

تعیین ضرایب نفوذ تند و کند در استخراج آنتی اکسیدان‌های برگ سبز چای ایرانی

علی ضیاء الدینی، عباس جعفری جید*⁺، علی ذاکری، سید محمد حسینی جوبه

تهران، پژوهشکده توسعه صنایع شیمیایی ایران، صندوق پستی ۱۴۹۴-۱۳۱۴۵

چکیده: برگ سبز چای حاوی آنتی اکسیدان‌های ضد سرطان می‌باشد که می‌توان پس از استخراج، از آنها در تولید داروهای ضد سرطان، فرآورده‌های غذایی عملگر و فرآورده‌های بهداشتی - آرایشی استفاده کرد. در این تحقیق به بررسی سینتیک و ساز و کار استخراج این آنتی اکسیدان‌ها پرداخته شده است. برای این منظور، ضریب‌های نفوذ هر یک از کاتچین‌های EC، EGC، EGCG و C و کافئین موجود در برگ سبز چای ایرانی در عملیات استخراج این مواد به کمک آب محاسبه شده است. بر اساس رابطه به کار گرفته شده، دو نوع ضریب نفوذ تند و کند برای انتقال جرم از برگ سبز چای مالش داده شده در نظر گرفته شده است که با توجه به نتیجه‌ها و محاسبه‌های انجام شده، ضریب نفوذ مرحله داخلی که در درون ذره‌های چای اتفاق می‌افتد نقش محدود کننده فرایند استخراج را دارد. علاوه بر این، مقدارهای دما و زمان بهینه استخراج این مواد به صورت کافئین (۸۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ دقیقه)، C (۹۰ درجه سانتی‌گراد، ۸۰ دقیقه)، EC (۸۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ دقیقه)، EGC (۸۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ دقیقه)، EGCG (۹۰ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ دقیقه)، به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: برگ سبز چای، کاتچین، کافئین، استخراج، ضریب نفوذ

KEY WORDS: Green tea leaves, Catechin, Caffeine, Extraction, Diffusion coefficient.

مقدمه

چای می‌شوند [۱]. اخیراً، به دلیل اثرهای سودمندشان بر سلامتی و نیز ویژگی آنتی اکسیدانی [۵]، ضد موتاژنی، ضد توموری و ضدسرطانی کاتچین‌ها توجه زیادی را در جامعه علمی و در میان عموم مردم به خود جلب کرده‌اند [۶]. کاتچین‌ها به چهار ماده اصلی ^(۱)EGC، ^(۲)ECG، ^(۳)EC و ^(۴)EGCG و چهار ماده فرعی ^(۵)GC، ^(۶)CG، ^(۷)C و ^(۸)GCG که اپیمرهای چهار ماده اصلی مزبور هستند، تقسیم می‌شوند [۴،۵].

چای پرمصرف ترین نوشیدنی بعد از آب در دنیا می‌باشد [۲، ۱]. منشاء چای (Camellia Sinensis) در چین به چندین هزار سال قبل برمی‌گردد [۳]. کافئین، اسکوربات و کاتچین‌ها ترکیب‌های عملگر موجود در چای می‌باشند [۴]. به طور کلی، برگ‌های سبز چای حاوی ۳۶٪ پلی فنل می‌باشند که در این میان کاتچین‌ها بیشترین سهم را دارا می‌باشند [۳]. کاتچین‌ها که در عصاره آبی برگ‌های خشک Camellia Sinensis وجود دارند، موجب تلخ مزگی

*عهده دار مکاتبات

+E-mail: Jafari.Jaid@acecr.ac.ir

- (۱) Epigallocatechin
- (۲) Epicatechin gallate
- (۳) Epicatechin
- (۴) Epigallocatechin-3-Gallate

- (۵) Gallate catechin
- (۶) Catechin gallate
- (۷) Catechin
- (۸) Gallocatechin gallate

حل عمومی معادله تقریب قانون دوم فیک از گرادیان غلظت در درون ذره‌ها به روش سری‌های فوریه منجر به معادله (۱) می‌شود:

$$\frac{C - C_0}{C_1 - C_0} = 1 - \left[\frac{4}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \cos \frac{(2n+1)\pi x}{2L} \exp \left(-\frac{(2n+1)^2 \pi^2}{4L^2} Dt \right) \right] \quad (1)$$

