



***Teafüvek vizsgálata nagynyomású
folyadékkromatográfiás illetve spektrofotometriás
módszerekkel***

Lukácsi Katinka

V. évf. Vegyész MSc szakos hallgató
diplomamunka

Témavezető:

Borbélyné dr. Varga Mária
egyetemi docens

Belső konzulens:

Szilágyi Szilárd

**Debreceni Egyetem
Agrár- és Gazdálkodástudományi Centrum
Debrecen,
2013**

„Az első csésze tea ajkamat és torkomat nedvesíti meg.

A második csésze megtöri magányomat.

A harmadik csésze átjárja beleimet, és ötezer kötet művet idéz fel bennem.

*A negyedik csésze könnyű veritékezést okoz, s az élet minden igaztalansága távozik
pórusaimból.*

A hatodik csésze a halhatatlanok birodalmába vezet.

A hetedik csésze, jaj, már nem bírom tovább...”

Lu Tung



Tartalomjegyzék

1. Célkitűzés	5
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. A tea	6
2.1.2. A tea feldolgozása.....	7
2.1.2.1. Fonyasztás (előszárítás).....	7
2.1.2.2. Sodrás	7
2.1.2.3. Fermentálás.....	8
2.1.2.4. Szárítás.....	8
2.1.2.5. Válogatás (rostálás).....	8
2.1.3. A tea kémiai összetétele	9
2.1.3.1. Polifenolok	9
2.1.3.2. Flavonol	9
2.1.3.3. Flavon	9
2.1.3.4. Fenolsav	9
2.2. A nagynyomású folyadékkromatográfia	10
2.2.1. Működési elv	10
2.2.1.1. A kromatográfiában alkalmazott alapösszefüggések	10
2.2.2. Műszerezettség	13
2.2.2.1. Eluensek és az azokat tároló edények	13
2.2.2.2. A mozgófázist szállító rendszer, a szivattyú	13
2.2.2.3. A nyomásmérő	14
2.2.2.4. Injektálás	14
2.2.2.5. Kolonna.....	15
2.2.2.5.1. Normál fázisú nagynyomású folyadékkromatográfia	15
2.2.2.5.2. Fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfia.....	16
2.2.2.6. Detektorok	16
2.2.2.6.1. Nagynyomású folyadékkromatográfiában használt detektorok	17
2.3. Validálás.....	19
2.3.1. Szelektivitás, specifitás	19
2.3.2. Linearitás	19
2.3.3. Érzékenység.....	19
2.3.4. Kimutatási határ és meghatározási határ	19
2.3.5. Helyességi/visszanyerési vizsgálat	20
2.3.6. Precizitás	20

2.3.7.A módszer reprodukálhatósága.....	20
2.3.8.A módszer zavartűrése.....	20
2.3.9.Oldatstabilitás.....	20
2.3.10.Pontosság/ismételhetőség.....	21
2.4. Összes polifenol tartalom meghatározás elve.....	21
3.Anyag és módszer.....	22
3.1. Felhasznált oldószerek, vegyszerek.....	22
3.2. A mérések során használt készülékek.....	22
3.3. Mintaelőkészítés.....	23
3.3.1. Galluszsav, katechin, epikatechin és koffein meghatározáshoz.....	23
3.3.2. Összes polifenol tartalom meghatározásához.....	23
3.4. Minőségi azonosítás a nagynyomású folyadékkromatográfiában.....	24
3.5. Mennyiségi azonosítás.....	24
3.5.1. Galluszsav, katechin, epikatechin és koffein meghatározás a nagynyomású folyadékkromatográfiával.....	24
3.5.1.1. Mérési körülmények.....	25
3.5.2. Összes polifenol tartalom meghatározása.....	26
4.Eredmények és kiértékelésük.....	27
4.1. A kevert standardok vizsgálata.....	27
4.2. Tea minták vizsgálata.....	29
4.2.1. Galluszsav, katechin, epikatechin és koffein meghatározása.....	29
4.2.2. Összes polifenol tartalom meghatározása.....	33
4.3. Validálás.....	35
4.3.1.Szelektivitás, specifitás.....	35
4.3.2.Linearitás.....	35
4.3.3.Érzékenység.....	36
4.3.4.Precizitás.....	38
4.3.5.Oldatstabilitás.....	38
5.Összefoglalás.....	41
6.Summary.....	43
7.Irodalomjegyzék.....	44
Köszönetnyilvánítás.....	45
Függelék.....	46

1. Célkitűzés

Mint ahogy a kávézás úgy a teázás is rendkívüli szerepet tölt be a mai ember életében. Élvezeti cikként is értékelhető, másrészt gyógyító hatása is van, de mindkettő függ a minőségtől, ezért is fontosnak tartom a kémiai elemzést az adott lehetőségeken belül. A teák nagyon sokféle antioxidánsokat tartalmaznak mind minőségileg és mennyiségileg egyaránt. Az antioxidánsok olyan molekulák, melyek a szabadgyökök okozta károsodásokkal szemben összetett, integrált védelmet jelentenek. A szabadgyökök pedig olyan reaktív oxigén-, nitrogén-, kén- vagy szénközpontú molekulák, illetve molekularészletek, amelyek párosítatlan elektront tartalmaznak. Nagyon agresszívan reagálnak - elektronszerzés céljából - és ebből adódóan rövid élettartamúak. Ezért munkám során bizonyos antioxidánsok meghatározásával foglalkozom, mégpedig nagynyomású folyadékkromatográfia és spektrofotometria segítségével.

Köztudott, hogy a teák is tartalmaznak különböző mennyiségben koffeint is ezért az antioxidánsok mellett fontosnak tartom a koffein tartalom meghatározását is. Hiszen a koffein is egy olyan anyag mely az élő szervezetre is hatással van, mint élénkítő szer.

Azon szerencsések közé tartozom, akinek lehetősége van rengetegféle kínai és japán teák kémiai vizsgálatára. Ezért dolgozatomban bizonyos antioxidánsok vagyis polifenolok illetve koffein tartalom meghatározásával foglalkozom, ezekből a tea mintákból, mégpedig nagynyomású folyadékkromatográfia és spektrofotometria segítségével.

2. Irodalmi áttekintés

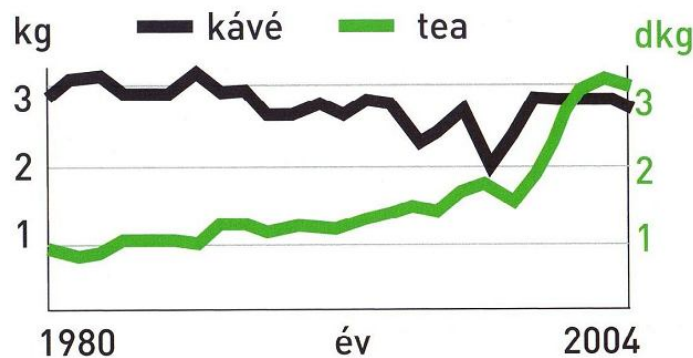
2.1. A tea

2.1.1. A tea eredete

A tea olyan örökzöld, mely nagy valószínűséggel az Észak –Burma és Dél- Nyugat Kína határán található Irrawaddy forrásvidékéről, Asszám területéről származik. Főleg az alsó lombkorona szintet alkotó hegyvidéki erdőkben él. Trópusi, szubtrópusi tájakon terjedt el. A növényt Kínában kezdték el termesztani, majd megjelent Japánban, Indiában, Srí Lankán és más országokban is, ahol a klimatikus feltételek adottak voltak.^[1]

Kezdetben a növény friss nyers leveleit egyszerűen vízben forralták. A IX. század körül a megpárolták a leveleket és pogácsaformába préselték, feldarabolták majd ez után főzték meg vízben. A teaivás szokását Ázsia után a hollandok honosították meg a XVII. század elején. Majd csak ez után érkezett meg az 1650-es években Londonba a tea. Ekkorra nagyon népszerű lett, amit csak a tehetősebbek vásárolhattak. A XVII. századra már társadalmi intézménnyé vált a teázás. Az 1830-as évekre már a Kelet Indiai Társaság monopóliumának megszűnésével egyre több tea érkezett Indiából és ez által a szegényebb rétegeknek is elérhetővé vált a teafogyasztás.^[1]

A tea eredetileg orvosság gyanánt szolgált, ám az idők során kedvelt frissítő itallá vált Magyarországon is a XIX. század közepén.



1. ábra. A tea és kávéfogyasztás alakulása Magyarországon^[1]

2.1.2. A tea feldolgozása

Az tea típusa határozza meg, hogy milyen műveleteket végeznek el rajta. Legtöbb időt a fekete teák elkészítése igényel, míg a többi teatípusnál már bizonyos részfolyamatok kimaradnak.

2.1.2.1. Fonnyasztás (előszárítás)

Ennek során csökkentik a tealevelek nedvesség-tartalmát. Célja, hogy könnyen sodorhatóvá váljanak a tealevelek, illetve, hogy megakadályozzák a spontán módon kialakuló kémiai folyamatok kialakulását a levelekben. Módja és ideje függ az előállítani kívánt tea típusától és az adott hagyományoktól. Fekete vagy oolong teához általában fonnyasztják a tea levelet, de van, hogy a teát vékony rétegben szétterítik, hogy minél nagyobb felületen érintkezzen a levegővel. Zöld teánál hevítik (Kínában) vagy gőzölik (Japánban) általában a leveleket. Zöld teánál ekkor a katechinek még nem oxidálódnak, így a levelek meg tudják őrizni a zöld színüket. A fehér teák szárítását szabad ég alatt végzik. Illetve rövid ideig tartó gőzöléssel akadályozzák meg az oxidációs folyamatok beindulását.

2.1.2.2. Sodrás

Fekete és oolong teák esetében ennek célja, hogy szétszakítsák a levelek sejtfalát. Így, az enzimeket tartalmazó sejtnedvek kikerülnek a levelek felületére, majd összekeveredve megindulnak az oxidációs folyamatok. A sodrás az erjesztés elő művelete, amit eleinte kézzel majd sodró hengerekkel végeztek. Ma már gépekkel csinálják.



2.ábra. A tea levelek kézi sodrása^[1]

2.1.2.3. Fermentálás

Azért szükséges a fekete- és oolong teákat erjeszteni, mert nehéz kivonni a hatóanyagot a levélből. Ekkor aktiválják a szöveti enzimeket (polifenol - oxidáz) és mikroorganizmusok segítségével emésztik a szénhidrát tartalmat. A cseranyagok és a kötött alkaloidok felszabadulnak (oxidálódnak) és a tea levelek színe egyre sötétebb lesz. A teát magas páratartalom mellett, kb. 23-29 °C – on erjesztik. A fermentálás ideje függ a tea fajtájától.

A teák osztályozása a fermentáció mértéke alapján:

- puer tea – kétszeresen fermentált tea
- fekete tea – teljesen fermentált tea
- oolong tea – amit csak részlegesen fermentálnak
- sárga tea – enyhén – későn erjesztett tea
- fehér tea – enyhén erjesztett, csak szárított tea
- zöld tea – fermentálás nélkül készült tea

2.1.2.4. Szárítás

Célja, az erjesztési folyamat befejezése, vagyis az enzimek aktivitásának megállítása. Ezt a hőmérséklet megemelésével teszik. További cél, hogy sokáig eltartható legyen a tea, harmadrészt pedig, az aroma és az íz anyagok stabilizálása miatt szükséges.

2.1.2.5. Válogatás (rostálás)

Eleinte kézileg végezték, később korszerűbb üzemekben rostákon válogatták a tea leveleket.^[2]

2.1.3. A tea kémiai összetétele

A tea pszichológiai és farmakológiai hatásának jobb megértéséhez tudnunk kell a tea kémiai összetételét. A kémiai összetételt leginkább befolyásoló tényező a leszedett tealevél kora, a talaj minősége, a termesztett tea fajtája és az évszak. A tea aromája az illékony elemektől, míg a színe és íze főként a nem illékony alkotó részeketől függ. Az előbbi csoportba a szénhidrátok, alkoholok, aldehidek, ketonok, savak, észterek, laktonok, nitrogén ill. kén származékok, míg utóbbi csoportba leginkább a polifenolok, a flavonolok, a flavonok, fenolsavak, aminosavak, alkaloidák, ásványok, vitaminok, enzimek tartoznak. Az aromaanyagok vizsgálatakor gőzdesztillációt, oldószer extrakciót (SDE), szuperkritikus fluid extrakciót (SCFE) és szilárd fázisú extrakciót (SPE) használnak.

2.1.3.1. Polifenolok

A polifenolok adják a nyers tea levéltömegének 20-35 %-át és a zöld tea száraz levél tömegének 11-20 %-át. Ezek közül a legfontosabbak, a polifenolok túlnyomó részét (60-80 %-át) adó katechinek. A tea polifenoljainak főbb összetevői a flavonolok, antocianinok, hidroxil - 4 - flavonolok, flavonok, fenolsavak.

2.1.3.2. Flavonol

A flavonolok (főleg katechinek) adják a tea polifenoljainak 60-80 %-át. A katechinek vízben oldódó színtelen anyagok és (részben) a zöld tea fanyarságáért és keserű ízéért felelősek. Az éter típusú katechinek erősebben kesernyések és fanyarok. Általában magasabb a katechin tartalom a nyári időszakban és nagy tömegű tea állomány esetében, kisebb tavasszal és kis növénytársulásban.

2.1.3.3. Flavon

A flavonok vízben oldódó komponensek, amelyek a tea öntetének sárga színét adják a zöld és a fekete teában. A zöld tea öntetében 18 flavonszármazékot mutattak ki, ezek a C-glikozil flavonokkal hozhatók összefüggésbe.

2.1.3.4. Fenolsav

A tea főbb fenolsavai a galluszsav és a klorogénsav. A természetben a teában szokatlanul nagy mennyiségben fordul elő és mennyisége összefüggésben van a végül elkészített fekete tea minőségével. A zöld teában 0,4-1,6 g/kg mennyiségben található. A fermentáció során mennyiségük növekszik, amikor felszabadulnak a katechin gallátoktól. A tealevél továbbá számtalan olyan anyagot tartalmaz, mint például ásványi anyagokat, aminosavakat (leginkább theanin), lipideket, vitaminokat, szénhidrátokat (cukrok), pigmenteket stb. Jelentős

megemlíteni, hogy más – nem kínai és japán tea – növényekhez hasonlítva jóval nagyobb a fluor, nitrogén, alumínium, jód, szelén, nikkel, arzén, mangán tartalma.^[3]

2.2. A nagynyomású folyadékkromatográfia

A tea minták vizsgálatát HPLC készülékkel végeztem, így a továbbiakban részletesebben kitérek a készülék felépítésére, működésére és elvére.

2.2.1. Működési elv

A kromatográfia olyan elválasztástechnikai eljárás, amelynél a vizsgálandó minta komponensei egy állófázis és azzal érintkező mozgófázis közötti anyagátmeneten, valamint az egyes komponensek a két fázissal való eltérő kölcsönhatásán alapszik. A komponensek az állófázisra való kerülésekor szorpció, a mozgó fázisba való jutáskor deszorpció megy végbe. Tehát a komponensek megoszlása az álló és mozgó fázis között fizikai tulajdonságuk alapján megy végbe. A két fázis között az egyensúlytól különböző koncentráció viszonyok jönnek létre. A folyamatnak ezért egyensúlyinak kell lennie.

Az állófázis felett nyomáskülönbség hatására kényszeráramot hozunk létre. A minta komponenseit detektor segítségével mérjük. A kromatogramot úgy kapjuk, hogy a mért jelet az idő függvényében ábrázoljuk.

A kromatográfiás elválasztás alkalmazásának feltétele, hogy a minta a mozgó fázisban oldható legyen szerkezeti átalakulás nélkül, a detektor érzékenysége megszabta koncentrációban.

2.2.1.1. A kromatográfiában alkalmazott alapösszefüggések

A kromatográfia alapegyenlete, mely kapcsolatot ad az elválasztásra jellemző termodinamikai és kinetikai paraméterek között:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{k + 1}$$

A visszatartási tényező (retenciós faktor, k):

Megadja, hogy mennyi időt tartózkodott a minta az álló fázison a mozgó fázishoz képest.

$$k = \frac{n_s}{n_m} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{D_2}{D_1}$$

ahol

t_M a holtidő.

n_s és n_m a komponensek mólszáma a mozgó - és állófázisban.

