش ترکیبات استخراجی می‌شود؛ لذا نتایج بررسی در پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که روش استخراج متداول (ماسراسیون) کمترین میزان ترکیبات موثره و بازده استخراج را به خود اختصاص می‌دهد. همچنین در تحقیقی دیگر استخراج ترکیبات موثره فلاوانول برگ سبز چای را با استفاده از استخراج آب زیر بحرانی انجام شد و نشان داده شد که آب زیر بحرانی

در استخراج ترکیبات موثره بهتر از روش ماسراسیون بوده است که مطابق با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر است (Ko *et al*., 2014). حلالیت در آب زیر بحرانی به‌وسیله شرایط حلال انجام و بر روی مواد استخراجی تاثیر میگذارد. قطبیت حلال آب زیر بحرانی با افزایش درجه حرارت افزایش می‌یابد. ترکیبات قطبی کمتری به‌وسیله آب زیر بحرانی به عنوان یک حلال آلی قطبی جدا می‌شوند. در تحقیقی دیگر عصاره چای سبز را با استفاده از سیال فوق بحرانی استخراج نموده و میزان ترکیبات فنولی آن را بین ۱۱/۴۳ تا ۲۲/۹۶ درصد و بازده استخراج را ۲/۰۵ و ۳/۵۷ درصد گزارش شد. آنها همچنین نوع حلال را یک عامل موثر بر میزان ترکیبات فنولی و بازده استخراج معرفی نمودند بطوریکه اتانول:آب بالاترین و متانول کمترین بازده استخراج و میزان ترکیبات فنولی را داشت (Sökmen *et al*., 2018). محققان نشان دادند که بازده استخراج کاتچین‌ها در عصاره چای سبز در روش استخراج با مایکروویو (۸/۸٪) بیشتر از روش متداول استخراج سوکسله (۸/۳۰٪) و ماسراسیون (۷/۸۳٪) بوده است. تابش اشعه مایکروویو منجر به بازده بالاتر میشود و واکنشگرها می‌توانند بدون حلال حمل شوند و این روش یک تکنولوژی پاک و سبز شمرده میشود (Selvi & Nagarajan, 2018). همچنین مشخص شد که بیشترین ترکیب فنولی موجود در چای سبز فلاونوئید است همچنین تاثیر نوع حلال بر میزان ترکیبات فنولی و بازده استخراج موثر است (Setyopratomo, 2014). در تحقیقی دیگر مقایسه و بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات پلی فنولی از چای سبز با استفاده از دو روش ماسراسیون و اولتراسوند را انجام شد و مشخص گردید که در روش استخراج با اولتراسوند میزان ترکیبات فنولی و بازده استخراج تا ۱۵٪ افزایش می‌یابد. آنها دلیل این امر را تشکیل کانال‌های میکروسکوپی به‌وسیله پدیده کاویتاسیون عنوان نمودند و بهبود انتقال حلال به داخل بافت‌ها را دلیلی برای کارایی بالاتر روش استخراج به کمک اولتراسوند در مقایسه با روش‌های متداول دانستند (Ayyildiz *et al*., 2018). پژوهشگران مختلف به نقش پدیده کاویتاسیون در افزایش انتقال جرم نمونه‌های مختلف اشاره کرده اند (Both *et al*., 2014; Chemat & Khan, 2011; Horžić *et al*., 2012). مشاهده می‌شود که میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی استخراج شده در روش مایکروویو بالاتر از سایر روش‌های استخراج بوده است که مطابق با نتایج نایاک و همکاران (۲۰۱۵) است. آنها سه روش استخراج با کمک اولتراسوند، مایکروویو و روش متداول را برای استخراج ترکیبات فنولی از پوست نارنگی انتخاب نمودند که مشخص گردید روش مایکروویو بهتر از روش اولتراسوند و متداول توانسته است ترکیبات فنولی پوست پرتقال را استخراج نماید (Nayak *et al*., 2015).