که در آن C ، غلظت در هر لحظه در فاصله x از مرکز صفحه ($x=\pm L$) می‌باشد. با انتگرال‌گیری از غلظت بر روی ضخامت، مقدار جرم منتقل شده در هر لحظه (M) را می‌توان محاسبه کرد. جرم منتقل شده در لحظه t نسبت به کل جرم منتقل شده در زمان بی‌نهایت (M_{∞}) به صورت زیر می‌باشد:

$$\frac{M}{M_{\infty}} = 1 - \frac{\lambda}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left(-\frac{(2n+1)^2 \pi^2}{4L^2} Dt \right) \quad (2)$$

بعد از زمان کوتاهی، تمامی عبارت‌های موجود در عبارت مجموع به غیر از عبارت اول آن، قابل اغماض می‌شوند، در نتیجه با فرض اینکه جرم منتقل شده از صفحه در لحظه t با غلظت در محلول (C) برابر است، معادله زیر به دست می‌آید [۱۱]:

$$\ln \left(\frac{C_{\infty} - C}{C_{\infty} - C_0} \right) = \ln \left(\frac{\lambda}{\pi^2} \right) + \frac{\pi^2 Dt}{4L^2} \quad (3)$$

هنگامی که نمودار $\ln(C_{\infty}/C_{\infty} - C)$ نسبت به زمان رسم شود، نقطه‌ها بر روی دو خط مستقیم متقاطع قرار می‌گیرند. اولین خط، شیب به نسبت تند و دومین خط شیب به نسبت کند دارد. نقطه‌های تقاطع منحنی‌های $\ln(C_{\infty}/C_{\infty} - C)$ نسبت به t برای مرحله‌های تند و کند، نقاط انتقال^(۱) نامیده می‌شوند [۱۱، ۱۲].

اوزبورن و کتر در سال ۱۹۴۴ میلادی با مطالعه روی استخراج دانه‌های سویا متوجه شدند که باید دو فرایند نفوذ موازی تند و کند در درون ذره جامد در نظر گرفته شود [۱۳].

روش استفاده شده توسط آنها را می‌توان برای استخراج از ذره‌های مسطح به صورت معادله (۵) مورد استفاده قرار داد [۱۲].

$$\left(\frac{C_{\infty} - C}{C_{\infty}} \right) = \frac{\lambda}{\pi^2} \left[f_1 \exp \left(-\frac{\pi^2 D_1 t}{4L^2} \right) + f_2 \exp \left(-\frac{\pi^2 D_2 t}{4L^2} \right) \right] \quad (5)$$

که در آن f_1 و f_2 اجزایی از حل شونده می‌باشند که به ترتیب با ضریب‌های نفوذ D_1 و D_2 استخراج می‌شوند.

لیانگ و ژو تأثیر دما بر استخراج چای سیاه را مورد بررسی قرار دادند [۷]. از آنجا که برگ چای حاوی میزان بیشتری از ترکیب‌های فعال نسبت به چای سیاه می‌باشد لذا در این پژوهش، استخراج برگ چای ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. نوها و همکاران از مخلوط اتانل و روغن‌های خوراکی برای استخراج ترکیب‌های چای سبز استفاده کردند [۸]. اوزونالیچ و همکاران تأثیر دمای شروع استخراج بر میزان استخراج را مورد بررسی قرار دادند که به نظر روش مناسبی برای بهینه‌سازی فرایند استخراج نمی‌باشد [۳]. سوماتسو و همکاران نیز استخراج کاتچین‌ها از برگ‌های سبز چای را مورد مطالعه قرار دادند و حلال آب - استونیتریل را به عنوان حلال بهینه معرفی کردند [۹]. با این وجود، در این پژوهش، آب به‌عنوان حلال مورد استفاده قرار گرفت تا میزان ترکیب‌های موجود در برگ سبز چای ایرانی توسط مصرف‌کنندگان مورد بررسی قرار گیرد. در این پژوهش، اثر دما و زمان بر میزان استخراج و غلظت‌های کافئین و چهار کاتچین از برگ‌های سبز چای ایرانی مالش داده شده بررسی شد. سپس، نمودارهای آزمایشگاهی با یک مدل ریاضی مشتق شده از قانون دوم فیک مورد تحلیل قرار گرفتند و ضریب‌های نفوذ این ترکیب‌های تحت شرایط دمایی عملیاتی مختلف در آب محاسبه شدند [۱۰].