D_1 és D_2 a komponensek megoszlási hányadosai

Értéke lehetőleg 1 és 10 között legyen.

A retenciós idő:

A minta beadagolásától a csúcs maximumának megjelenéséig eltelt idő.

$$V_R = t_R F$$

ahol F a mozgófázis térfogat áramlási sebessége.

szelektivitás:

Megmutatja, hogy lehetséges-e az adott kromatográfias rendszerben az elválasztás. Értéke a két visszatartási tényező hányadosa.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

felbontás:

Két komponens egymástól való elválasztásának hatásosságát jellemzi.

$$\frac{t_{R_1} - t_{R_2}}{(W_1 + W_2)/2}$$

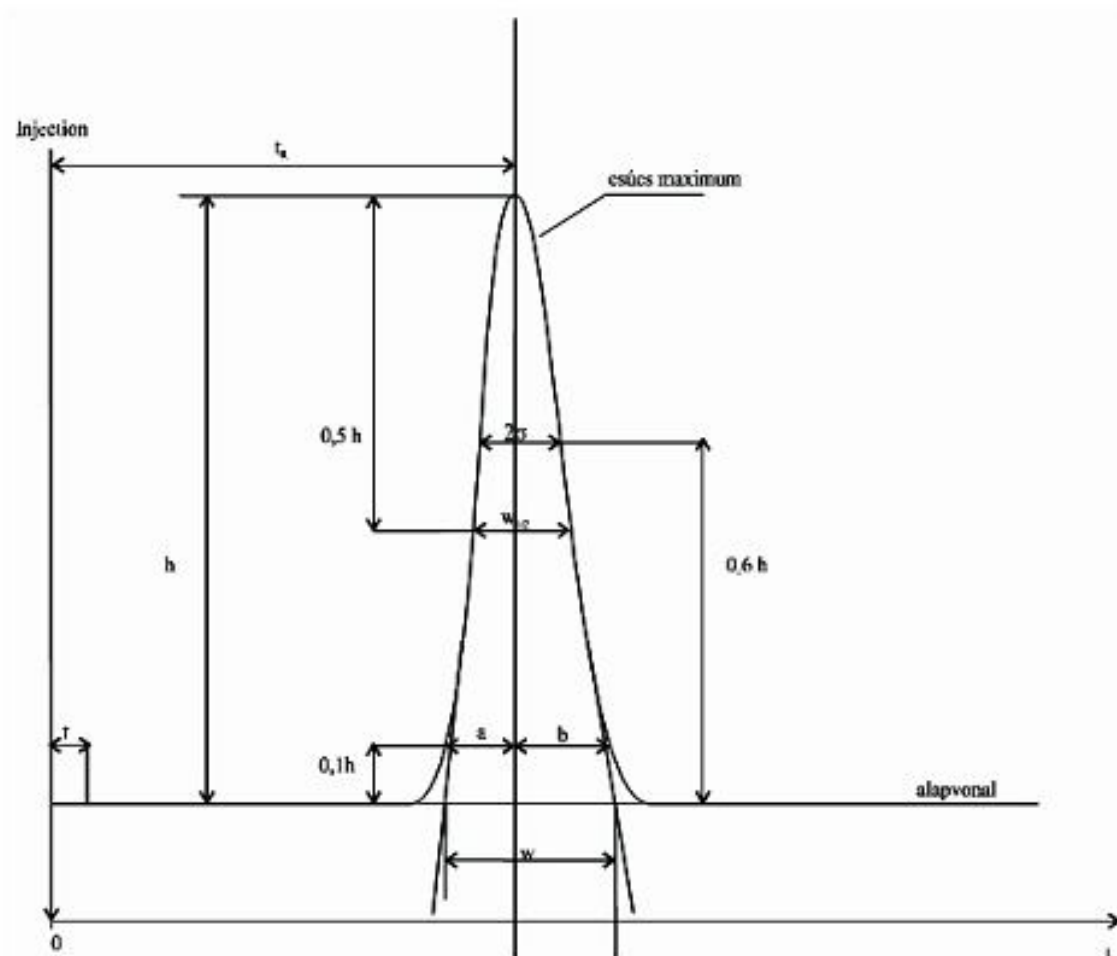
R = 1-nél az átfedés kb. 2%, általános követelmény R > 1,5

elméleti tényérszám:

A kolonna hatékonyságát jellemzi. A kromatográfiás oszlop állófázisa tetszőlegesen elméleti tényérokra osztható, amelyeken az álló- és mozgófázisban lévő anyagok egyensúlyi megoszlása valósul meg.

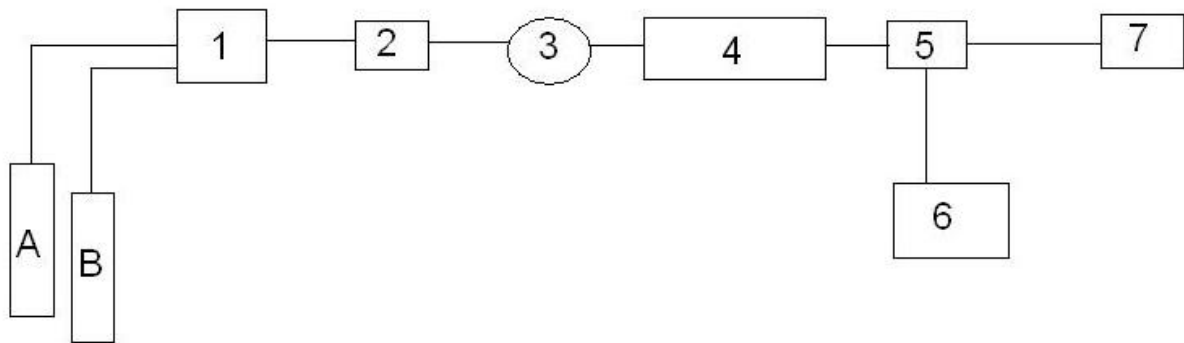
$$N = 5,54 \left(\frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2$$

ahol a $W_{1/2}$ a csúcs 50 % magasságában mért szélessége. [4]



.ábra. A kromatográfiás csúcs jellemzői. A σ érték a 0,6 h magasságban mért csúcshélesség fele [5]

2.2.2. Műszerezettség



3. ábra. A HPLC készülék részei, ahol A és B az eluens tárolók, 1 a szivattyú, 2 nyomás mérő, 3 a mintaadagoló, 4 a kolonna, 5 a detektor, 6 a adatfeldolgozó egység, 7 a hulladék tároló.

2.2.2.1. Eluensek és az azokat tároló edények

Az eluens tárolására, a mennyiségétől függően különböző térfogatú, általában sötét üvegedényeket használunk. Mivel esetünkben az oldószer tárolóban nincs mód gázmentesítésre ezért az eluenseket használat előtt ultrahangos fürdőbe tettem legalább 5 percre. Erre azért van szükség, mert az oldott gázok a pumpafejben kiválva egyenetlen folyadékszállítást, pulzálást okoznak. Az eluensekben levő kapillárisok végein rozsdamentes acélszűrők vannak, melyek megsűrítik az eluenst a szilárd szemcséktől. Ez azért szükséges, hogy ne tömítse el a kolonnát. Fontos, hogy az eluensnek kompatibilisnek kell lennie a nagynyomású szivattyú szerkezeti anyagaival.

2.2.2.2. A mozgófázist szállító rendszer, a szivattyú

A nagynyomású szivattyúval szemben támasztott általános követelmény, hogy kb 400 bar nyomásesés ellenében 0,01...10 ml/perc pulzálás mentes térfogat áramlási sebességgel szállítsa a mozgófázist. Továbbá fontos hogy kémiaileg ellenálljon a szerves oldószernek, korrózióálló -, holtterfogata kicsi - illetve gradiens képzésre alkalmas legyen.

Izokratikus elúcióról akkor beszélünk, ha a nagynyomású szivattyú az elválasztás ideje alatt állandó összetételű mozgófázist szállít. Ha időben növeljük a mozgófázis erősségét gradiens elúcióról beszélünk.

Az elúciós módszernek négy fő kritériumnak kell megfelelnie:

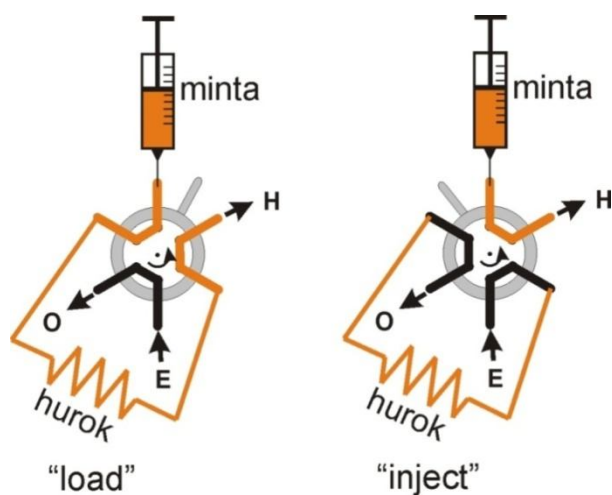
- legyen egyensúly az álló és a mozgó fázis között
- dugószerű minta bevitel
- a mozgó fázis átlagos szorpciója kisebb mértékű legyen mint a legkevésbé kötődő komponenssé
- a mozgó fázis állandóan áramoljon az állófázis felett a kromatográfiás csúcs kialakulása alatt

2.2.2.3. A nyomásmérő

Azzal, hogy mérés közben figyelni tudjuk a nyomást, ellenőrizni tudjuk a szivattyú és a kolonna állapotát. Ha nem várt módon hirtelen lecsökken a nyomás, akkor a szivattyú hibájára lehet következtetni, míg ha a nyomás nagyon megnő, akkor a kolonna esetleges eltömődésére.

2.2.2.4. Injektálás

Az injektor feladata a minta bejuttatása a kolonnára a folyadék áram megállítása nélkül, pillanatszerűen, ismételhetően azonos térfogatban. Biztosítani kell azt, hogy a mérendő mintát atmoszférikus nyomáson be tudjuk tölteni a bemérő hurokba, majd ezt a mintát veszteség nélkül be tudja juttatni a nagynyomású folyadékáramlásba. Az automata injektorok automata mintaváltóval vannak egybeépítve, amelyek teljes belső tere a bemérő hurokkal és az injektorral együtt termosztálható. Kézi injektálás esetében Hamilton fecskendő segítségével az ismert térfogatú hurokba juttatjuk a mintát, majd az injektor szelep elforgatásával a kolonnára kerül. Fontos, hogy a beinjektált térfogat minimum háromszorosa legyen a mintahurok térfogatának, hogy teljesen át legyen mosva a mintahurok a vizsgálandó anyaggal.



4.ábra.A minta bejuttatása a kolonnára^[6]

2.2.2.5. Kolonna

A kolonnák olyan nagy nyomású folyadékkromatográfiai oszlopok melyek saválló acélból készülnek és különböző töltettel vannak töltve.

2.2.2.5.1. Normál fázisú nagynyomású folyadékkromatográfia

Normál fázisú kromatográfia esetében, a polárisabb állófázison apolárisabb mozgófázissal poláris tulajdonságú vegyületeket választunk el. Ilyen például a szilikagél, alumínium – oxid, szilikagélhez kémiaailag kötött poláris csoportot tartalmazó fázisok kémiaailag kötött poláris adszorbensek. A mozgófáziskiválasztásakor figyelembe vett szempontok az oldószer polaritása, viszkozitása, UV fényáteresztése (UV cut - off), tisztasága, toxicitása, forráspontja, oldott oxigén tartalma, víztartalma, elegyíthetősége.^[4]



5.ábra.Kolonnák különböző méretben és típusban^[6]

2.2.2.5.2. Fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfia

A fordított fázisú HPLC-ban a mozgó fázis polárisabb az álló fázisnál. Például módosított szilikagél alapú állófázisok, szerves polimer alapú állófázisok.

A fordított fázisú állófázissal szemben támasztott követelmények:

- stabil legyen mechanikailag az adszorbens
- a felület energetikailag homogén legyen
- apoláris legyen a felület
- ne legyenek mikropórusok

A mozgófázissal szemben támasztott követelmények a fordított fázisú HPLC-ban:

Oldószer tisztasága nagy legyen, jó UV áteresztő képességű (UV cut - off), kis viszkozitású, nem tartalmazhat szilárd anyagot, kis toxicitású, a minta komponenseknek jól kell oldódniuk a mozgófázisban.

Az oldószerek elúciós erőssége az alábbi:

víz < metanol < acetonitril < etanol < 2-propanol < tetrahidrofurán < dioxán

Ezeket az oldószereket alkalmazzák leginkább, mert jó az UV cut - off értékük. Az UV cut - off az a hullámhossz jelenti ahol az oldószer a fény 90 %-át átengedi.

2.2.2.6. Detektorok

A detektorok működésükben különböznek, más fizikai kémiai változásra adnak jelet. Vagyis a minta jellege dönti el, hogy milyen detektort használunk detektálásra. Feladatuk, hogy a rajtuk átáramló eluensben mérjék az összetevő koncentrációjával arányos jelet.

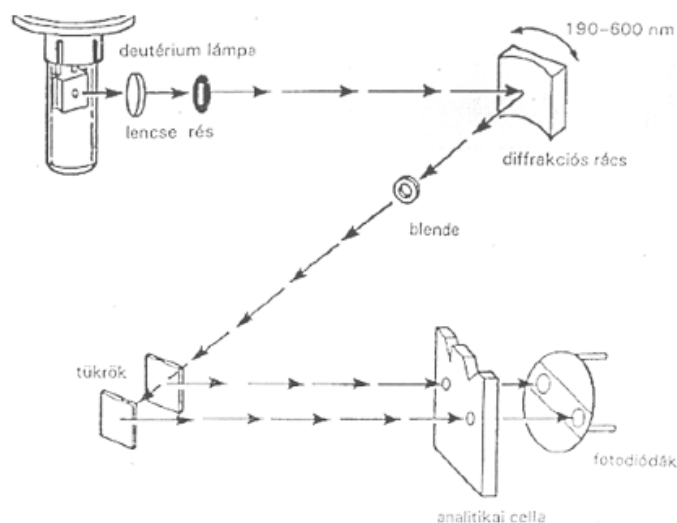
A detektor fontos paramétere a szelektivitás. A látható illetve az ultraibolya tartományban működő spektrofotometriás detektor a mérési hullámhossztól függő intenzitású jelet ad az egyes anyagokra. Az aromás vegyületek 260 nm körül mérhetők az ultraibolya tartományban. A mérési hullámhossz beállításával tehát a szelektivitás pontosítható.^[4]

2.2.2.6.1. Nagynyomású folyadékkromatográfiában használt detektorok ^[7]

Detektor	Működés	Vegyülettípus	Oldószerigény	Megjegyzés
UV-VIS	Univerzális	Kromofort csoportot igényel	UV tiszta, nem elnyelő	szinte a legjobb
Fluoreszcencia	Specifikus	Fluorofor csoportot igényel	UV tiszta, nem elnyelő	nagy specificitás
Törésmutató	Univerzális	Legyen törésmutató különbség	Állandó eluens összetétel	korlátozott érzékenység
Vezetőképességi	Csak ionokra univerzális	Ionos anyagokra	Vezetnie kell az elektromos áramot	főleg szervesen ionokra
Elektrokémiai	Specifikus	Könnyen redukálható és oxidálható anyagokra	Vezetnie kell az elektromos áramot	specifikus és érzékeny
Tömegspektrométer	Univerzális		Illékony oldószer, illékony puffer	nagy érzékenység, szerkezetfelderítés

2.2.2.6.1.1. Az UV-Vis detektorok

Az UV- Vis detektorok az ultraibolya, látható hullámhossz tartományban működő folyadékkromatográfiás detektor. Csak azok a vegyületek láthatók, amelyek valamilyen kromofor csoporttal rendelkeznek.