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره

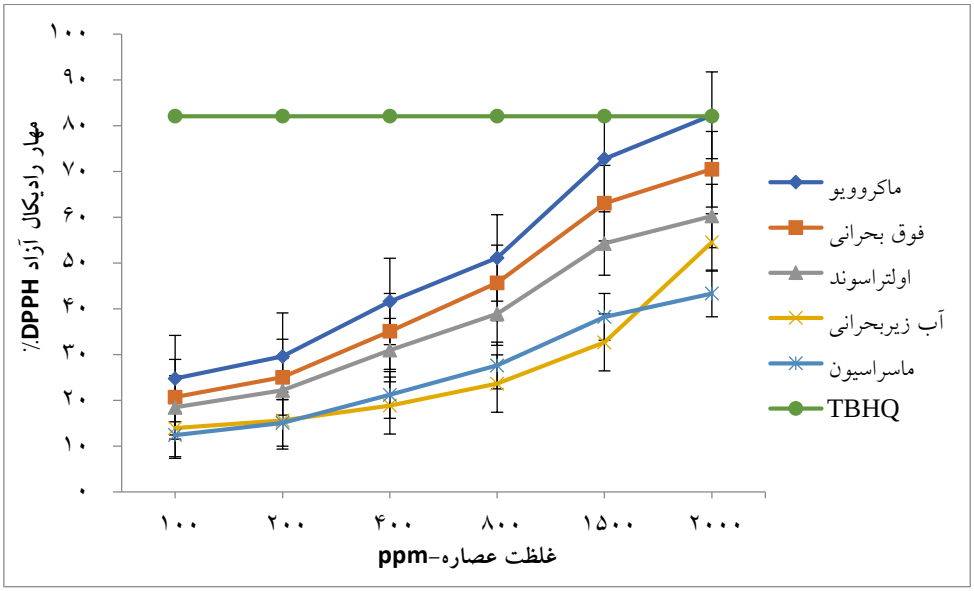
نتایج مربوط به فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های مختلف عصاره چای که در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ ppm با استفاده از روش‌های مختلف اندازه‌گیری شده است، در شکل‌های ۱ تا ۴ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت عصاره میزان مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش یافته است و بالاترین میزان مهار در تمام غلظت‌های مورد بررسی مربوط به نمونه عصاره استخراج شده به‌وسیله ماکروویو، سیال فوق بحرانی و اولتراسوند بود. در غلظت

۲۰۰۰ ppm عصاره چای استخراج شده به روش ماکروویو با آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ اختلاف معنی دار آماری نداشت. محققان فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های عصاره چای سبز که با روش‌های اولتراسوند، فشار بالا، مایکروویو و سوکسله استخراج شده بود را اندازه‌گیری و بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH را به ترتیب به روش‌های فشار بالا، سوکسله، اولتراسوند و مایکروویو نسبت دادند (Jun *et al.*, 2011). مکانیسم فرآیند استخراج به وسیله اولتراسوند در دو مرحله کلی خلاصه می‌شود؛ ابتدا حل شدن ترکیبات محلول از سطح گیاه رخ می‌دهد و سپس انتقال جرم اتفاق می‌افتد. هم چنین در تحقیقی دیگر اندازه‌گیری ترکیبات فنولی، بازده استخراج و فعالیت آنتی اکسیدانی چای سبز را انجام شد و اظهار شد که بین میزان ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها رابطه مستقیم وجود دارد که مطابق با نتایج پژوهش حاضر در مهار رادیکال آزاد است (Masek *et al.*, 2017). مقادیر IC50 برای نمونه‌های مختلف عصاره استخراج شده به روش ماکروویو، سیال فوق بحرانی، اولتراسوند، آب زیر بحرانی و ماسراسیون به ترتیب ۷۸۴/۵، ۸۳۲/۱۶، ۱۳۷۵، ۱۸۱۴ و ۲۱۰۵/۲۲ ppm می‌باشد.