بخش نظری

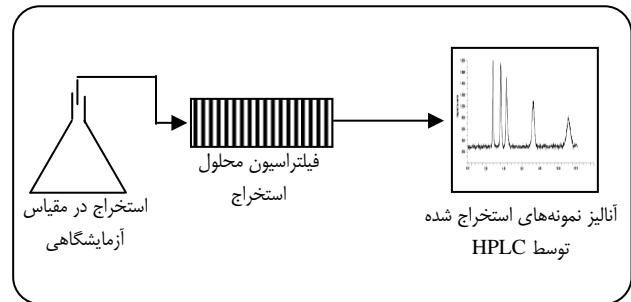
مدل ریاضی به کار گرفته شده

به طور کلی انتقال جرم از فاز جامد به فاز مایع به دو مرحله تقسیم می‌شود. در مرحله اول (شستشو)، یک دوره استخراج با شدت ثابت و خیلی سریع وجود دارد که در آن انتقال جرم به صورت پایا می‌باشد و مقاومت فیلم، شدت انتقال جرم را محدود می‌کند. در مرحله دوم، استخراج بسیار کمتر و به صورت ناپایا اتفاق می‌افتد. در این مرحله نفوذ در داخل ذرات جامد شدت فرایند استخراج را محدود می‌کند. به‌طور معمول نفوذ جزء حل شونده در داخل ذره‌های جامد به سمت حلال، مرحله محدود کننده انتقال جرم می‌باشد [۱۱].

تقریب قانون دوم فیک از گرادیان غلظت در درون ذره‌های مواد اولیه به‌عنوان نیروی محرکه استخراج به جای اختلاف در پتانسیل شیمیایی استفاده می‌کند. تمایل یک ترکیب برای تغییر فاز با پتانسیل شیمیایی اندازه‌گیری می‌شود بنابراین آنالیز دقیق‌تری با کمک پتانسیل شیمیایی قابل انجام است. با وجود این، در صورتی که از عصاره‌های خیلی رقیق استفاده شود می‌توان از روش فیک استفاده کرد.

(۱) Transition points

مورد استخراج قرار گرفت. طراحی آزمایش‌ها براساس روش فاکتوریل کامل در دماهای ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ درجه سانتیگراد و زمان‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ دقیقه انجام شد. نمونه‌های حلال ابتدا با کمک فیلتر ۰/۴۵ میکرون فیلتر شدند و سپس با کمک دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد آنالیز قرار گرفتند که شرایط آنالیز مطابق با روش وانگ و همکاران می‌باشد [۱۴]. شکل ۱ نمودار روش آزمایش را نشان می‌دهد.



شکل ۱- شمای روش آزمایش.

نتیجه‌ها و بحث

سینتیک استخراج

در پژوهش حاضر، محاسبه‌ها به گونه‌ای انجام شد که ضریب‌های نفوذ برای ترکیبات پلی‌فنلی و کافئین چای در حین استخراج از برگ‌های سبز چای مالش داده شده، برای هر دو مرحله استخراج تند و کند تعیین شوند. این دو ویژگی را می‌توان با رسم نمودارهای لگاریتم طبیعی غلظت (رابطه (۴)) نسبت به زمان، نشان داد.

با توجه به شکل ۲ واضح است که در تمامی موارد، در شروع فرایند، میزان استخراج (بازدهی استخراج) به سرعت افزایش می‌یابد و سپس از شدت آن کاسته می‌شود. تغییرات شدید اولیه را می‌توان به بازیافت جزء حل شونده از سطح گیاه و مرحله آرام بعدی را به استخراج جزء حل شونده ذخیره شده در فضاهای داخلی گیاه نسبت داد.

تأثیر دما بر سینتیک استخراج

به منظور بررسی تأثیر دما بر سینتیک استخراج پلی‌فنل‌ها و کافئین از چای، غلظت این ترکیب‌ها در محلول استخراج در دماهای ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ به عنوان تابعی از زمان رسم شدند (شکل ۲). پارامترهای محاسبه شده فرآیند نفوذ برای مرحله‌های تند و کند، با استفاده از معادله (۴) محاسبه و در جدول ۱ ارائه شده‌اند.