6. ábra. UV- Vis folyadékkromatográfiás detektor felépítése ^[4]

Sugárforrásként két fajta gáztöltésű katódlámpa terjedt el, a deutérium és a xenon gázzal töltött lámpák. A deutérium lámpa használati idejének növekedésével a cellára jutó sugárzás intenzitása csökken. Ez a folyadékkromatográfiában két paramétert befolyásol. Növekszik az alkalmazható legkisebb mérési hullámhossz, illetve a linearitási tartomány jelentősen csökken, ha a transzmittancia kicsi.

Működési tartománya 190-800 nm közé esik. 190 nm alatt a rendszert nemesgázzal kell feltölteni, vagy vákuum alá kell helyezni és a mozgó fázist (víz és acetonitril) oxigénmentesíteni kell. A detektor fotoelektron sokszorozó segítségével az abszorbancia mértékét elektromos jellé alakítja és az integrátor segítségével kapjuk meg a mérési kromatogramot.

Teljesítő képességét befolyásolja az alkalmazott oldószer fényáteresztő képessége, vagyis az UV cut – off.

<i>Oldószer</i>	<i>UVcut-off (nm)</i>
Acetonitril	190
Metanol	205
Izopropanol	215
Dioxán	230
tetrahydrofuran	230
Víz	<190

1.táblázat. kromatográfiás oldószerek UV cut – off értékei^[4]

2.3. Validálás

Analitikai módszer validálása során rendszerezett vizsgálatok segítségével bizonyítjuk, hogy a módszer teljesítményjellemzői megfelelnek az analitikai módszerrel szemben támasztott követelményeknek.

2.3.1. Szelektivitás, specifitás

A szelektivitással megadjuk, hogy az adott elválasztási módszer képes-e az összes lehetséges meghatározandó komponens elválasztására a zavaró alkotók jelenlétében.

Ha más anyag is jelen van a kromatogramon amely a meghatározás során esetleg, mint zavaró tényező is jelen lehet, akkora módszer nem specifikus.

2.3.2. Linearitás

A kalibráló egyenes linearitása azt jelenti, hogy a görbe adott tartományában, azaz a lineáris tartományban, adott megbízhatósággal egyenesnek tekinthető. A linearitást a méréstartományt lefedő koncentrációjú minták elemzésével határozzuk meg.

2.3.3. Érzékenység

Az analitikai érzékenységet a kalibráló egyenes meredekségével definiáljuk. Vagyis az egységnyi koncentrációváltozásra ($c_2 - c_1$) eső jelváltozás ($x_2 - x_1$):

$$S = \frac{x - x_1}{c_2 - c_1}$$

2.3.4. Kimutatási határ és meghatározási határ

A kimutatási határ az a határérték ahol a vizsgált komponens már megbízhatóan detektálható és megkülönböztethető a vak mintától. Vagyis az alapvonalzaj háromszorosának megfelelő magasságú jelet adó koncentráció.

$$LOD = \frac{3 \cdot s_{vak}}{S}$$

s_{vak} a vak mintával mért jel szórása

S pedig az érzékenység

A meghatározási határ az a legkisebb koncentráció, mely még megfelelő precizitással és helyességgel meghatározható.

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_{vak}}{S}$$

s_{vak} a vak mintával mért jel szórása

2.3.5. Helyességi/visszanyerési vizsgálat

Ez a vizsgálat azért szükséges, hogy megmutassuk, az adott módszer a vizsgált minta összes komponensének pontos mennyiségi meghatározását lehetővé teszi.

2.3.6. Precizitás

Azt, hogy a készülék megfelelően, precízen működik ugyanazon mintaoldat injektálásának és elemzésének többszöri megismétlésével lehet igazolni.

2.3.7. A módszer reprodukálhatósága

A módszer reprodukálhatósága azt mutatja meg, hogy az adott módszer valóban alkalmazható-e különböző alkalmakkor és különböző körülmények között.

2.3.8. A módszer zavartűrése

A vizsgálat célja, hogy megmutassa, hogy az adott módszer hogyan viseli a kisebb változásokat a működés körülményeiben.

2.3.9. Oldatstabilitás

Ennek megállapítása azért fontos, hogy megtudjuk a minta-, standard- és reagensoldatok meddig tarthatók el. Az eltarthatóság megszabja a tárolás körülményeit. Az eltarthatóság meghatározása pedig ahhoz fontos, hogy igazoljuk, a minta és a standard nem bomlik el, míg az elemzés meg nem történik.

2.3.10. Pontosság/ismételhetőség

Kifejezi, hogy egy adott anyagból az analitikai eljárás többszöri megismétlése során a mérési eredmények mennyire egyeznek meg. Két fajtája az ismételhetőség és a reprodukálhatóság. Előbbi esetben azonos módszer és körülmények között végezzük a mérést, míg utóbbi esetben azonos módszerrel, de különböző körülmények között végezzük a mérést. ^[8]

2.4. Összes polifenol tartalom meghatározás elve

Az összes polifenol tartalom meghatározását Folin-Ciocalteu reagenssel végeztem. Elve, hogy a hatos oxidációs számú molibdént (sárga) az antioxidánsból származó elektron molibdén ötös (kék) oxidációs állapotúvá redukálja. A reakció során keletkező kék színű vegyület mennyisége fotometriásan meghatározható $\lambda=760$ nm-en. Az alkalmazott hullámhosszon egyéb interferáló komponensek fényelnyelése elhanyagolható. A teljes kémiai háttér nem ismert. Nem szelektív a polifenolos komponensekre, független a szerkezetüktől. ^[9]

3. Anyag és módszer

3.1. Felhasznált oldószerek, vegyszerek

- katechin ((±) Sigma, C1788-1G, Pcode:101008142, CAS:7295-85-4)
- epikatechin (Fluka, Biochemica, EC No. 2077101)
- ecetsav (Scharlau, CAS No. 64-19-7, UN2789, víztartalom max. 0,2 %, sűrűség: 1,05 g/ml)
- metanol (Scharlau, gyártási szám: 93152, Ref.: ME03062500, víztartalom: 0,02 %, sűrűség: 0,79g/ml)
- EDTA (Acidum – 2, MSZ: KGST 393.76)
- aszkorbinsav (L(+), Acidum-2, gyártási szám: 01051005, Tisztaság: > 99,7 %)
- acetonitril (Scharlau, Product: 20060.320, EC Label: 200 – 8352, gyártási szám: 09Z5142, víztartalom: max. 0,02 %, sűrűség: 0,786 kg/l)
- eluens A (acetonitrilre nézve 9%-os, ecetsavra nézve 2%-os, EDTA-ra nézve 20 µg/ml koncentrációjú 0,45µm-es szűrőn szűrt oldat)
- eluens B (acetonitrilre nézve 80%-os, ecetsavra nézve 2%-os, EDTA-ra nézve 20 µg/ml koncentrációjú 0,45µm-es szűrőn szűrt oldat)
- koffein (AnalaR NORMAPUR, CAS: 58-08-2, EC label: 200 – 362 - 1)
- galluszsav (Sigma, G7384, Tisztaság: 97,5 – 102,5 %,)

3.2. A mérések során használt készülékek

- HPLC:
 - termosztát: T-6300 column thermostat (Merck)
 - pumpa: Merck Hitachi L-6200 Intelligent pump
 - detektor: Merck Hitachi : L-4250 UV-VIS detector
 - integrátor: Merck Hitachi : D - 2500 deromato – integrator
 - kolonna: Sigma aldrich , Waters Spherisorb Phenyl 5µm, 4,6 mm × 250mm, cat. No. Z226106, SN 96070516



7.ábra. A HPLC-s műszer

- centrifuga: Sigma 3K30, rotorszám: 19777
- fotométer: Perkin Elmer, Lambda 25 UV/Vis Spectrometer

3.3. Mintaelőkészítés

3.3.1. Galluszsav, catechin, epikatechin és koffein meghatározáshoz

A teafüvekből elporítás után 0,2 g körül ($\pm 0,001$ g) mértem ki pontosan. Hozzá metanol:víz elegyből 5ml-t adtam hozzá, majd megkevertettem és 70 °C –os vízfürdőbe tettem 10 percig. Az 5. és 10. percben ismét kevertettem. Lehűlés után 3500 fordulat/perc sebességgel centrifugáltam 10 percig. Az így kapott elegy felülúszóját 10 ml-re jelre töltöttem metanol-víz elegyével. Ebből 1 ml-t 6 ml-re hígítottam stabilizáló oldattal. A stabilizáló oldat acetonitrilre 10 %-os, EDTA-ra illetve aszkorbinsavra nézve pedig 500 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú oldat. Az így kapott oldatokat 0,45 μm -es szűrőn leszűrtem. ^[10]

3.3.2. Összes polifenol tartalom meghatározásához

A mintát az előzőekhez hasonlóan készítettem elő azzal a változtatással, hogy stabilizáló oldat helyett metanol – víz elegyével hígítottam. Továbbá az így kapott oldat 0,5 ml-éhez 2,5 ml Folin-Ciocalteu reagenst adtam, majd 5 perc elteltével további 2 ml 75 g/l töménységű Na_2CO_3 oldatot adtam. Az így készített oldatot két órán át szobahőmérsékleten inkubáltam.

3.4. Minőségi azonosítás a nagynyomású folyadékkromatográfiában

Az elsődleges minőségi azonosítás a retenciós idő alapján történik. A kromatográfiás paraméterek megfelelő változtatásával el kell érni, hogy minden komponens jól elváljon, illetve lehetőség szerint ideális alakú (gauss görbe) csúcsként legyen detektálható.

Habár az elkészített standard oldatok komponensei lehetőség szerint jól elválnak, a tea minták sok olyan egyéb általam nem vizsgált komponenset (mátrix) tartalmaznak, melyeknek nem tudjuk a minőségét. Ezért meg kellett bizonyosodni a mintában az általam vizsgált komponensek csúcsainak ténylegességéről. A mintához adott mennyiségű adott törzsoldatot adtam, majd lemértem. Az lesz az általam vizsgált komponens csúcsa az adott mintában, melynek területe annival növekedett amennyivel az általam hozzáadott koncentrációjú törzsoldat járult hozzá.

3.5. Mennyiségi azonosítás

3.5.1. Galluszsav, katechin, epikatechin és koffein meghatározás a nagynyomású folyadékkromatográfiával

A meghatározáshoz külső standard módszert alkalmaztam. A minta ismeretlen mennyisége az ismeretlen mintára és a referencia oldatokra kapott eredmények összehasonlítása alapján számolható ki. A standard oldatokat olyan koncentrációban kell elemezni, hogy a kapott jelek a detektor lineáris tartományán belül legyenek. A standard oldatok vizsgálatát követően a mintát injektáljuk. A megfelelő csúcsok területének meghatározását úgy végezzük, hogy a csúcsterületeket a koncentráció függvényében ábrázolva ideális esetben egy egyenest kapunk, melyből a minta ismeretlen koncentrációja könnyen meghatározható. Mivel a külső standard módszernél az egymást követő elemzések csúcsterületeit hasonlítjuk össze, pontos és nagyon jól reprodukálható mintabevitelre van szükség.^[11]

A galluszsav, katechin, epikatechin, koffein törzsoldatokból három kevert standard oldatot készítettem.

	Nominális koncentrációk µg/ml		
	A	B	C
galluszsav	5	10	25
koffein	50	100	150
katechin	50	100	150
epikatechin	50	100	150

2.táblázat. A kevert standardok nominális koncentrációi

3.5.1.1. Mérési körülmények

- Mérési hőmérséklet: $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ Fontos a kolonna termosztálása, mert ha változik a hőmérséklet változik a folyadék viszkozitása. Ha növeljük a hőmérsékletet, a viszkozitás csökken. A belépő mozgófázisnak pedig ugyanolyan hőmérsékletűnek kell lennie, mint a kolonnán mért hőmérséklet.

- Detektálási hullámhossz: 278 nm

- Áramlási sebesség: 1 ml/perc

- Mintahurok térfogata: 20 µl

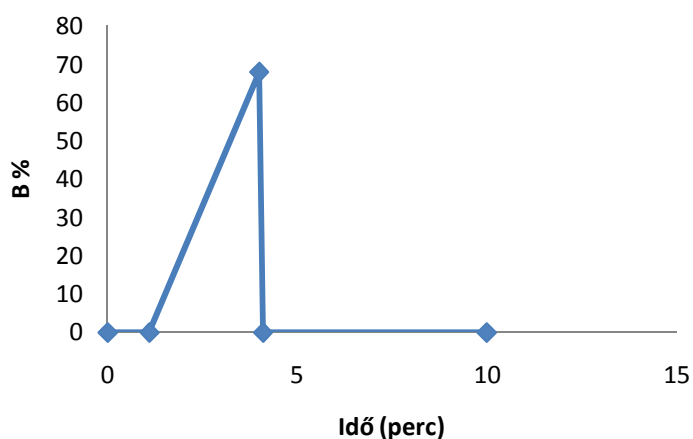
- Kolonna: Olyan fordított fázisú kolonnát használtam, mely fenil –hexil végcsoportot tartalmaz, melynek segítségével, nagy szelektivitással választhatók el az aromás gyűrűt tartalmazó vegyületek.

- Kézi injektálás: A mérés során a mintát kézzel injektáltam az oszlopra. Ezért, a mérés reprodukálhatósága miatt fontos odafigyelést igényel ez a lépés.

A mintából Hamilton fecskendő segítségével úgy kell felszívni, hogy abban ne legyen buborék. Ez több okból is fontos. Egyrészt megváltoztatja az eluens áramlási sebességét, másrészt a bekerülő buborék oxigén tartalma reagálhat a mintában levő komponensekkel, az eluenssel és még a töltettel is. Harmadrészt pedig a detektorba kerülve hamis eredményt adhat. A minta helyes felszívása után, azt a 20 µl-es hurokba kell juttatni, azzal jól át kell öblíteni. Majd a mintainjektáló kart a "load" állásból az "inject" állásba határozott mozdulattal át kell állítani. Ezáltal a dugattyúszerű mintabevitel megvalósul, ami az elúciós

folyamat egyik előfeltétele. A mintaadagolásnál lehetőleg a legkisebb térfogatban kell az elválasztandó komponenseket a kolonnára juttatni.

- gradiens: gradiens elúciót alkalmaztam az antioxidánsok és a koffein elválasztására.^[11] Ennek során két vagy több különböző polaritású eluens keverékével folyamatosan változtatjuk az eluens erősségét.



8.ábra. Az alkalmazott gradiens

A mérések során kis viszkozitású illetve kis hullámhosszon elnyelő oldószerkelegyeket alkalmaztam. Az "A" eluens polárosabb a "B" eluensnél, ezért annak mennyiségét csökkentve a kolonnán csökkentjük a mozgófázis polaritását az apoláris állófázison. Ez által a különböző mértékben apoláros komponensek szelektívebben el tudnak válni egymástól a kolonnán.

3.5.2. *Összes polifenol tartalom meghatározása*

Az összpolicfenol tartalom meghatározásához is külső standard módszert alkalmaztam. A kalibráló sorozathoz 0; 5; 10; 20; 50; 100 mg/l koncentrációjú galluszsav standard oldatokat használtam. Az összfenolos vegyületek mennyiségének kifejezésére használt dimenzió a mg GAE vagyis a galluszsav ekvivalens/100 g minta.

Az előkészített oldat abszorbanciáját 760 nm-es hullámhosszra állított fotométerrel mértem metanol : desztillált víz (70:30) vakoldattal szemben.