جدول ۱: ترکیبات موثره و بازده استخراج عصاره بر حسب درصد وزنی/وزنی

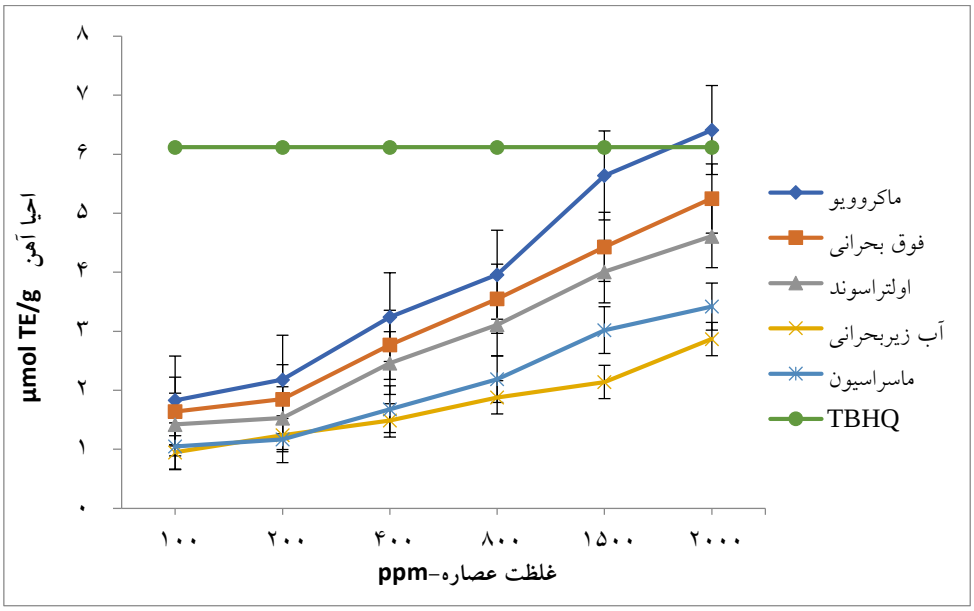
روش استخراج	فنول کل (mg GA/g DM)	فلاونوئید کل (mg QE/g DM)	توکوفرول (mg αT/g DM)	بازده استخراج (٪)
ماکروویو	۲۸/۵۷^{a}	۵/۲۱^{a}	۱/۰۷۳^{a}	۲۳/۱۸^{a}
فوق بحرانی	۲۴/۱۲^{b}	۴/۸۸^{b}	۱/۰۵۵^{b}	۱۷/۰۶^{b}
اولتراسوند	۲۰/۷۷^{c}	۳/۹۳^{c}	۱/۰۷۹^{a}	۱۴/۵۴^{c}
آب زیر بحرانی	۱۸/۶۵^{d}	۳/۱۵^{d}	۱/۰۴۱^{c}	۱۱/۳۸^{d}
ماسراسیون	۱۴/۳۱^{e}	۲/۷۱^{e}	۰/۱۷۶^{d}	۸/۱۶^{e}

حروف کوچک غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری بین گیاهان مختلف با روش استخراج یکسان است ($P<0.05$).