همانطور که مشاهده می‌شود، در بازه دمایی مورد بررسی، هیچکدام از اجزای موجود در چای تجزیه نشدند. نتیجه‌های به دست آمده نشان می‌دهند که با افزایش دما بازدهی استخراج کاتچین (C) افزایش می‌یابد (شکل ۲- الف). علاوه بر این، با افزایش دما، از ۷۰ تا ۹۰ درجه سانتیگراد $D_{\text{تند}}$ و $D_{\text{کند}}$ ثابت و از ۷۰ تا ۹۰ درجه سانتیگراد افزایش می‌یابند (شکل ۳). بازدهی استخراج EGCG نیز مانند کاتچین (C) با افزایش دما به شدت افزایش می‌یابد (شکل ۲- ه).

در مرحله استخراج با شیب تند، $f_1 \exp(-\pi^2 D_1 t / 4L^2)$ قابل صرف‌نظر کردن می‌باشد، لذا رسم منحنی \ln تابع نسبت به زمان، مقدارهای D_1 و f_1 را مشخص می‌کند (اگر C_∞ به طور مجزا مشخص شده باشد)، که D_1 به $D_{\text{تند}}$ تعبیر می‌شود. از سوی دیگر، در مرحله استخراج با شیب کند، $f_2 \exp(-\pi^2 D_2 t / 4L^2)$ نزدیک به یک می‌شود و D_2 و f_2 را می‌توان مشخص کرد که D_2 به $D_{\text{کند}}$ تعبیر می‌شود [۱۱، ۱۲].

بخش تجربی

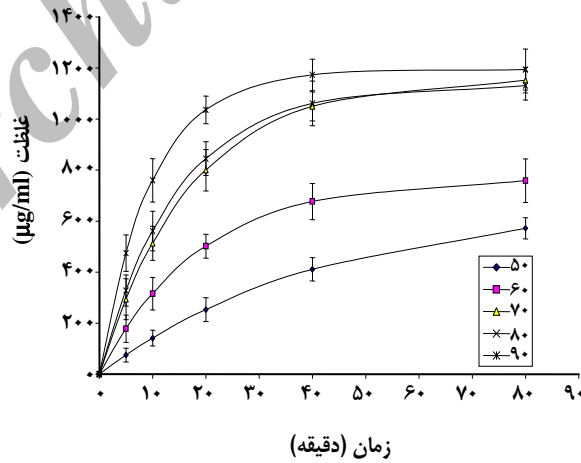
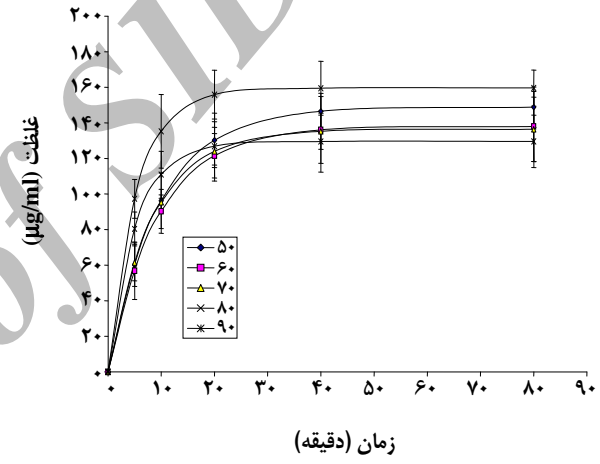
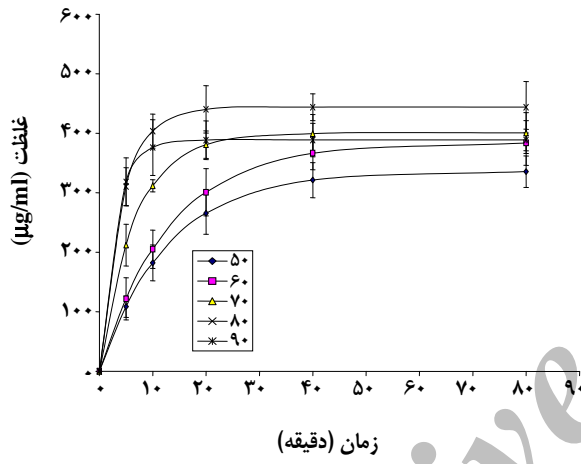
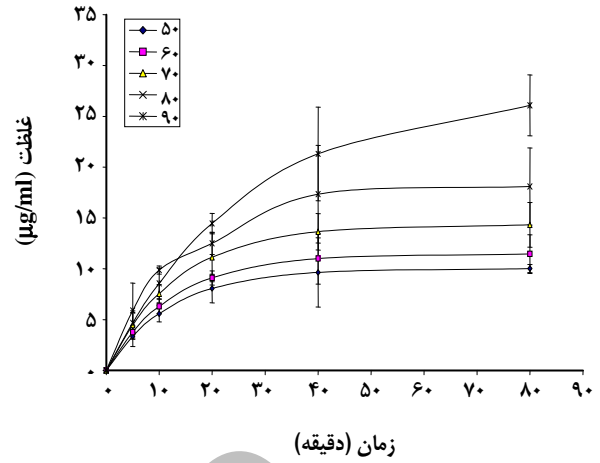
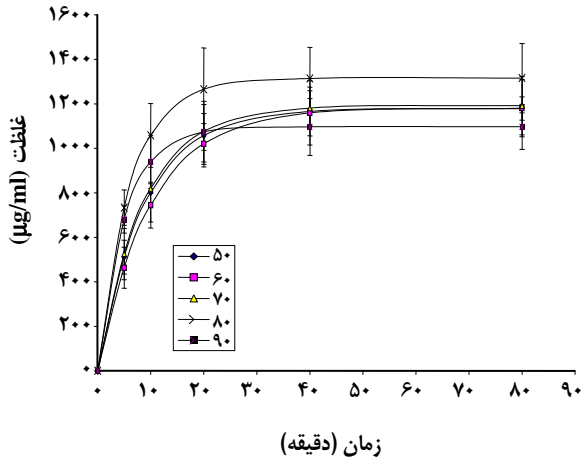
مواد