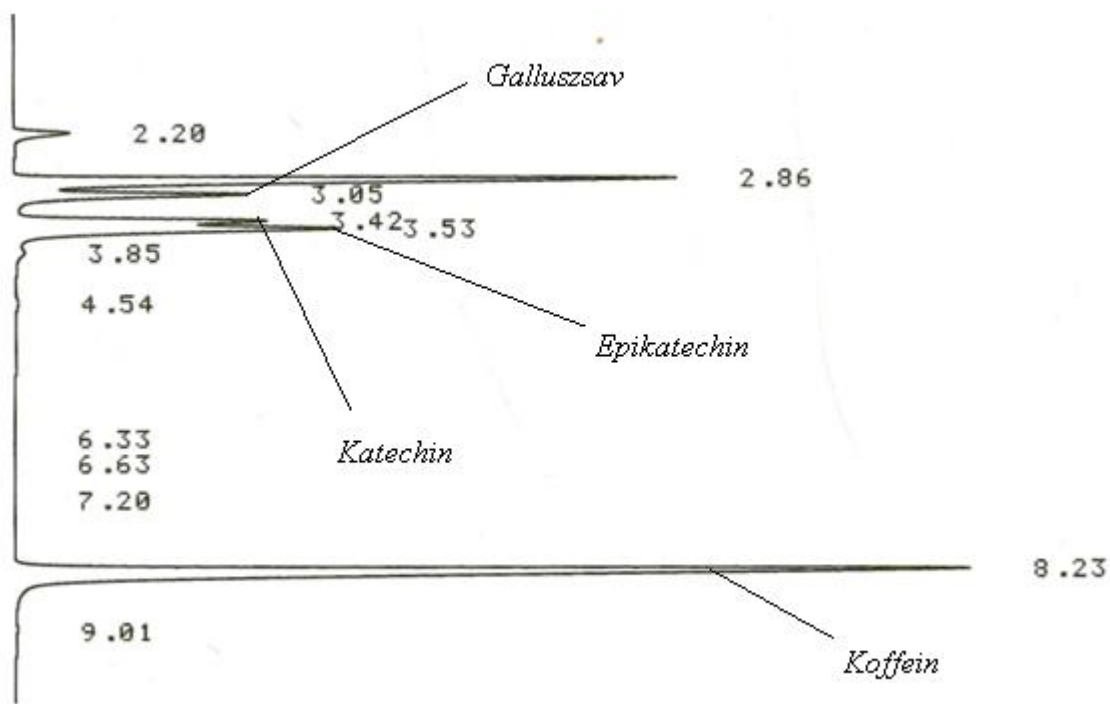
4. Eredmények és kiértékelésük

Fontosnak tartom a kolonna kondicionálását, illetve az előző mérésekből esetlegesen származó kolonnán maradt komponensektől való megtisztítását, ezért azt metanol:víz 1:1 arányú keverékével a mérés megkezdés előtt és után átmostam. Ez azért fontos, mert nem szabad a kolonnát savas közegben hagyni napokig, mivel az tönkretelheti az állófázist illetve azért, hogy reprezentatív legyen a mérés.

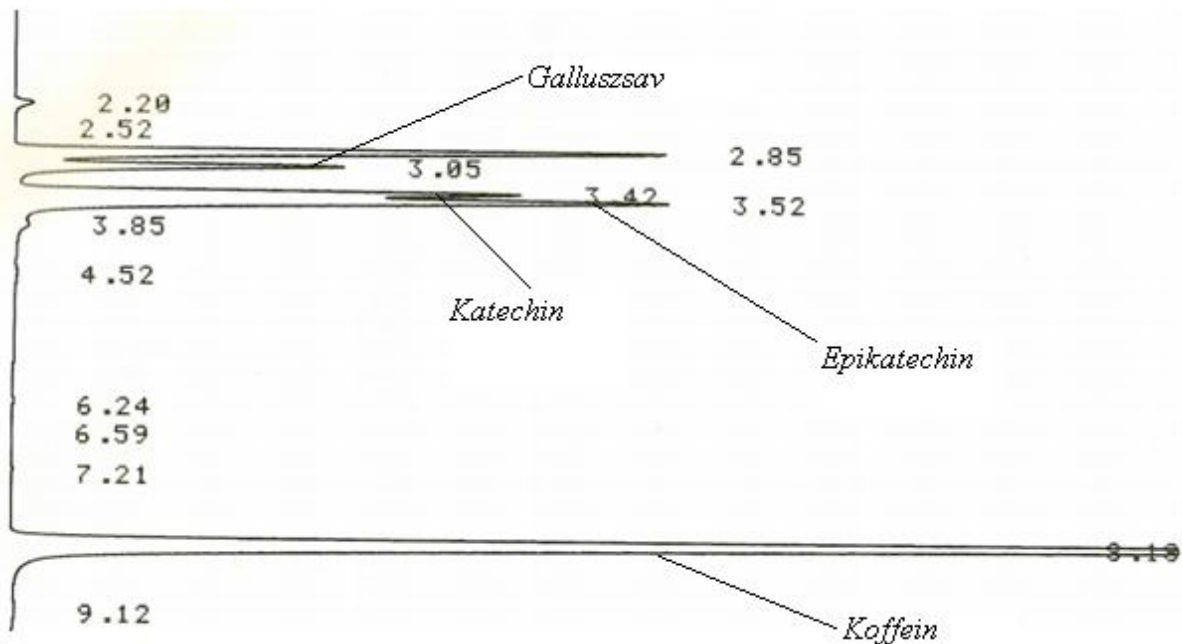
4.1. A kevert standardok vizsgálata

A kevert standardok komponenseinek elválasztásakor az elúciós sorrend az alábbiak bizonyult: galluszsav, katechin, epikatechin, koffein. Vagyis a galluszsav bizonyult a legkevésbé apolárisnak, míg a koffein pedig a leg apolárisabbnak a vizsgálandó komponensek közül.

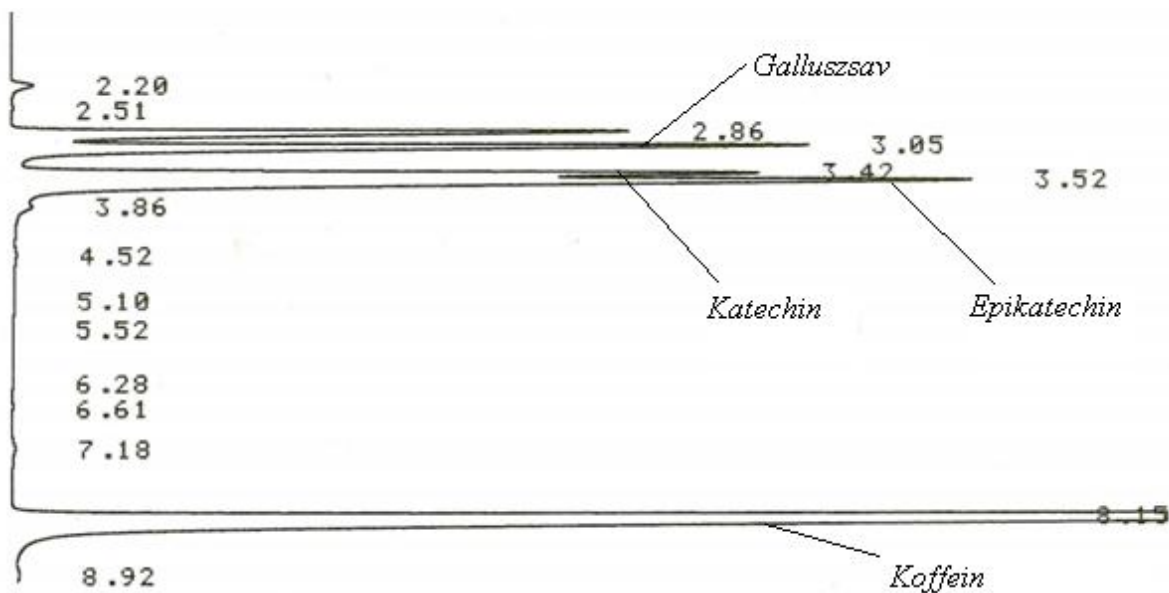
A fordított fázisú kromatográfiában a mozgó fázis polaritása nagyobb, ezért az oszlopot elsőként a legpolárisabb komponens hagyja el.



9. ábra. Az "A" kevert standard kromatogramja



10.ábra. A „B” kevert standard kromatogramja



11.ábra. A „C” kevert standard kromatogramja

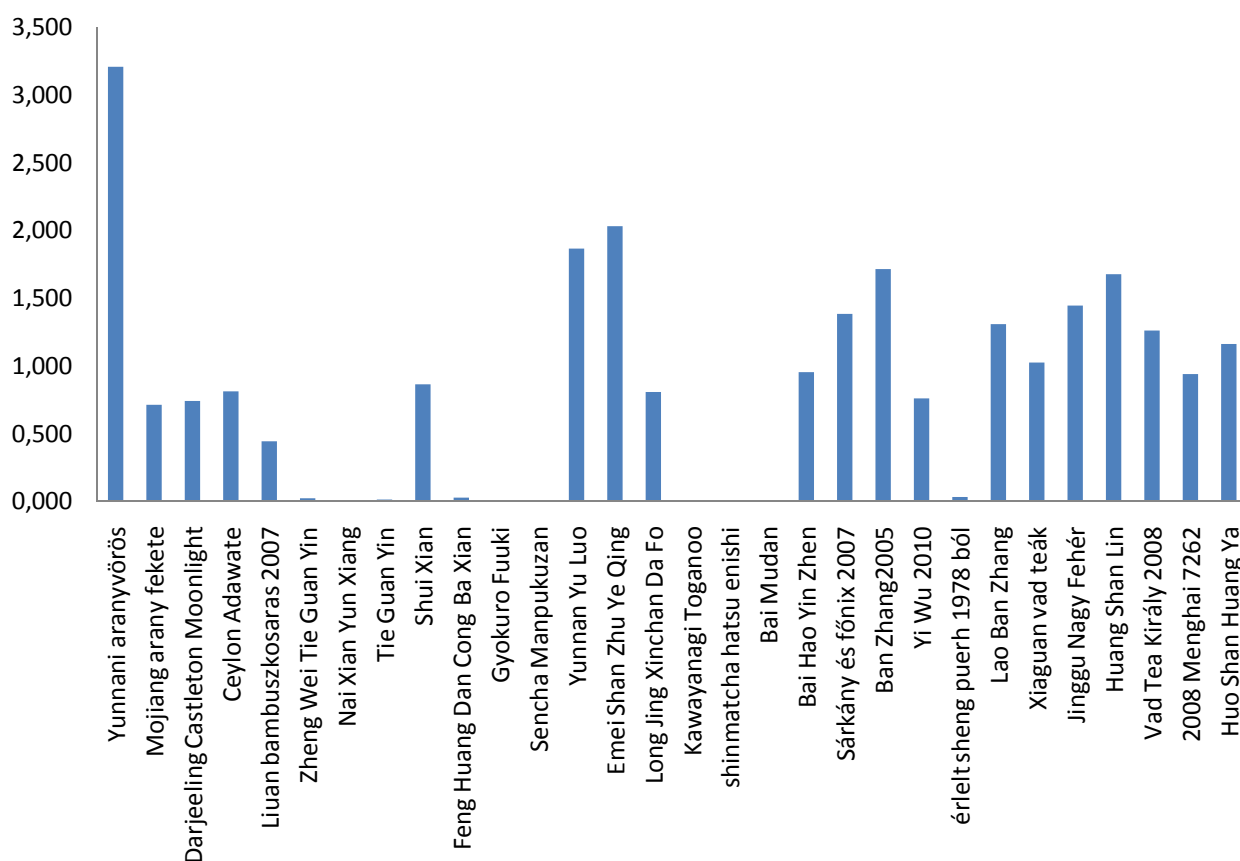
A kromatogramokon kapott csúcsok beazonosítását egyedi standardok segítségével végeztem. A csúcsok az alábbi percben kifejezett retenciós idejű komponenseknek felelnek meg: 3,05 – galluszsav; 3,42 – katechin; 3,52-epikatechin; ~8,15 pedig a koffein csúcsa. A katechin és epikatechin olyan vegyületek melyek egymásnak izomerjei, ezért őket egymástól szelektíven elválasztani az általam használt kolonnával nem lehetséges. Mindegyik kromatogramon megjelenik a 2,20 és 2,86 retenciós idejű csúcs, melyek a stabilizáló oldatban

levő (rendre) EDTA és aszkorbinsav csúcsának felelnek meg. Megjelenésüknek az oka, hogy mindkét komponensnek van elnyelése az általam alkalmazott hullámhosszon (278 nm).

4.2. Tea minták vizsgálata

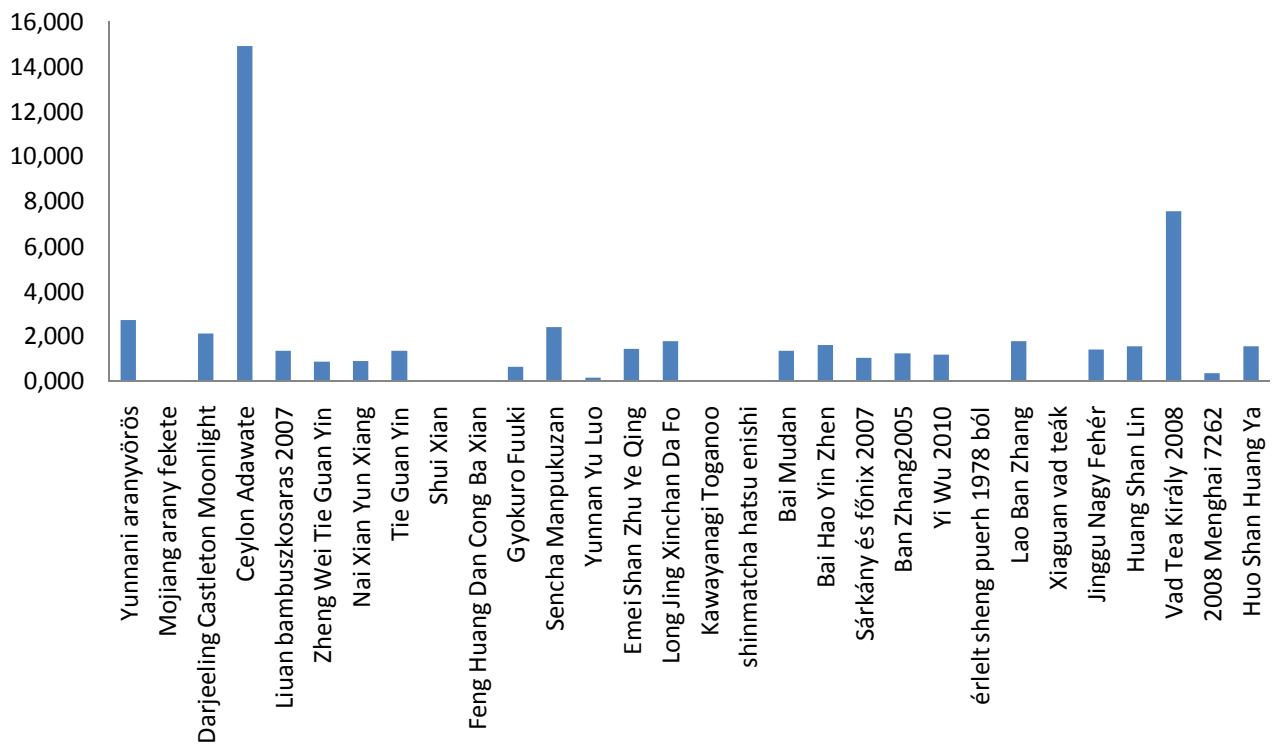
4.2.1. Galluszsav, catechin, epikatechin és koffein meghatározása

Az előkészített tea főzeteket a standardokkal azonos körülmények között mérve az alábbi eredményeket kaptam.