شکل ۱: مهار رادیکال آزاد DPPH در عصاره‌های مختلف چای سبز

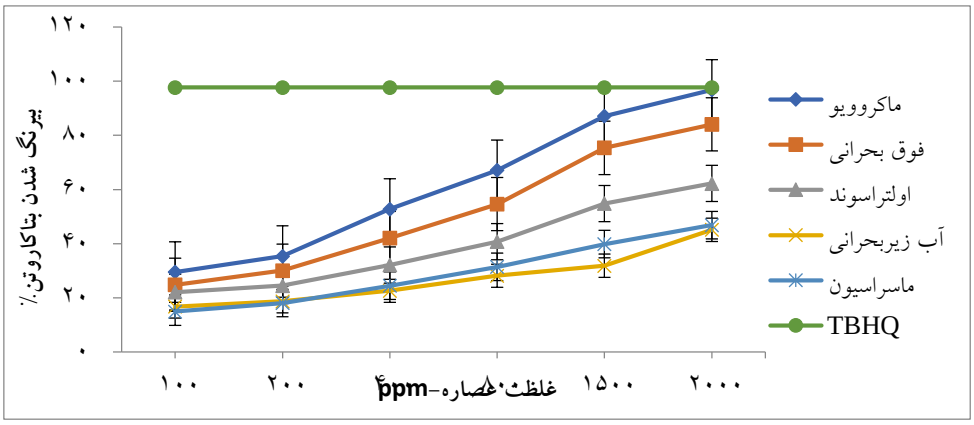
از نظر میزان احیا آهن در عصاره‌های مختلف، در شکل ۲ مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت عصاره میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به صورت احیا آهن افزایش یافته است و اختلاف معنی دار آماری ایجاد شده است. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره استخراج شده با استفاده از مایکروویو در دو غلظت ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ ppm با آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ اختلاف معنی دار آماری نداشت. سلوی و همکاران (۲۰۱۸) فعالیت آنتی اکسیدانی پلی فنول‌های چای سبز را با دو روش مهار رادیکال آزاد DPPH و احیا آهن اندازه‌گیری نمودند و مشخص گردید که با افزایش غلظت پلی فنول‌ها فعالیت آنتی اکسیدانی آن‌ها افزایش می‌یابد که مطابق با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر است (Selvi & Nagarajan, 2018).



شکل ۲: احیا آهن در عصاره‌های مختلف چای سبز

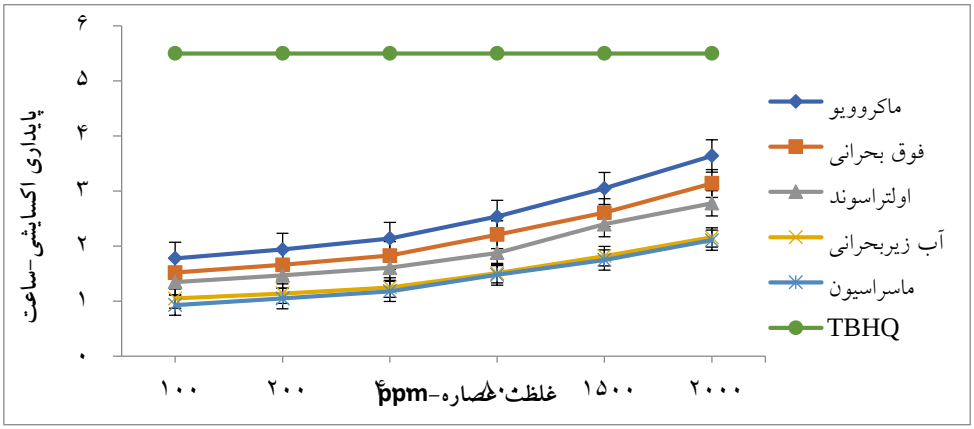
نتایج مربوط به فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف چای سبز که با استفاده از روش بیرنگ شدن بتاکاروتن:لینولئیک اسید اندازه‌گیری شده است نشان می‌دهد که غلظت عصاره بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها تاثیر داشته است و با افزایش غلظت عصاره ضمن افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی اختلاف معنی دار آماری ایجاد شده است. همبستگی قوی بین نتایج به‌دست آمده از سایر آزمون‌های ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی نشان می‌دهد که در این روش نیز عصاره استخراج شده به روش مایکروویو و سیال فوق بحرانی بالاترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان دادند. مطالعات مختلف از روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و نیز بیرنگ شدن بتاکاروتن برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره چای سبز استفاده نمودند و همبستگی این دو روش را مثبت ارزیابی نمودند، آنها فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد ترکیبات فنولی و همچنین خاموش کنندگی آن‌ها را مرتبط با فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره چای سبز دانستند (Martins *et al.*, 2018). مقادیر IC50 برای نمونه‌های مختلف

