



**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU**

**mgr inż. Justyna Piechocka**

**Ocena skuteczności przeciwwutleniającej  
ekstraktów herbaty w obecności  
chlorowodorku tiaminy i pirofosforanu tiaminy**

Praca doktorska wykonana

w Katedrze Technologii Gastronomicznej i Żywności Funkcjonalnej

na Wydziale Nauk o Żywności i żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

pod kierunkiem **dr hab. Krystyny Szymandery – Buszka**

Poznań 2021

## **STRESZCZENIE**

### **Ocena skuteczności przeciwwutleniającej ekstraktów herbaty w obecności chlorowodorku tiaminy i pirofosforanu tiaminy**

Wysokie dawki zarówno tiaminy, jak i ekstraktów herbaty oraz jej aktywnych składników wykorzystywane są w profilaktyce i leczeniu niektórych schorzeń, m.in. choroby Alzheimera czy nowotworów. Jednoczesne stosowanie związków polifenolowych oraz tiaminy może pozwolić na wzajemne wzmacnianie ich aktywności przeciwwutleniającej oraz przeciwzapalnej i wykazywać działanie przeciwstarzeniowe. W związku z tym warto rozważyć łączne zastosowanie tych substancji w suplementach diety lub dodatkach do żywności. Należy jednak zauważać, że zarówno witamina B<sub>1</sub>, jak i aktywne składniki herbaty wykazują dużą niestabilność w zmieniających się warunkach.

Wstępne badania tego zagadnienia wskazały na istotny wpływ tiaminy na aktywność przeciwwutleniającą ekstraktów herbaty. Prace te były jednak wyrywkowe i dotyczyły tylko wybranych ekstraktów herbaty. Biorąc pod uwagę brak szczegółowego opracowania tego problemu w dostępnej literaturze, celem pracy było zbadanie wpływu dodatku zmiennych stężeń chlorowodorku tiaminy i pirofosforanu tiaminy na aktywność przeciwwutleniającą etanolowych ekstraktów herbaty (0,002 g/100 g) o różnym stopniu fermentacji. W pracy przyjęto hipotezę o istnieniu zależności pomiędzy wskaźnikami aktywności przeciwwutleniającej ekstraktów herbaty oraz głównych flawonoidów herbaty i kofeiny a stężeniem obecnej w układzie tiaminy i jej formy. Przyjęto także hipotezę, że zależność pomiędzy wskaźnikami aktywności przeciwwutleniającej ekstraktów herbaty a stężeniem obecnej w układzie tiaminy i jej formy wynika z zawartości charakterystycznych składników herbaty związanych z zaawansowaniem stopnia jej fermentacji. Jako zmienne formy tiaminy przyjęto – pirofosforan tiaminy i chlorowodorek tiaminy, dodane w ilościach: 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 9,0; 13,5; 16,0; 18,0 i 20,0 mg/100 g. Jako zmienne dodanych ekstraktów herbaty przyjęto stopień zaawansowania ich fermentacji: herbata biała, zielona, żółta, czerwona i czarna. Spośród aktywnych składników herbaty uwzględniono: (-) - 3-galusan epigallokatechiny (EGCG), (-) - 3-galusan epikatechiny (ECG), (-) - epigallokatechinę (EGC) i kofeinę, dodane w ilościach: 0,4; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 i 6,0 mg/100 g, odpowiadających ich zawartości w ekstraktach herbaty o różnym stopniu fermentacji. W badaniach przeprowadzono ocenę aktywności przeciwwutleniającej etanolowych

ekstraktów herbaty i jej aktywnych składników na podstawie zmian wskaźników stabilności oksydacyjnej oleju sojowego (liczba nadtlenkowa i liczba anizydynowa), a także właściwości chelatujących, siły redukującej oraz zdolności do redukowania rodnika DPPH\* i zdolności do redukowania kationorodnika ABTS\*\*.

Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono aktywność przeciwitleniającą zarówno badanych ekstraktów, jak i składników charakterystycznych dla herbaty. Potwierdzono hipotezę o istnieniu zależności pomiędzy wszystkimi analizowanymi wskaźnikami efektywności przeciwitleniającej badanych ekstraktów herbaty oraz składników charakterystycznych dla herbaty a stężeniem obecnej tiaminy i jej formy. Istotny wpływ stężenia obecnej tiaminy na kierunek tych zmian potwierdzono statystycznie. Najwyższą aktywność przeciwitleniającą badanych ekstraktów herbaty potwierdzono w układach zawierających zarówno pirofosforan tiaminy, jak i chlorowodorek tiaminy w ilościach od 0,1 do 0,8 mg/100 g. Dotyczyło to wszystkich analizowanych wskaźników właściwości przeciwitleniających. Natomiast w miarę wzrostu stężenia obecnej tiaminy stwierdzono obniżenie aktywności przeciwitleniającej badanych ekstraktów herbaty. W próbkach zawierających taminę w ilości powyżej 2,0 mg/100 g odnotowano istotną statystycznie dodatnią korelację między zawartością pierwotnych (liczba nadtlenkowa) i wtórnego (liczba anizydynowa) produktów utleniania oleju sojowego z dodatkiem ekstraktów herbaty a zawartością tiaminy. Wraz ze wzrostem zawartości tiaminy z 0,8 do 20 mg/100 g stwierdzono obniżenie współczynnika ochronnego analizowanych ekstraktów herbaty nawet o 45%. Analiza właściwości chelatujących i siły redukującej potwierdziła uzyskane wcześniej tendencje. W układach zawierających taminę w ilościach powyżej 2,0 mg/100 g stwierdzono ujemną korelację pomiędzy wartościami właściwości chelatujących i siły redukującej ekstraktów herbaty a zawartością tiaminy. Podobne zależności stwierdzono wobec zdolności redukowania rodników ABTS\*\* i DPPH\*. Dodatkowo potwierdzono istotny wpływ stopnia fermentacji badanych ekstraktów na siłę tych zmian. Badane ekstrakty uszeregowano według rosnącej „podatności”, wyrażającej się zmniejszeniem ich aktywności przeciwitleniającej wraz ze wzrostem dawki chlorowodoreku tiaminy lub pirofosforanu tiaminy (powyżej 4 mg/100 g) w kolejności: **ekstrakt herbaty czarnej**<**ekstrakt herbaty czerwonej**<**ekstrakt herbaty żółtej**=**ekstrakt herbaty zielonej**<**ekstrakt herbaty białej**.

Przeprowadzone badania potwierdziły także hipotezę, że zależność pomiędzy wskaźnikami aktywności przeciwitleniającej ekstraktów herbaty a stężeniem obecnej

w układzie tiaminy i jej formy wynika z zawartości charakterystycznych składników herbaty, związanych z zaawansowaniem stopnia jej fermentacji: EGCG, ECG, EGC i kofeiny. Stwierdzono, że efektywność przeciutleniająca tych składników zależała także od wysokości dawki obecnej tiaminy. Wzrost współczynnika ochronnego EGCG w układzie z olejem sojowym zaobserwowano w obecności tiaminy w przedziale 0,1 – 1,4 mg/100 g, a kofeiny w zakresie 0,1 – 1,0 mg/100 g. Natomiast w układach zawierających tiaminę w zakresie powyżej 4 mg/100 g, aktywność przeciutleniająca tych związków malała. Szczególnie dotyczyło to EGCG.

Potwierdzono istotną korelację pomiędzy aktywnością przeciutleniającą określona na podstawie wskaźników właściwości chelatujących i siły redukującej oraz zdolności redukowania wolnych rodników – rodnika DPPH\* i kationorodnika ABTS\*\* dla EGCG, ECG, EGC, jak i kofeiny a ilością zawartej tiaminy. Przy stężeniach tiaminy mieszczących się w przedziale 0,1 – 2 mg/100 g potwierdzono wzrost siły redukującej i właściwości chelatujących badanych składników. Podobne tendencje dla zdolności redukowania rodnika DPPH\* i kationorodnika ABTS\*\* potwierdzono w układach zawierających tiaminę w przedziale 0,1 – 4,0 mg/100 g.

Badane składniki uszeregowano według rosnącej „podatności” wyrażającej się zmniejszeniem aktywności chelatujących i siły redukującej oraz wskaźników zdolności redukowania wolnych rodników – rodnika DPPH\* i kationorodnika ABTS\*\* wraz ze wzrostem dawki chlorowodorku tiaminy lub pirofosforanu tiaminy (powyżej 4 mg/100 g) w kolejności: **kofeina<EGC<ECG<EGCG**. Stwierdzono także, że wraz ze wzrostem stężenia analizowanych składników charakterystycznych dla herbaty malała zależność pomiędzy wskaźnikami ich aktywności przeciutleniającej a stężeniem tiaminy. Dotyczyło to szczególnie kofeiny. Potwierdzono także silniejszy związek pomiędzy aktywnością przeciutleniającą badanych ekstraktów herbaty, jak i jej składników a stężeniem tiaminy w formie pirofosforanu tiaminy.