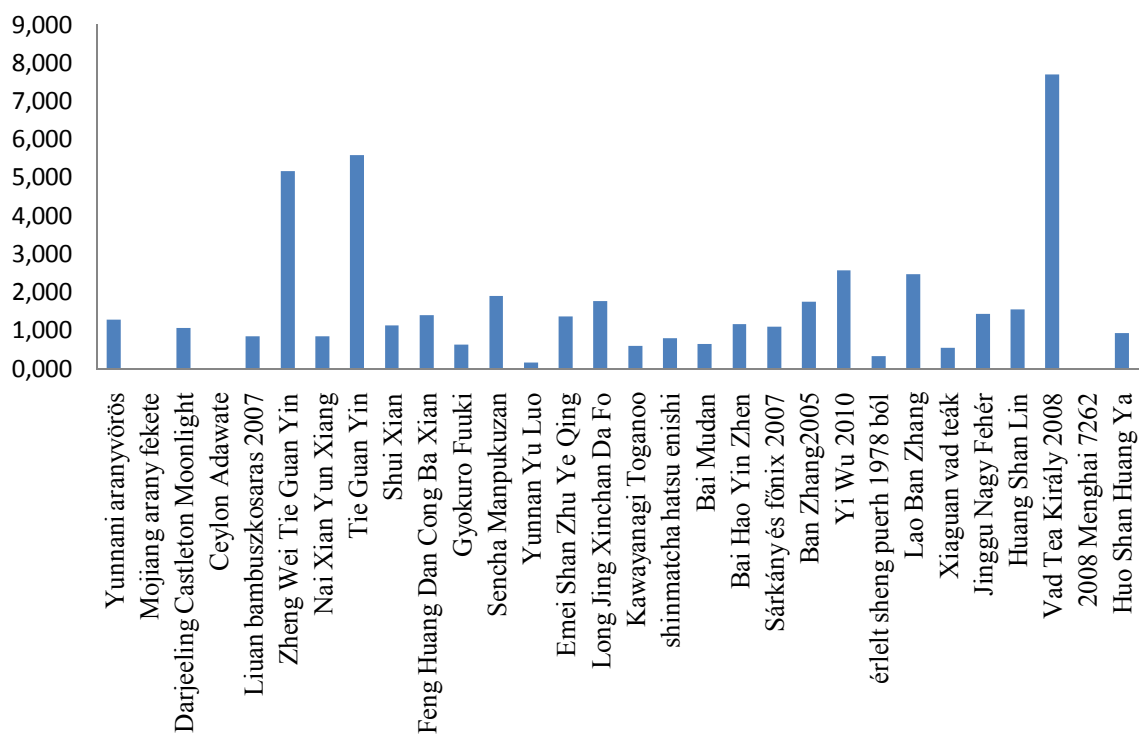
12.ábra. Galluszsav tartalom a teamintákban

A vizsgált tea főzetek galluszsav tartalma, ahogy a grafikonon is látható rendkívül változó. A, Nai Xian Yun Xiang, Tie Guan Yin, Gyokuro Fuuki, Sencha Manpukuzan, Kawayanagi Toganoo, shinmatcha hatsu enishi, Bai Mudan nevű teaminták galluszsavat nem tartalmaznak, vagyis a mennyiségük a meghatározási határ alatt van. Jól látható, hogy a galluszsav tartalom a Yunnani aranyvörös nevű tea esetében a legnagyobb.



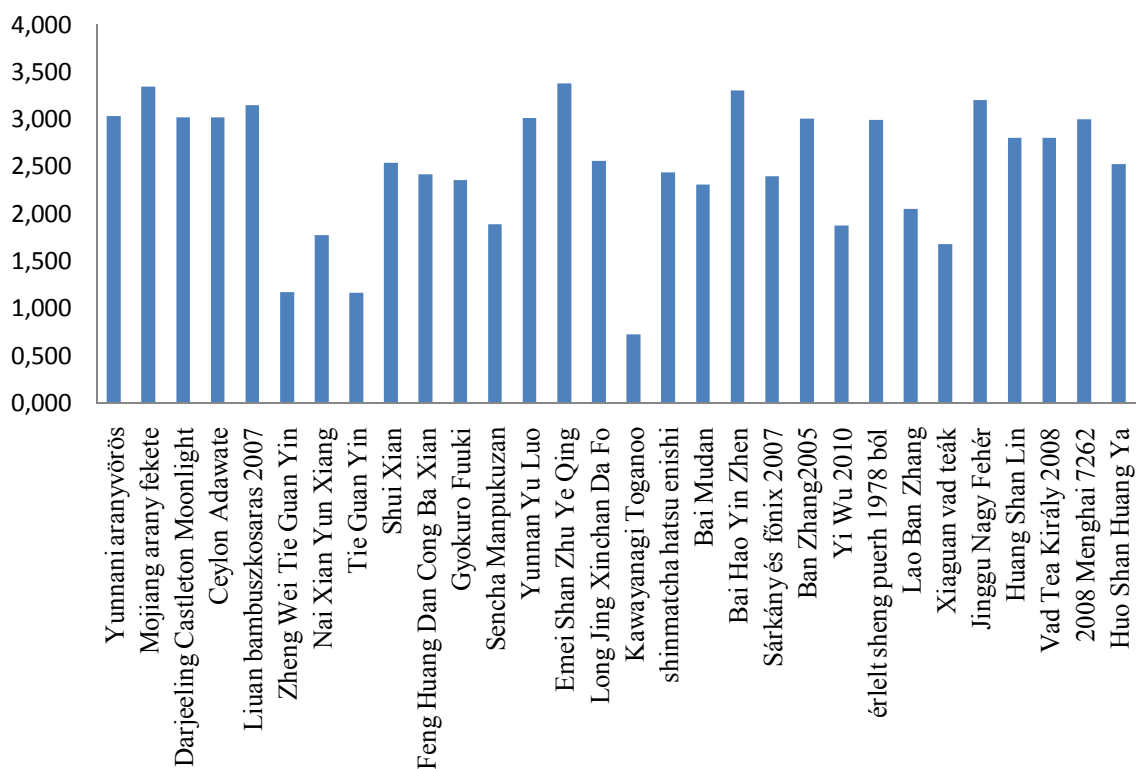
13. ábra. Katechin tartalom a teamintákban, g/100g minta

A diagramm alapján a minták a Ceylon Adawate és a Vad tea király nevű minták kivételével nem túl sok katechint tartalmaznak. A Mojiang arany fekete, Shui Xian, Kawayanagi Toganoo, shinmatcha hatsu enishi, érelt sheng puerh, Xiaguan vad tea nevű minták katechin tartalma a meghatározási határ alatt van.



14.ábra. Epikatechin tartalom a teamintákban, g/100g minta

Az epikatechin tartalom a Zheng Wei Tie Guan Yin, Tie Guan Yin és a Vad tea király nevű minták esetében a legjelentősebbek. A Mojiang arany fekete, Ceylon Adawate, és a 2008 Menghai nevű teák esetében az epikatechin tartalom am eghatározási határ alatt volt.



15. ábra. Koffein tartalom a teámintákban, g/100g minta

Az általam vizsgált teákról elmondható, hogy típustól függetlenül mindegyik tartalmazott kisebb – nagyobb mennyiségben koffeint. Alapvetően a legmagasabb koffeint tartalmazó teáknak a Yunnani aranyvörös, a Mojiang arany fekete, Darjeeling Castleton Moonlight, Ceylon Adawate teák, vagyis a fekete teák bizonyultak. Legkevesebb koffein tartalommal pedig a Zheng Wei Tie Guan Yin, Tie Guan Yin nevű oolong teák illetve a Kawayanagi Toganoo nevű zöld tea rendelkezik.

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a *fekete teák* koffein tartalmára - mint ahogy az várható is volt - magas értékeket kaptam a többi vizsgált komponenshez képest. Értékük közel azonos volt. Galluszsav katechin és epikatechin tartalmuk kicsi kivéve a 'Yunnani aranyvörös' galluszsav illetve a 'Ceylon Adawate' katechin tartalmát melyek kiugróan magasak voltak.

Az *oolong teák* esetében mind alacsony galluszsav illetve koffein tartalmú kivéve a 'Shui Xian' tea, mely kis mennyiségben, de tartalmaz galluszsavat. Katechin tartalmuk alacsony,

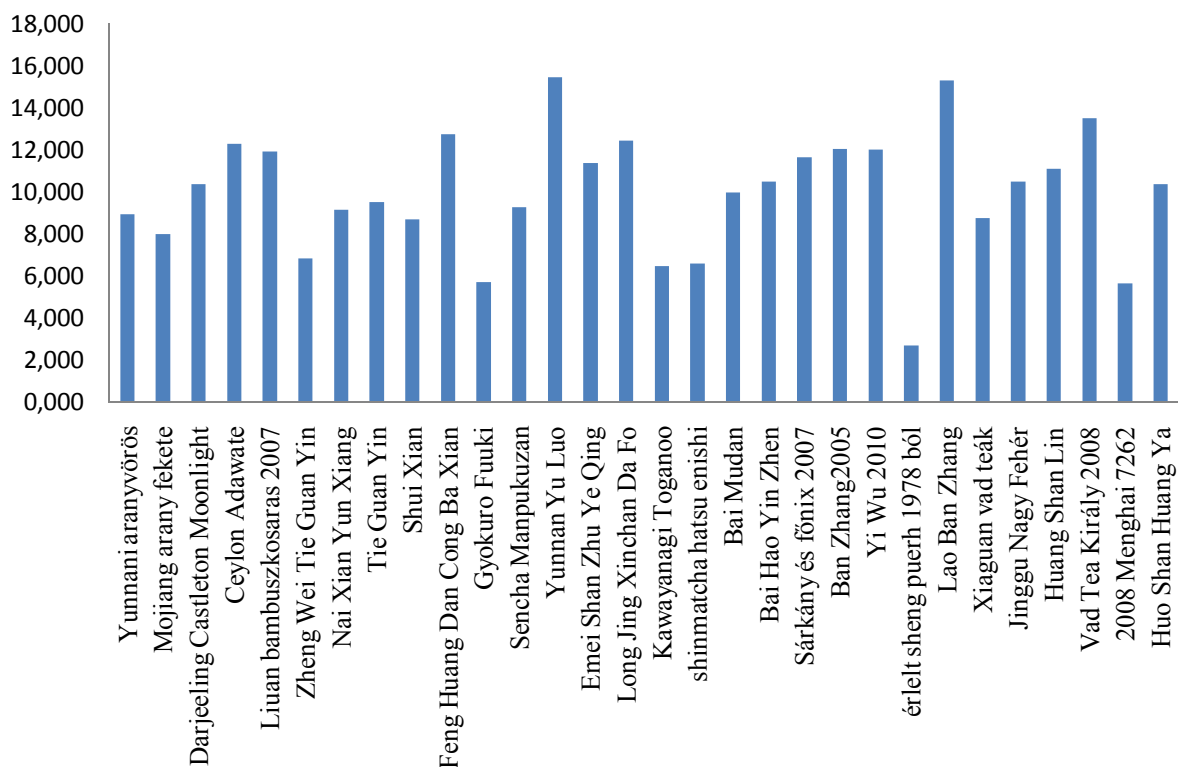
epikatechin mennyiségük csak a 'Zheng Wei Tie Guan Yin' és 'Tie Guan Yin' nevű tea mintákban jelennek meg.

A *zöld teák* koffein tartalma van, hogy megközelíti a fekete teákét. Katechin illetve epikatechin mennyiségük alacsony. Galluszsav tartalmuk inkább a 'Yunnan Yu Luo' és a 'Emei Shan Zhu Ye Qing' nevű tea mintákban jellemző.

A fehér teák koffein tartalma is szintén magas, galluszsav tartalmuk alacsony és katechin illetve epikatechin tartalomban sem gazdagok.

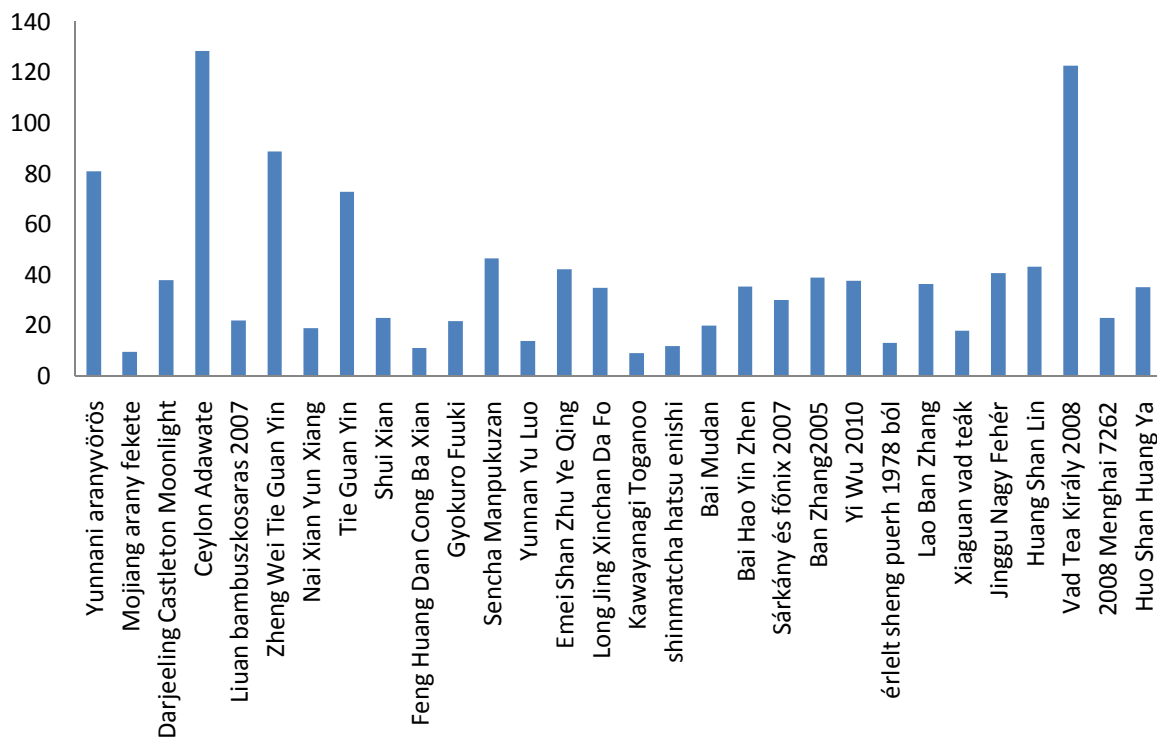
A *puerh teák* koffein tartalma változó, de legtöbb a 'Jinggu Nagy Fehér' nevű teában van. Katechin és epikatechin tartalmuk a 'Vad tea király 2008' nevű tea kivételével alacsonynak mondható. Galluszsav tartalmuk a többi tea fajtához képest viszonylag magas.

4.2.2. Összes polifenol tartalom meghatározása



16.ábra. Összes polifenol tartalom a teamintákban, g/100g minta

A grafikonon látható, hogy ezek a kínai és japán teák alapvetően is rengeteg antioxidánst tartalmaznak. Kivétel az érlelt sheng puerh nevű tea minta, ami valószínűleg abból fakad, hogy nagyon régi a tea minta. A Yunnan Yu Luo, Lao Ban Zhang nevű minták tartalmazzák a legtöbb antioxidánst.



17.ábra. Az általam vizsgált antioxidánsok százalékos mennyisége az összes antioxidáns mennyiségéhez képest

A grafikonon jól látható, hogy ezek a teák még számos általam nem vizsgált antioxidánst tartalmaznak. Azon minták esetében melyeknél ez az érték meghaladja a 100%-ot az annak az oka, hogy a katechin és az epikatechin egymástól való elválasztása a kolonnán nem volt szelektív, a csúcsok nem váltak el teljesen egymástól, ezért azok pontos mennyisége eltérhet.

4.3. Validálás

Munkám során az alábbi teljesítményjellemzőket határoztam meg:

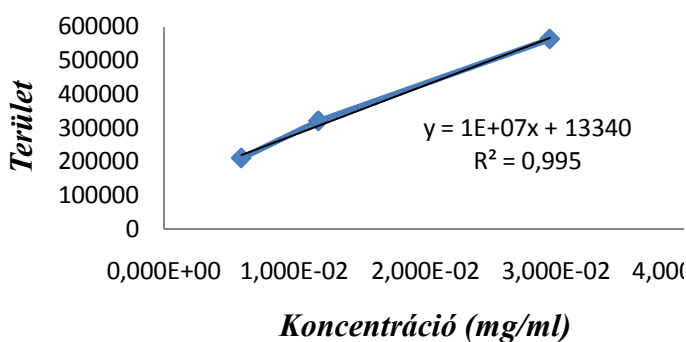
4.3.1. Szelektivitás, specifitás

A standard oldatok vizsgálandó komponensei a katechin és epikatechin kivételével jól elválnak egymástól. Ezért a módszer galluszsavra és koffeinre nézve szelektívnek tekinthető. A tea minták esetében, a szelektivitás hasonló módon áll fenn. Mivel más anyagok is jelen lehetnek a mintában a vizsgálandó komponensek mellett, amelyek zavaró tényezők lehetnek, ezért a módszer nem specifikus. Egy módszer akkor validált, ha specifikusnak tekinthető.