برگ‌های سبز چای مالش داده شده از مزرعه‌ای در فومن (با طول جغرافیایی ۴۹ درجه و ۲۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و عرض ۳۷ درجه و ۱۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه) تهیه شدند و ضخامت آنها ۳ میلی‌متر در نظر گرفته شده است. و مواد مرجع و استاندارد از فراورده‌های شرکت سیگما خریداری شدند: کافئین (E0750)، EGCG (E4018)، EC (E4018)، ECG (E3893)، EGC (E3768).

تمامی حلال‌های مورد استفاده به منظور انجام آزمایش‌ها استخراج و آنالیز از فراورده‌های شرکت مرک خریداری شدند. به علاوه در این تحقیق از آب دوبار تقطیر شده استفاده شد. در این تحقیق از نرم‌افزار سیگما پلات نسخه ۸ از شرکت SPSS به منظور محاسبه پارامترهای خطی سازی و تعیین ضریب‌های نفوذ تند و کند استفاده شد.

روش آزمایش

آزمایش‌های استخراج از برگ سبز چای مالش داده شده در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری انجام شدند، به این صورت که در هر یک از آزمایش‌ها ۴ گرم برگ سبز چای له شده با کمک ۲۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر شده در شرایط دما و زمان مختلف



شکل ۲- تغییرهای غلظت کاتچین‌ها و کافئین نسبت به زمان و دما در محلول استخراج. الف) کاتچین (C) ب) EGC ج) EC د) کافئین ه) EGCG

جدول ۱- ضریب‌های نفوذ محاسبه شده کاتچین‌ها و کافئین و تغییرهای آنها نسبت به زمان.

	دما (درجه سانتی‌گراد)	$D_{تند} (cm^2 s^{-1})$	$D_{کند} (cm^2 s^{-1})$
EGC	۵۰	$2,786E-09$	$9,755E-08$
EGC	۶۰	$3,67E-09$	$9,14E-08$
EGC	۷۰	$2,83E-09$	$9,85E-08$
EGC	۸۰	$1,94E-09$	$1,23E-07$
EGC	۹۰	$4,80E-10$	$1,40E-07$
C	۵۰	$9,00E-10$	$8,37E-08$
C	۶۰	$1,15E-09$	$8,41E-08$
C	۷۰	$1,79E-09$	$8,22E-08$
C	۸۰	$3,62E-09$	$1,18E-07$
C	۹۰	$1,34E-09$	$1,25E-07$
Caff	۵۰	$3,14E-09$	$8,40E-08$
Caff	۶۰	$4,60E-09$	$8,44E-08$
Caff	۷۰	$1,38E-09$	$1,16E-07$
Caff	۸۰	$3,90E-10$	$1,68E-07$
Caff	۹۰	$2,70E-11$	$2,33E-07$
EC	۵۰	$2,99E-09$	$9,31E-08$
EC	۶۰	$2,29E-09$	$9,39E-08$
EC	۷۰	$1,71E-09$	$1,00E-07$
EC	۸۰	$8,14E-10$	$1,37E-07$
EC	۹۰	$3,57E-10$	$1,40E-07$
EGCG	۵۰	$3,35E-09$	$2,06E-07$
EGCG	۶۰	$3,27E-09$	$8,26E-08$
EGCG	۷۰	$8,02E-09$	$8,97E-08$
EGCG	۸۰	$6,47E-09$	$8,52E-08$
EGCG	۹۰	$4,63E-09$	$9,23E-08$