عصاره استخراج شده به روش ماکروویو، سیال فوق بحرانی، اولتراسوند، آب زیر بحرانی و ماسراسیون به ترتیب ۳۷۴/۱، ۷۸۴/۳۲، ۱۴۱۵/۲، ۲۲۱۸/۳ و ۲۱۰۴/۷ ppm می‌باشد.



شکل ۳: بیرنگ شدن بتاکاروتن:لینولئیک اسید در عصاره‌های مختلف چای سبز

پایداری اکسایشی نشان دهنده مقاومت عصاره به اکسایش می‌باشد و می‌توان آن را مقاومت روغن‌ها و چربی‌ها تحت شرایط تعریف شده و فساد ناشی از آن که باعث تولید طعم و بوی نامطلوب می‌گردد تعریف کرد. نتایج مربوط به پایداری اکسایشی عصاره‌های مختلف در شکل ۴ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت عصاره به دلیل افزایش ترکیبات فنولی پایداری اکسایشی عصاره افزایش یافته است. عصاره استخراج شده به وسیله ماکروویو، سیال فوق بحرانی و اولتراسوند بالاترین پایداری اکسایشی را در میان عصاره‌ها داشتند. همچنین بیشترین پایداری اکسایشی مربوط به آنتی اکسیدان سنتزی TBHQ بود. این نتایج با نتایج تحقیقات دیگر مطابقت دارد (Taghvaei *et al.*, 2014). رضوی و اسماعیل زاده کناری (۲۰۲۰) نشان دادند که با افزایش غلظت عصاره میزان پایداری اکسایشی آن افزایش می‌یابد که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (Razavi & Kenari, 2021).



شکل ۴: پایداری اکسایشی در عصاره‌های مختلف چای سبز

نتیجه گیری نهایی

در این پژوهش تاثیر روش‌های مختلف استخراج ماسراسیون، آب زیر بحرانی، سیال فوق بحرانی، ماکروویو و اولتراسوند بر میزان ترکیبات موثره و خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره چای سبز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد روش استخراج تاثیر معنی دار آماری بر بازده استخراج، میزان ترکیبات موثره و در نهایت خاصیت آنتی اکسیدانی دارد. نتایج این تحقیق به ترتیب استفاده از روش‌های استخراج مایکروویو> فوق بحرانی> اولتراسوند> آب زیر بحرانی را برای استخراج ترکیبات موثره عصاره چای سبز پیشنهاد می‌نماید.

منابع

Ayyildiz, S. S., Karadeniz, B., Sagcan, N., Bahar, B., Us, A. A., Alasalvar, C. J. F., & Processing, B. (2018). Optimizing the Extraction Parameters of Epigallocatechin Gallate Using Conventional Hot Water and Ultrasound Assisted Methods from Green Tea.

Banerjee, S., & Chatterjee, J. (2015). Efficient extraction strategies of tea (Camellia sinensis) biomolecules. *Journal of food science and technology*, *52*, 3158-3168.

Both, S., Chemat, F., & Strube, J. J. U. s. (2014). Extraction of polyphenols from black tea–conventional and ultrasound assisted extraction. *21*(3), 1030-1034.

Butt, M. S., Ahmad, R. S., Sultan, M. T., Qayyum, M. M. N., & Naz, A. (2015). Green tea and anticancer perspectives: updates from last decade. *Critical reviews in food science and nutrition*, *55*(6), 792-805.

Carpentieri, S., Soltanipour, F., Ferrari, G., Pataro, G., & Donsì, F. (2021). Emerging green techniques for the extraction of antioxidants from agri-food by-products as promising ingredients for the food industry. *Antioxidants*, *10*(9), 1417.