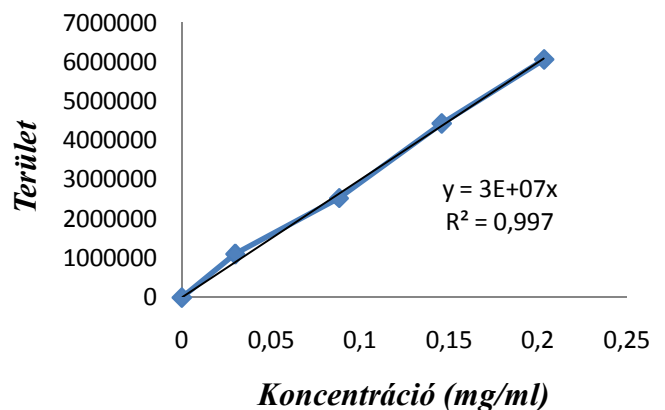
4.3.2. Linearitás

Linearitás vizsgálathoz négy törzsoldatból készítettem három kevert standard oldatot.

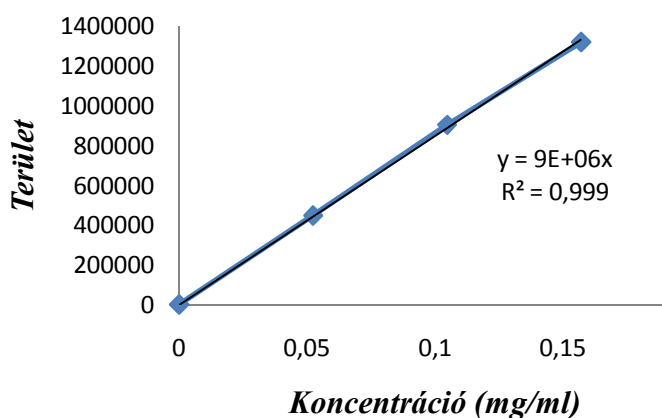
Galluszsav linearitási görbe I



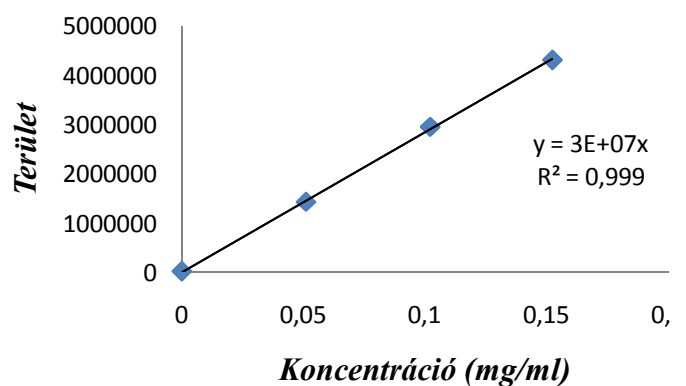
Galluszsav linearitási görbe II

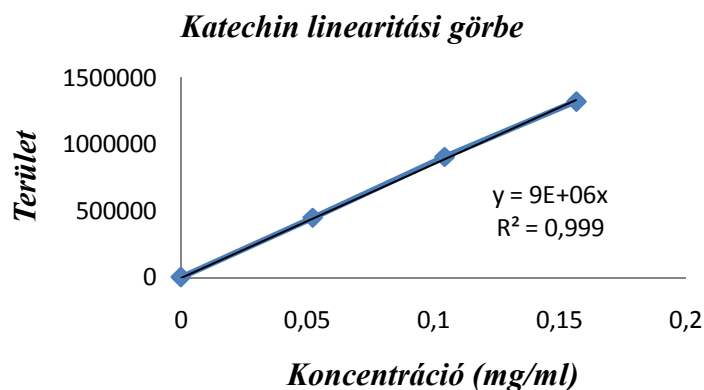


Epikatechin linearitási görbe



Koffein linearitási görbe





18.ábra. A vizsgált komponensek linearitás görbéi

Látható, hogy a görbék a kívánt tartományban linearitást mutatnak. Illetve a korrelációs koefficiens, vagyis az R^2 0,990 fölötti értékűnek bizonyult, ami megfelel az elvárásnak.

A galluszsav esetében készíteni kellett még egy kalibráló oldatsorozatot, mert a mintákban levő koncentrációk meghaladták a kalibráló egyenes legmagasabb pontjához tartozó koncentrációt. A tartomány itt is linearitást mutat.

4.3.3.Érzékenység

Az érzékenység az analitikai mérőgörbe meredeksége, melyek az általam vizsgált komponensekre a következők:

Galluszsav:

Az egyenes egyenlete

0-0,03 mg/ml koncentráció tartományig $y = 10^7x + 13340$

$$S = \frac{x-x_1}{c_2-c_1} = 18652078$$

illetve 0,03 – 0,2 mg/ml koncentráció tartományban $y = 3 \cdot 10^7 x$

$$S = \frac{x-x_1}{c_2-c_1} = 28309048$$

Katechin:

Az egyenes egyenlete: $y = 5 \cdot 10^6 x$

$$S = \frac{x-x_1}{c_2-c_1} = 5910442$$

Epikatechin:

Az egyenes egyenlete: $y = 9 \cdot 10^6 x$

$$S = \frac{x-x_1}{c_2-c_1} = 7954009$$

Koffein:

Az egyenes egyenlete: $y = 3 \cdot 10^7 x$

$$S = \frac{x-x_1}{c_2-c_1} = 26982786$$

Látható, hogy a módszer katechinre illetve epikatechinre kevésbé érzékeny, a rájuk kapott értékek egy nagyságrenddel kisebbek, mint a többi komponensnél.

Az x a koncentráció, az y pedig a koncentrációval arányos terület.

Behelyettesítve például, ahhoz, hogy 1 egységnyi területváltozást okozó jelváltozást érjünk el az alábbi koncentrációváltozás szükséges:

	<i>koncentráció változás</i>
	<i>mg/ml-ben</i>
<i>galluszsav</i>	$3,3 \cdot 10^{-8}$
<i>katechin</i>	$2 \cdot 10^{-7}$
<i>epikatechin</i>	$1,1 \cdot 10^{-7}$
<i>koffein</i>	$3,3 \cdot 10^{-8}$

3.táblázat. 1 egységnyi területváltozáshoz szükséges koncentrációváltozás

4.3.4. Precizitás

	<i>galluszsav</i>	<i>katechin</i>	<i>epikatechin</i>	<i>koffein</i>
1	219388	248860	491223	1507290
2	210303	226688	482867	1432858
3	206192	221457	489515	1423766
4	204608	226389	481479	1409572
szórás	6626,72	12244,88	4816,51	43676,42
átlag	210122,75	230848,50	486271	1443372
RSD	3,15	5,30	0,99	3,03

4.táblázat. Az 'A' standard többszöri felszúrásakor kapott adatok

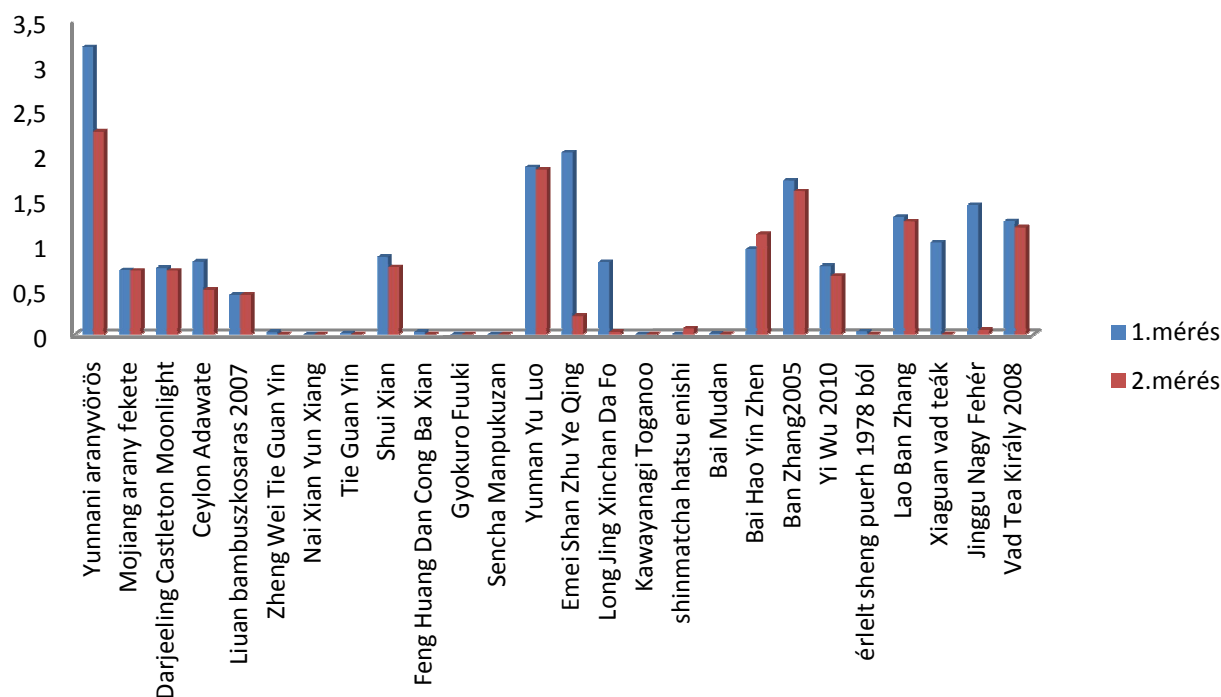
$$RSD = \frac{\text{szórás}}{\text{átlag}}$$

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy mindegyik esetben hasonlóan visszakapom az eredményt. A katechin esetében a legnagyobb az RSD %.

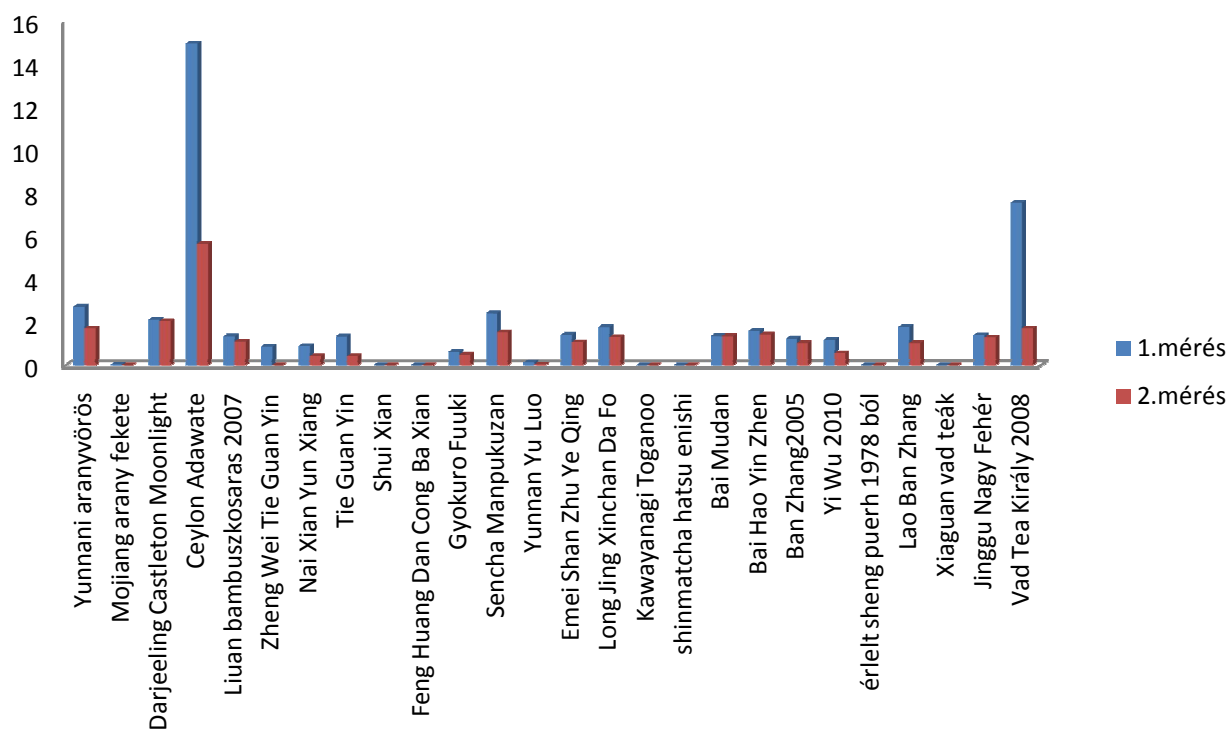
4.3.5. Oldatstabilitás

Munkám során megvizsgáltam a minta oldatok stabilitását 7 napos intervallumban, hűtőben tárolva.

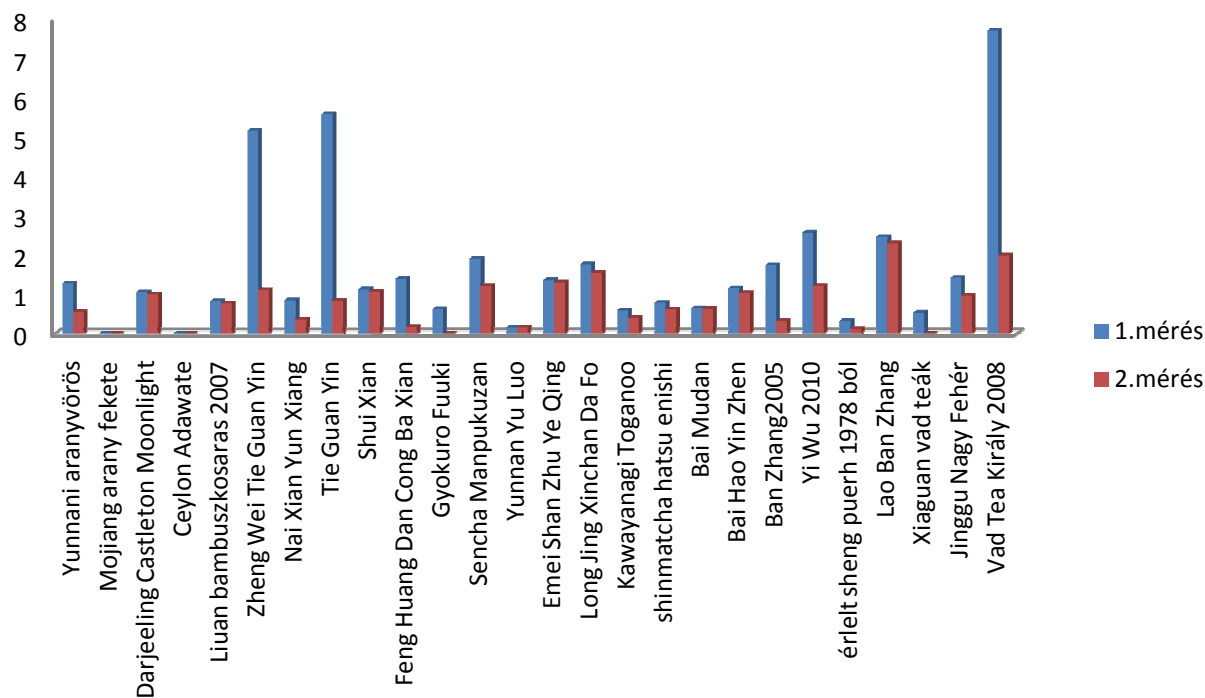
A mintában levő vizsgált komponensek stabilitása függ a tárolás módjától illetve attól, hogy milyen egyéb komponensek (mátrix) lehetnek a mintában, ami gyorsíthatja a bomlást.