Wiedza o wpływie czynników związanych ze stężeniem EGCG, EGC, ECG czy kofeiny, a także etanolowych ekstraktów herbaty o różnym stopniu fermentacji i tiaminy na ich aktywność przeciutleniającą może mieć znaczenie w regulowaniu jakości suplementów czy fortyfikowanej żywności. Informacje te mogą być istotne we wspomaganiu żywienia osób w każdym wieku ( żywienie doustne, dojelitowe i pozajelitowe).

Wyniki badań pozwoliły stwierdzić, że dla maksymalnej skuteczności działania przeciutleniającego etanolowych ekstraktów herbaty oraz flavonoidów herbaty, jak

i kofeiny najkorzystniej wprowadzić tiaminę w postaci chlorowodorku tiaminy jako dodatku w maksymalnej ilości 6 mg/100 g z optymalnym efektem na poziomie 2 mg/100 g.

**Słowa kluczowe:**

tiamina, pirofosforan tiaminy, chlorowodorek tiaminy, herbata, flawonoidy, EGCG, EGC, ECG, kofeina, aktywność przeciwwutleniająca.

**Justyna Piechocka**

**Praca doktorska wykonana pod kierunkiem**

***dr hab. Krystyny Szymandery-Buszka***

**Katedra Technologii Gastronomicznej i Żywności Funkcjonalnej**

**Wydział Nauk o Żywności i żywieniu Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**

## SUMMARY

### **Assessment of antioxidant effectiveness of tea extracts in the presence of pyrophosphate and thiamine hydrochloride**

High quantity of both thiamine and tea extracts as well as its active ingredients are used in the prevention and treatment of certain diseases, including Alzheimer's disease or cancer. The simultaneous application of polyphenolic compounds and thiamine may allow for the mutual enhancement of their antioxidant and anti-inflammatory activity and may have anti-aging effects. Therefore, it is worth considering their combined use in food supplements or food additives. However, it should be noted that both vitamin B<sub>1</sub> and the active ingredients of tea have great instability in changing conditions.

Preliminary studies on this issue have shown a significant influence of thiamine on the antioxidant activity of tea extracts. However, these studies were random and concerned only selected tea extracts. Taking into account the lack of detailed study of this problem in the available literature, the aim of the study was to investigate the effect of the addition of variable concentrations of thiamine hydrochloride and thiamine pyrophosphate on the antioxidant activity of ethanolic tea extracts (0.002 g/100 g) with various degrees of fermentation. In the dissertation, it is hypothesized that there is a relationship between the indicators of the antioxidant activity of tea extracts and the main flavonoids of tea and caffeine and the concentration of thiamine and its form in the system. It was also hypothesized that the relationship between the indicators of the antioxidant activity of tea extracts and the concentration of thiamine and its form in the system results from the content of characteristic tea components related to the advancement of its fermentation degree. As variable forms of thiamine, the following were assumed - thiamine pyrophosphate and thiamine hydrochloride, added in amounts: 0.01; 0.02; 0.04; 0.06; 0.08; 0.1; 0.2; 0.4; 0.8; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 6.0; 8.0; 9.0; 13.5; 16.0; 18.0 and 20.0 mg/100 g. The degree of their fermentation advancement was assumed as the variables of the added tea extracts: white, green, yellow, red and black tea. The active tea ingredients include: (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC) and caffeine, added in amounts: 0.4; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 5.0 and 6.0 mg/100 g, corresponding to their contents in tea extracts with different degrees of fermentation. The studies assessed the antioxidant activity of ethanol tea

extracts and its active ingredients on the basis of changes in the oxidative stability of soybean oil (peroxide number and anisidine number), as well as chelating properties, reducing power and the ability to reduce the DPPH<sup>\*</sup> and the ability to reduce the radical ABTS<sup>†</sup>.