Chemat, F., & Khan, M. K. J. U. s. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *18*(4), 813-835.

Esmaeilzadeh Kenari, R., Mohsenzadeh, F., Amiri, Z. R. J. F. s., & nutrition. (2014). Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. *2*(4), 426-435.

Esmaeilzadeh Kenari, R., & Razavi, R. (2022). Phenolic profile and antioxidant activity of free/bound phenolic compounds of sesame and properties of encapsulated nanoparticles in different wall materials. *Food science & nutrition*, *10*(2), 525-535.

Fernandes, L., Cardim-Pires, T. R., Foguel, D., & Palhano, F. L. (2021). Green tea polyphenol epigallocatechin-gallate in amyloid aggregation and neurodegenerative diseases. *Frontiers in neuroscience*, *15*, 718188.

Flórez, N., Conde, E., & Domínguez, H. (2015). Microwave assisted water extraction of plant compounds. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *90*(4), 590-607.

Fujioka, K., Salaheldin, T. A., Godugu, K., Meyers, H. V., & Mousa, S. A. (2022). Edible green solvent for optimized Catechins extraction from green tea leaves: Anti-hypercholesterolemia. *Journal of pharmacy and pharmacology research*, *6*(2), 80.

Goli, A. H., Barzegar, M., & Sahari, M. A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (Pistachia vera) hull extracts. *Food Chemistry*, *92*(3), 521-525.

Horžić, D., Jambrak, A. R., Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Lelas, V. J. F., & Technology, B. (2012). Comparison of conventional and ultrasound assisted extraction techniques of yellow tea and bioactive composition of obtained extracts. *5*(7), 2858-2870.

Jun, X., Deji, S., Ye, L., & Rui, Z. J. I. J. o. P. (2011). Comparison of in vitro antioxidant activities and bioactive components of green tea extracts by different extraction methods. *408*(1-2), 97-101.

Karaosmanoglu, H., & Kilmartin, P. (2015). Tea extracts as antioxidants for food preservation. In *Handbook of antioxidants for food preservation* (pp. 219-233). Elsevier.

Keneth Iceland, K. (2021). Green Strategy–Based Synthesis of Silver Nanoparticles for Antibacterial Applications.

Kim, Y.-R., Kim, G.-C., & Nam, S.-H. (2023). Evaluation of antioxidant and antifungal activity of Chamaecyparis obtuse extract for use in oral herbal medicine. *Applied Sciences*, *13*(18), 10236.

Ko, M.-J., Cheigh, C.-I., Chung, M.-S. J. J. o. a., & chemistry, f. (2014). Optimization of subcritical water extraction of flavanols from green tea leaves. *62*(28), 6828-6833.

Kopjar, M., Tadić, M., Piližota, V. J. C., & Agriculture, B. T. i. (2015). Phenol content and antioxidant activity of green, yellow and black tea leaves. *2*(1), 1.

Li, F., Wei, Y., Liang, L., Huang, L., Yu, G., & Li, Q. (2021). A novel low-molecular-mass pumpkin polysaccharide: Structural characterization, antioxidant activity, and hypoglycemic potential. *Carbohydrate Polymers*, *251*, 117090.

Lisko, J. G., Lee, G. E., Kimbrell, J. B., Rybak, M. E., Valentin-Blasini, L., & Watson, C. H. (2017). Caffeine concentrations in coffee, tea, chocolate, and energy drink flavored e-liquids. *Nicotine & Tobacco Research*, *19*(4), 484-492.

Martins, C., Vilarinho, F., Silva, A. S., Andrade, M., Machado, A. V., Castilho, M. C., Sá, A., Cunha, A., Vaz, M. F., & Ramos, F. (2018). Active polylactic acid film incorporated with green tea extract: Development, characterization and effectiveness. *Industrial crops and products*, *123*, 100-110.