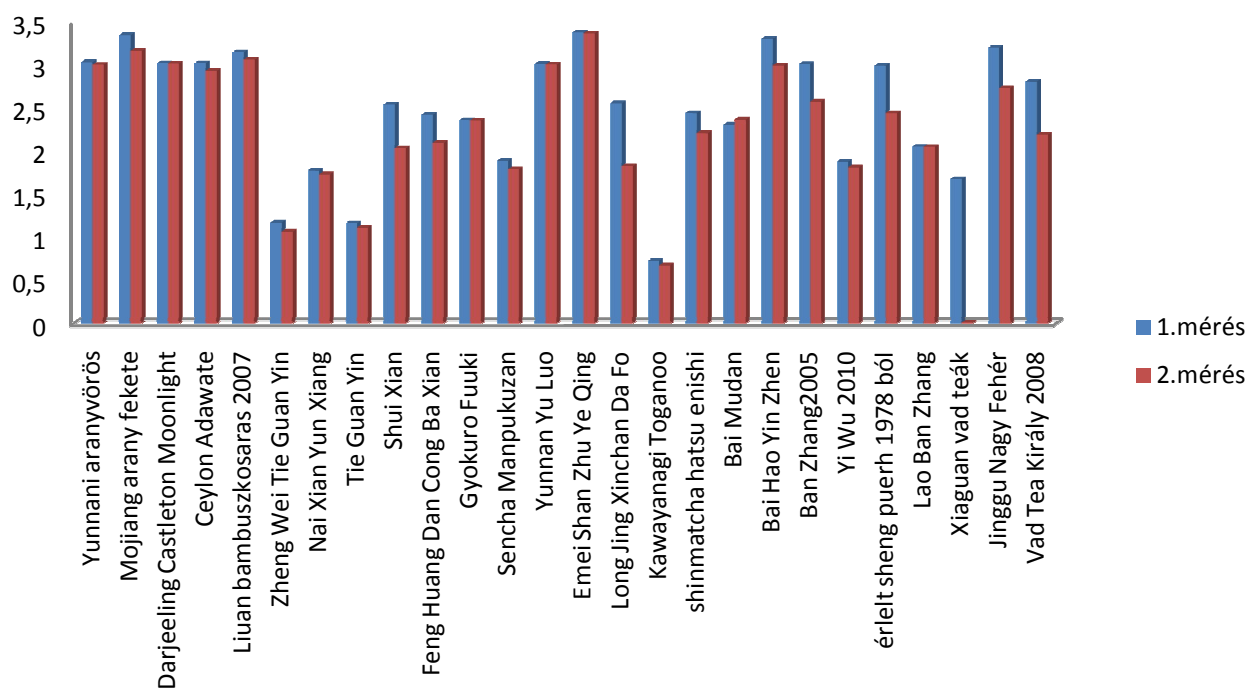
19. ábra. Galluszsav stabilitás vizsgálata tea mintákban, g/100g minta



20. ábra. Katechin stabilitás vizsgálata tea mintákban, g/100g minta



21. ábra. Epikatechin stabilitás vizsgálata tea mintákban, g/100g minta



22. ábra. Koffein stabilitás vizsgálata tea mintákban, g/100g minta

5. Összefoglalás

Munkám során antioxidánsokat és koffeint választottam el tea mintákból nagynyomású folyadékkromatográfia segítségével. Olyan kolonnát alkalmaztam, mely állófázisán fenil- hexil csoportot tartalmaz. Több okból is ezt a kolonnát választottam. Az antioxidánsok poliaromás vegyületek, melyek hidrofób tulajdonságúak, ezért őket mérsékelten hidrofób visszatartású kolonnán lehet elválasztani. Egy másik, C18-as kolonnával is próbáltam az antioxidánsokat elválasztani, de a várt módon azok nagyon kis retenciós idővel és nagyon kis szelektivitással váltak el. Habár a C18 –as állófázisú kolonnák is alkalmasak hidrofób anyagok elválasztására, de jelen esetben a fenil-hexil állófázis bizonyult megfelelőnek. A C18-as állófázishoz képest a fenil – hexil állófázis $\pi - \pi$ kölcsönhatását használjuk ki.^[12]

Annak érdekében, hogy alátámasszam, az alkalmazott detektálási hullámhossz megfelel a komponensek detektálásához, spektrofotométer segítségével felvettem mindegyik komponens spektrumát. Azt tapasztaltam, hogy mindnek maximuma van az alkalmazott hullámhosszon. Illetve annak érdekében, hogy megtudjam, milyen elúciót érdemes alkalmazni az egyik standard oldatot izokratikus elúció segítségével próbáltam elválasztani. Azt tapasztaltam, hogy a csúcsok jelentősen kisebb szelektivitással választhatók el, közelebb vannak egymáshoz a csúcsok illetve kisebb a retenciós idejük is. Több cikkben is a teákban levő antioxidánsok elválasztására gradiens elúciót alkalmaztak.^[13]

Munkám során az alábbi teljesítmény jellemzőit vizsgáltam: specifikusság, szelektivitás, linearitás, érzékenység, pontosság, illetve stabilitás. A módszer katechinre illetve epikatechinre nem szelektív de galluszsavra és koffeinre igen. Mivel a mintákban más olyan anyagok is jelen lehetnek, amelyek mint zavaró tényezőként szerepelnek, ezért a módszer nem specifikus. Linearitás vizsgálat során kiderült, hogy a vizsgált tartományban, mindegyik komponens esetében a kalibráló görbe egyenesnek tekinthető. Illetve a korrelációs koefficiens, vagyis az R^2 0,990 fölöttiértékűnek bizonyult, ami megfelel az elvárásnak. Érzékenység meghatározása során azt tapasztaltam, hogy a katechinre és az epikatechinre egy nagyságrenddel kisebb értéket kaptam, ami magyarázható a két komponens kevésbé sikeres elválasztásával. Pontosság meghatározásnál a különböző komponensekre különböző RSD százalékokat kaptam. Azt, hogy mennyi lehet maximum ez az érték, különbözően adják meg. A lefőzött tea minták antioxidáns stabilitása viszonylag kicsi, hűtőben tartva 7 napig nem bizonyultak stabilnak, hamar elbomlanak az antioxidánsok.

A módszerről alapvetően elmondható, hogy a teában levő antioxidánsok és koffein elválasztására jól alkalmazható. A katechin és epikatechin sztereoizomerek, vagyis azonos az összegképletük, de eltérő a szerkezetük, ugyanis egy hidroxil csoport térállásában különböznek. Ezért ezek szelektív szétválasztására esetlegesen származékképzéssel vagy királis kolonnák alkalmazásával lehetséges.

6. Summary

During my job I separated antioxidants and caffeine in tea samples with high pressure liquid chromatography. The column I used has phenil - hexil groups on its stationary phase.

I chose this column for several reasons. Antioxidants are polyaromatic compounds so their separation can be performed on moderately hidrofobic retention column. I tried an other column, C18 column for separation but as it was expected, the antioxidants separated with short retention time and selectivity. Although C18 columns are sutibales for separation of hidrofobic compounds but phenyl - hexyl stationer phase column proved to be the most appropriate now. The π - π interaction of the phenil hexyl stationer phase has been utilized relative to the C18 stationer phase. In order to confirm the used wavelength was suitable for the determination of antioxidants and caffeine by the high pressure liquid chromathography I took the absorption spectrum of the components by spectrophotometer. I found that all compounds had absorption maximum at the used wavelength.

In order to come to know, which elution to use I first separated components with isocratic elution. In my experiences peaks were significant separated with shorter selectivity, they are much closer and the retention times were shorter too.

Furthermore, I studied the following performance characteristics: specificity, selectivity, linearity, sensitivity, accuracy, stability. The method I have used was selective for gallic acid and caffeine but not for catechin and epicatechin. Because other unknown components in the samples can be confusing factors, therefore the method I used was non-specific.

During linearity test ,it revealed that calibration curves are considered to be linear for all components in the examined range. And correlation coefficient proved to be more than 0,990 for each component. The sensitivity of catechin and epicatechin is smaller an order of magnitude than gallic acid and caffeine. It is because their less successful separation. The tea decoctions' antioxidant stability was relatively small. Antioxidants proved to be unstable, keeping them in fridge untill seven days their decomposition is fast.

It basically can said that, the method I used for the separation of tea antioxidants and caffeine is applicable. Catechin and epicatechin are stereoisomers so they have the same molecular formula but different structures. They differ the spacing of one hidroxyl group. Therefore their separation can be made by derivatization or using chiral columns.

7.Irodalomjegyzék

[1] Rob Alcraft: Teák, Illia Kiadó, (2008)

[2] Dr Kiss Mariann: Teakalauz, HVG Kiadói Rt., (2007)

[3] <http://www.teautja.hu/a-tea-kemiaja>

[4] Dr. Fekete Jenő: A folyadékkromatográfia elmélete és gyakorlata, Edison House Kft., Dabas, (2007)

[5]Dr. Fekete Jenő: A folyadékkromatográfia fejlesztési irányai, Merck Kft, (2008)

[6] <http://ttk.pte.hu/analitika/letoltesek/jegyzet/ch07s03.html>

[7] Borda Jenő: Műszeres analitika: jegyzet a Debreceni Egyetem és a TEVA Gyógyszergyár Zrt. szervezésében indított tanfolyamhoz, Kémiai intézet Debreceni Egyetem,(2010)

[8] Gáspár Attila: Elválasztási módszerek validálása gyakorlati jegyzet

[9] Balogh Emőke: Antioxidáns kapacitás meghatározása és ennek szerepet játszó vegyületek vizsgálata bogós gyümölcsök esetében, Doktori értekezés, Budapest, (2010)

[10] Janna Erickson: Determination of the concentration of caffeine, theobromine, and gallic acid in commercial tea samples, Concordia College Journal of Analytical Chemistry 2 (2011)

[11] Dr. Gáspár Attila: Elektroferogramok/kromatogramok kiértékelése jegyzet

[12] <http://www2.shimadzu.com/applications/LC/C190-E155.pdf>

[13] Santosh Khokhar, Dini venema, Peter C.H. Hollman, Matthijs Dekker, Wim Jongen: A RP-HPLC method for the determination of tea catechins, Elsevier, (1997)

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, *Borbélyné dr Varga Mária* egyetemi docensnek, hogy lehetővé tette, hogy méréseim az Debreceni Egyetem Agrár és Gazdálkodástudományi Centrumban végezhettem el.

Szeretném megköszönni *Szilágyi Szilárd* egyetemi konzulensnek, hogy munkámat irányította és rengeteg szakmai segítséggel és tanáccsal látott el.

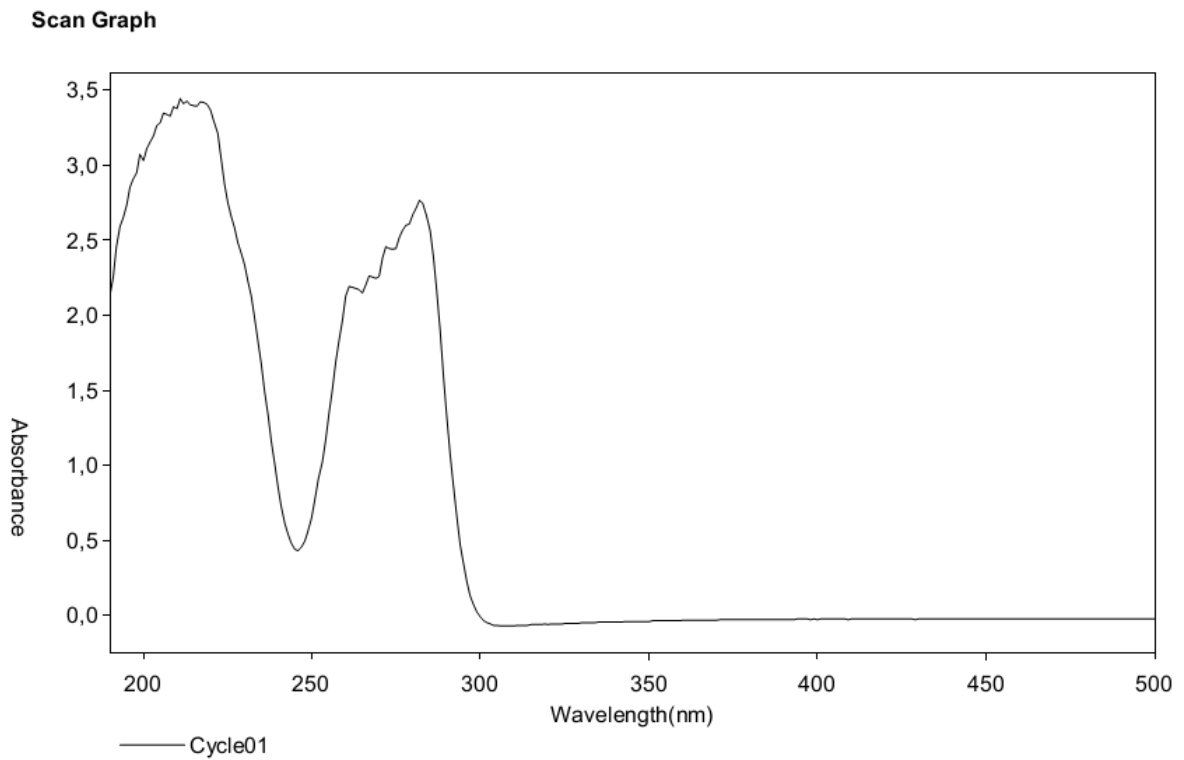
Továbbá, köszönetet mondok *Andrási Dávidnak*, a standardok elnyelési spektrumának felvétele során nyújtott segítségével.

Köszönet *Pákozdy Hajnalkának* a polifenol tartalom meghatározásában nyújtott összes segítségével.

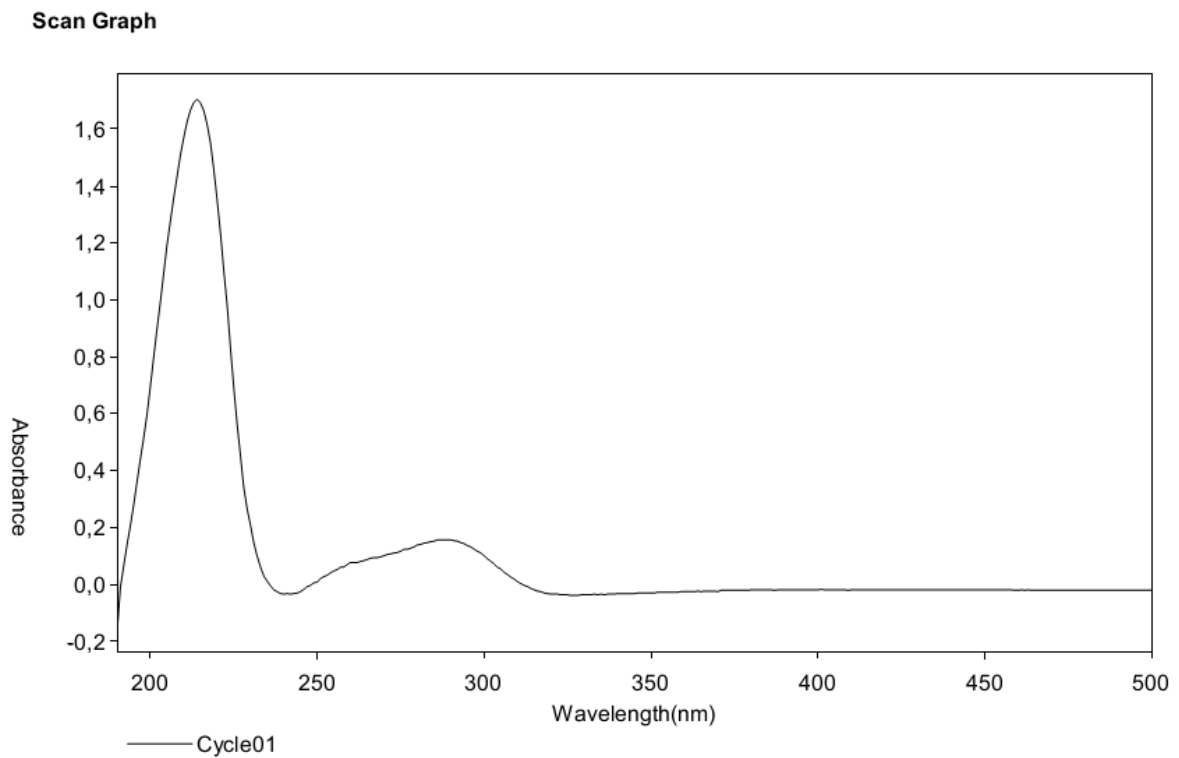
Nem utolsó sorban köszönetet mondok *Tóth Dénesnek*, a Carpe Diem Teaház tulajdonosának, hogy lehetővé tette számomra, hogy rengeteg különleges kínai és japán teákat vehettem vizsgálataim alá.