On the basis of the obtained results, the antioxidant activity of both the tested extracts and the ingredients characteristic for tea was confirmed. The hypothesis about the existence of a relationship between all the analyzed indicators of the antioxidant effectiveness of the studied tea extracts and tea ingredients and the concentration of the present thiamine and its form was confirmed. The significant influence of the concentration of the present thiamine on the direction of these changes was confirmed statistically. The highest antioxidant activity of the tested tea extracts was confirmed in systems containing both thiamine pyrophosphate and thiamine hydrochloride in amounts ranging from 0.1 to 0.8 mg/100 g. This applied to all the analyzed indicators of antioxidant properties. On the other hand, as the concentration of the present thiamine increased, a decrease in the antioxidant activity of the tea extracts tested was found. In samples containing thiamine in the amount above 2.0 mg/100 g, a statistically significant positive correlation was found between the content of primary (peroxide number) and secondary (anisidine number) of oxidation products of soybean oil with tea extracts and the content of thiamine. Along with the increase in thiamine content from 0.8 to 20 mg/100 g, the protective factor of the analyzed tea extracts decreased even by 45%. The analysis of chelating properties and reducing force confirmed the trends obtained earlier. In systems containing thiamine in amounts above 2.0 mg/100 g, a negative correlation was found between the values of chelating properties and reducing power of tea extracts and the thiamine content. Similar relationships were found for the ability to reduce ABTS<sup>†</sup> and DPPH<sup>\*</sup> radicals. Additionally, a significant influence of the fermentation degree of the tested extracts on the strength of these changes was confirmed. The tested extracts were ranked according to the increasing "susceptibility", expressed as a decrease in their antioxidant activity with an increase in the quantity of thiamine hydrochloride or pyrophosphate (over 4 mg/100 g) in the following order: black tea extract < red tea extract < yellow tea extract = green tea extract < white tea extract.

The conducted research also confirmed the hypothesis that the relationship between the indicators of the antioxidant activity of tea extracts and the concentration of thiamine and its form present in the system results from the content of characteristic tea components related to the advancement of the degree of fermentation: EGCG, ECG, EGC and caffeine. It

was found that the antioxidant efficiency of these components also depended on the amount of thiamine present. The increase in the protective coefficient of EGCG in the system with soybean oil was observed in the presence of thiamine in the range of 0.1 - 1.4 mg/100 g, and of caffeine in the range of 0.1 - 1.0 mg/100 g. However, in systems containing thiamine in the range above 4 mg/100 g, the antioxidant activity of these compounds decreased. In particular, this was the case with EGCG.

A significant correlation was confirmed between the antioxidant activity on the basis of the chelating properties and reducing power indices as well as the ability to reduce free radicals - the DPPH<sup>\*</sup> radical and the ABTS<sup>•+</sup> cation radical for EGCG, ECG, EGC and caffeine and the amount of thiamine contained. At concentrations of thiamine in the range of 0.1 - 2 mg/100 g, the increase in reducing power and chelating properties of the tested components was confirmed. Similar trends for the ability to reduce DPPH<sup>\*</sup> radical and ABTS<sup>•+</sup> radical cation were confirmed in systems containing thiamine in the range 0.1 – 4 mg/100 g.

The tested components were ranked according to the increasing "susceptibility" expressed by a decrease in chelating activity and reducing force, as well as indices of the ability to reduce free radicals - the DPPH<sup>\*</sup> radical and the ABTS<sup>•+</sup> cation radical with an increase in the quantity of thiamine hydrochloride or pyrophosphate (above 4 mg/100 g) in the following order: **caffeine<EGC<ECG<EGCG**. It was also found that with the increase in the concentration of the analyzed ingredients characteristic for tea, the relationship between the indicators of their antioxidant activity and the concentration of thiamine decreased. In particular, this was the case with caffeine. A stronger relationship was also confirmed between the antioxidant activity of the studied tea extracts and its components and the concentration of thiamine in the form of thiamine pyrophosphate.

Knowledge about the influence of factors related to the concentration of EGCG, EGC, ECG or caffeine, as well as ethanolic tea extracts with various degrees of fermentation and thiamine, on their antioxidant activity may be important in regulating the quality of supplements or fortified food. This information may be important in supporting the nutrition of people of all ages (oral, enteral and parenteral nutrition).

The results of the research allowed to conclude that for the maximum effectiveness of the antioxidant effect of ethanolic tea extracts and tea flavonoids, as well as caffeine, it is best to introduce thiamine in the form of thiamine hydrochloride as an additive in a maximum amount of 6 mg/100 g and with an optimal effect at the level of 2 mg/100 g.

**Key words:**

thiamine, thiamine pyrophosphate, thiamine hydrochloride, tea, flavonoids, EGCG, EGC, ECG, caffeine, antioxidant activity.

**The doctoral thesis was written under the supervision of**

***dr hab. Krystyna Szymandera-Buszka***

**Department of Gastronomy Science and Functional Foods**

**Faculty of Food Science and Nutrition,**

**Poznań University of Life Sciences**

30.09.21r Pieczęć Jury