Masek, A., Chrzescijanska, E., Latos, M., Zaborski, M., & Podsędek, A. (2017). Antioxidant and antiradical properties of green tea extract compounds. *International Journal of Electrochemical Science*, *12*(7), 6600-6610.

Nayak, B., Dahmoune, F., Moussi, K., Remini, H., Dairi, S., Aoun, O., & Khodir, M. J. F. c. (2015). Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from Citrus sinensis peels. *187*, 507-516.

Ng, K.-W., Cao, Z.-J., Chen, H.-B., Zhao, Z.-Z., Zhu, L., & Yi, T. (2018). Oolong tea: A critical review of processing methods, chemical composition, health effects, and risk. *Critical reviews in food science and nutrition*, *58*(17), 2957-2980.

Razavi, R., & Kenari, R. E. (2021). Antioxidant evaluation of Fumaria parviflora L. extract loaded nanocapsules obtained by green extraction methods in oxidative stability of sunflower oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *15*(3), 2448-2457.

Selvi, I. K., & Nagarajan, S. J. L. (2018). Separation of catechins from green tea (Camellia sinensis L.) by microwave assisted acetylation, evaluation of antioxidant potential of individual components and spectroscopic analysis. *91*, 391-397.

Sereshti, H., Khosraviani, M., Samadi, S., & Amini-Fazl, M. S. (2014). Simultaneous determination of theophylline, theobromine and caffeine in different tea beverages by graphene-oxide based ultrasonic-assisted dispersive micro solid-phase extraction combined with HPLC-UV. *Rsc Advances*, *4*(87), 47114-47120.

Setyopratomo, P. J. A. J. o. E. (2014). Extraction of phenolic compounds from green tea using ethanol. *ARPN Journal of EngineeringApplied Sciences*, *9*(9), 1516-1521.

Sökmen, M., Demir, E., & Alomar, S. Y. J. T. J. o. S. F. (2018). Optimization of sequential supercritical fluid extraction (SFE) of caffeine and catechins from green tea. *133*, 171-176.

Taghvaei, M., Jafari, S. M., Mahoonak, A. S., Nikoo, A. M., Rahmanian, N., Hajitabar, J., & Meshginfar, N. (2014). The effect of natural antioxidants extracted from plant and animal resources on the oxidative stability of soybean oil. *LWT-Food Science and Technology*, *56*(1), 124-130.

Tram, N. N., Hien, P. P., Oanh, H. N. J. J. o. F., & Sciences, N. (2015). Optimizing the extraction conditions of phenolic compounds from fresh tea shoot. *3*(1-2), 106-110.

Wilkinson, C., Brooks, J., Stander, M., Malgas, R., Roodt-Wilding, R., & Makunga, N. (2024). Metabolomic profiling of wild rooibos (Aspalathus linearis) ecotypes and their antioxidant-derived phytopharmaceutical potential. *Metabolomics*, *20*(3), 45.

Xie, M., Hu, B., Wang, Y., & Zeng, X. (2014). Grafting of gallic acid onto chitosan enhances antioxidant activities and alters rheological properties of the copolymer. *Journal of agricultural and food chemistry*, *62*(37), 9128-9136.

Zakaria, S. M., & Kamal, S. M. M. (2016). Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and algae: Applications in pharmaceutical and food ingredients. *Food Engineering Reviews*, *8*, 23-34.

Zaman, F., Zhang, E., Xia, L., Deng, X., Ilyas, M., Ali, A., Guo, F., Wang, P., Wang, M., & Wang, Y. (2023). Natural variation of main biochemical components, morphological and yield traits among a panel of 87 tea [Camellia sinensis (L.) O. Kuntze] cultivars. *Horticultural Plant Journal*, *9*(3), 563-576.

Zhang, H., Tang, B., & Row, K. (2014). Extraction of catechin compounds from green tea with a new green solvent. *Chemical Research in Chinese Universities*, *30*(1), 37-41.