Függelék

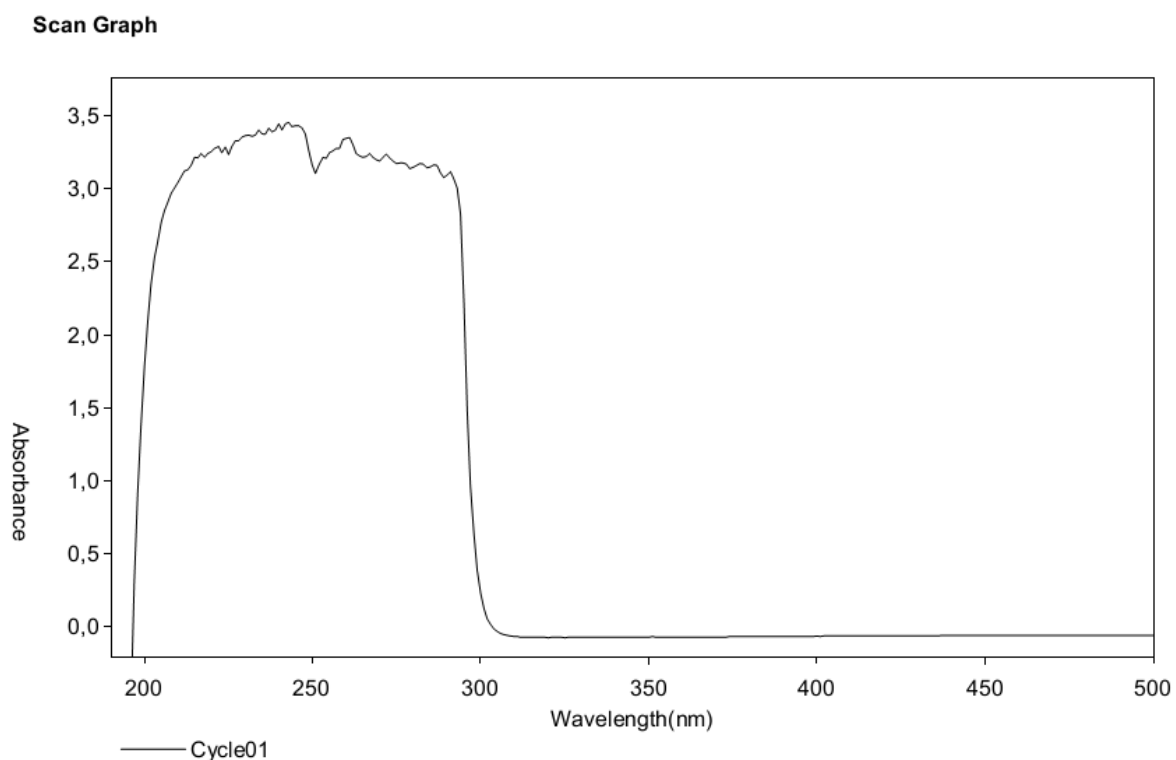
1. Koffein abszorpciós spektruma (stabilizáló oldat a háttér)



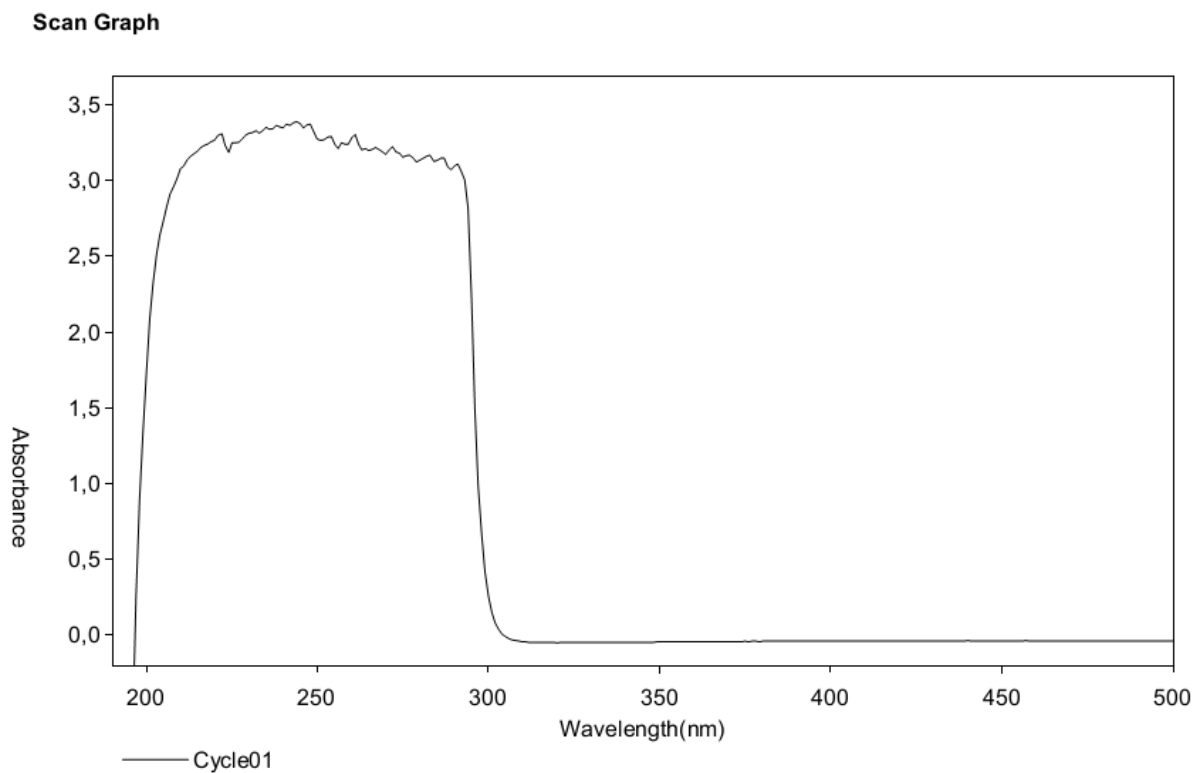
2. Galluszsav abszorpciós spektruma (stabilizáló oldat a háttér)



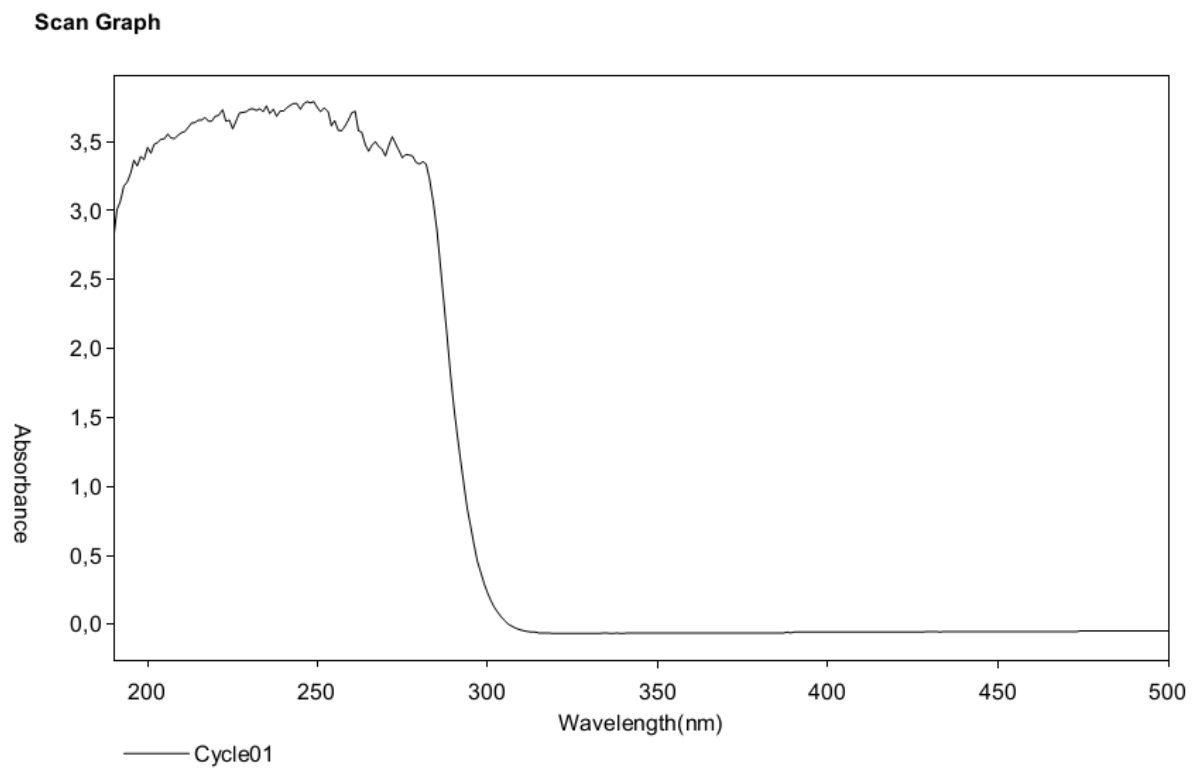
3. Katechin abszorpciós spektruma (metanol:víz = 70:30 a háttér)



4. Epikatechin abszorpciós spektruma (metanol:víz = 70:30 a háttér)



5.A stabilizáló oldat abszorpciós spektruma (metanol:víz = 70:30 a háttér)



6.A tea minták adatai

	<i>Fekete</i>	<i>név jelentése</i>	<i>mikori</i>	<i>származás</i>	<i>mikor szedték</i>	<i>tartalmaz</i>	
1	<i>Yunnani aranyvörös</i>		2008	<i>Simao - Yunnan</i>	<i>Kína</i>	<i>ültetvényes őszi</i>	<i>rügy +1 levél</i>
2	<i>Mojiang arany fekete</i>		2010	<i>Simao - Yunnan</i>	<i>Kína</i>	<i>ültetvényes őszi</i>	<i>csak rügy</i>
3	<i>Darjeeling Castleton Moonlight</i>		2011	<i>Darjeeling</i>	<i>India</i>	<i>ültetvényes tavasz első</i>	<i>OP</i>
4	<i>Ceylon Adawate</i>		2011	<i>Sri Lanka</i>	<i>India</i>	<i>ültetvényes második</i>	<i>OP</i>
5							
6	<i>Hei Cha posztfermentált tea</i>						
7	<i>Liuan bambuszkosaras 2007</i>		2007	<i>Liuan Anhui</i>	<i>Kína</i>	<i>ültetvényes tavasz</i>	<i>posztfermentált tea</i>
10	<i>Oolong</i>						
	<i>Zöld 30-50 % fermentált oolong</i>						
11	<i>Zheng Wei Tie Guan Yin</i>	<i>A Kegyelem Vas Istennője</i>	2011	<i>Anxi - Fujian</i>	<i>Kína</i>	<i>ültetvényes őszi</i>	<i>3-4 éves egyedről őszi rügy + 2 levél</i>
12	<i>Nai Xian Yun Xiang</i>	<i>Tejes édesség</i>	2011	<i>Tajvan</i>	<i>Kína</i>	<i>ültetvényes őszi</i>	<i>őszi rügy + 2- 3 levél</i>
13	<i>Tie Guan Yin</i>	<i>A Kegyelem Vas Istennője</i>	2011	<i>Anxi - Fujian</i>	<i>Kína</i>	<i>ültetvényes őszi</i>	<i>3-4 éves egyedről őszi rügy + 2 levél</i>
	<i>Sötét 60-90 % fermentált oolong</i>						
14	<i>Shui Xian</i>	<i>Vízitündér</i>	2012	<i>Wu Yi - Fujian</i>	<i>Kína</i>	<i>ültetvényes tavasz</i>	
15	<i>Feng Huang Dan Cong Ba Xian</i>	<i>Az aranyfőnix magányos bokrai</i>	2011	<i>Guangdong</i>	<i>Kína</i>	<i>ültetvényes félvad tavasz</i>	
	<i>Zöld</i>						
21	<i>Gyokuro Fuuki</i>		2011	<i>Uji</i>	<i>Japán</i>	<i>ültetvényes tavasz</i>	<i>csak rügy</i>
22	<i>Sencha Manpukuzan</i>		2012	<i>Uji</i>	<i>Japán</i>	<i>ültetvényes tavasz</i>	

23	<i>Yunnan Yu Luo</i>		2012	<i>Simao</i>		<i>ültetvényes</i>	<i>tavaszi</i>	
24	<i>Emei Shan Zhu Ye Qing</i>	<i>Türkiz bambuszlevelek az Emei hegyről</i>	2012	<i>Emei Szecsuan</i>	<i>Kína</i>	<i>ültetvényes</i>	<i>kora tavaszi</i>	<i>csak rügy</i>
25	<i>Long Jing Xinchuan Da Fo</i>	<i>Sárkány Forrás Nagy Buddha</i>	2012	<i>Zhejiang</i>	<i>Kína</i>	<i>ültetvényes</i>	<i>kora tavaszi</i>	<i>csak rügy</i>
26	<i>Kawayanagi Toganoo</i>		2012	<i>Uji</i>	<i>Japán</i>	<i>ültetvényes</i>	<i>nyár</i>	<i>érett levelek és szár</i>
29	<i>shinmatcha hatsu enishi</i>	<i>Matcha porrá őrölt zöld tea</i>		<i>Uji</i>	<i>Japán</i>	<i>ültetvényes</i>	<i>kora tavaszi</i>	<i>csak rügy</i>
	<i>Fehér</i>							
31	<i>Bai Mudan</i>	<i>Fehér peónirózsa</i>	2011	<i>Fujian</i>	<i>Kína</i>	<i>ültetvényes</i>	<i>nyár eleji</i>	<i>rügy + 2 levél</i>
32	<i>Bai Hao Yin Zhen</i>	<i>Ezüst tűk fehér szőrmében</i>	2008	<i>Anhui</i>	<i>Kína</i>	<i>ültetvényes</i>	<i>tavaszi</i>	<i>csak rügy</i>
	<i>Puerh</i>							
41	<i>Sárkány és fönix 2007</i>	<i>Xi Zi Hao</i>	2007	<i>Xishuangbanna</i>	<i>Kína</i>	<i>félvad</i>	<i>tavaszi</i>	<i>rügy + 2-3 levél</i>
42	<i>Ban Zhang 2005</i>		2005	<i>Xishuangbanna</i>	<i>Kína</i>	<i>félvad</i>	<i>tavaszi</i>	<i>rügy + 2 levél</i>
43	<i>Yi Wu 2010</i>		2010	<i>Xishuangbanna</i>	<i>Kína</i>	<i>vad</i>	<i>ősz</i>	<i>rügy + 2 levél</i>
44	<i>érlelt sheng puerh 1978 ból</i>		1978					
45	<i>Lao Ban Zhang</i>		2008	<i>Xishuangbanna</i>	<i>Kína</i>	<i>vad</i>	<i>kora tavaszi</i>	<i>rügy + 2</i>
							<i>tavaszi kora</i>	
46	<i>Xiaguan vad teák</i>		2005	<i>Dali Yunnan</i>	<i>Kína</i>	<i>vad</i>	<i>nyár</i>	<i>rügy és érett levelek</i>
47	<i>Jinggu Nagy Fehér</i>		2010	<i>Simao</i>	<i>Kína</i>	<i>vad</i>	<i>tavaszi</i>	<i>rügy és 1-2 levél</i>
48	<i>Huang Shan Lin</i>	<i>Xi Zi Hao</i>	2007	<i>Xishuangbanna</i>	<i>Kína</i>	<i>vad</i>	<i>tavaszi</i>	<i>rügy és 2 levél</i>
				<i>Lincang -</i>				
49	<i>Vad Tea Király 2008</i>	<i>Mengku</i>	2008	<i>Yunnan</i>	<i>Kína</i>	<i>vad</i>	<i>tavaszi</i>	<i>rügy és 2 levél</i>

Shu Puerh

posztfermentált hei cha puerh)

51 2008 Menghai 7262

2008 Xishuangbanna Kína

ültetvényes tavaszi

Sárga tea

61 Huo Shan Huang Ya

A Huo hegy sárga rügyei

2008 Anhui

Kína

ültetvényes tavaszi de 2008-as tea