سپس با افزایش دما به میزان کمی کاهش می‌یابد. این در حالی است که $D_{تند}$ مربوط به این ماده تقریباً ثابت می‌باشد. از نمودار تغییرات غلظت EC (شکل ۲-ج) نسبت به زمان در دماهای مختلف مشاهده می‌شود که با افزایش دما از ۵۰ تا ۷۰ درجه بازدهی استخراج افزایش سپس از ۷۰ تا ۸۰ درجه کاهش و با بالاتر بردن دما دوباره بازدهی کاهش می‌یابد. نمودار $D_{تند}$ مربوط به این ماده نیز با افزایش دما تغییر چندانی را نشان نمی‌دهد، ولی $D_{کند}$ با افزایش دما از ۸۰ تا ۹۰ درجه به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (شکل ۳).

لازم به ذکر است که $D_{تند}$ مربوط به این ماده با افزایش دما از ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد به شدت کاهش می‌یابد و سپس ثابت می‌ماند و $D_{کند}$ مربوط به آن در فاصله دمایی ۶۰ تا ۷۰ درجه افزایش می‌یابد و سپس به مقدار اولیه باز می‌گردد (شکل ۲). همان گونه در شکل (۱-ب) مشاهده می‌شود، با افزایش دما از ۵۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد بازدهی استخراج EGC افزایش می‌یابد. درحالی که با افزایش بیشتر دما تا ۹۰ درجه بازدهی کاهش می‌یابد. با توجه به شکل ۳ $D_{کند}$ برای EGC از ۵۰ تا ۷۰ درجه ثابت و

نمودار تغییرهای غلظت کافئین نسبت به زمان و دما افزایش بازدهی استخراج این ماده را با افزایش دما تا ۸۰ درجه و سپس کاهش بازدهی تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد (شکل ۲ - د). علاوه بر این، همانطوری که نمودارهای D در شکل ۳ نشان می‌دهند، برای کافئین در فاصله دمایی ۸۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد و $D_{تند}$ نیز تقریباً ثابت می‌آید. جدول ۱ ضریب‌های نفوذ محاسبه شده مربوط به اجزای تشکیل دهنده چای را در دماهای مختلف نشان می‌دهد.

شکل ۴ نمونه‌ای از نمودار تابع لگاریتمی در مقابل زمان را برای مرحله‌های تند و کند استخراج EGC در دمای 50°C را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

مطالعه‌های سینتیکی و نتیجه‌های تحلیل‌های ریاضی نتیجه‌های آزمایش‌های استخراج انجام شده، نشان می‌دهند که نفوذ درون ذره‌ای عامل تعیین کننده شدت استخراج می‌باشد. لذا، قطر ذره‌های گیاه، یک عامل تاثیر گذار بر سینتیک فرایند استخراج است. نتیجه‌های به دست آمده شرایط بهینه برای استخراج هر کدام از مواد فوق را به کمک آب به شرح زیر نشان می‌دهند:

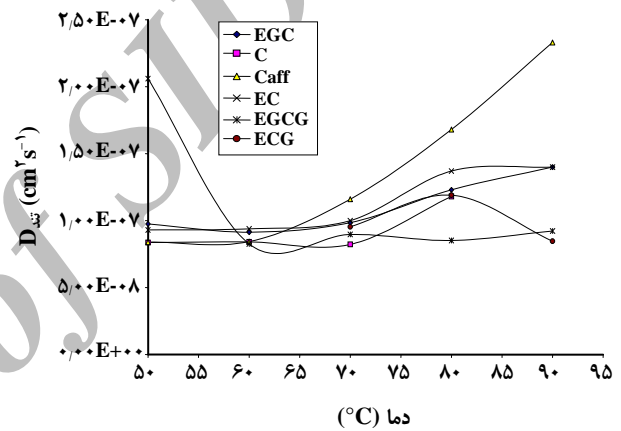
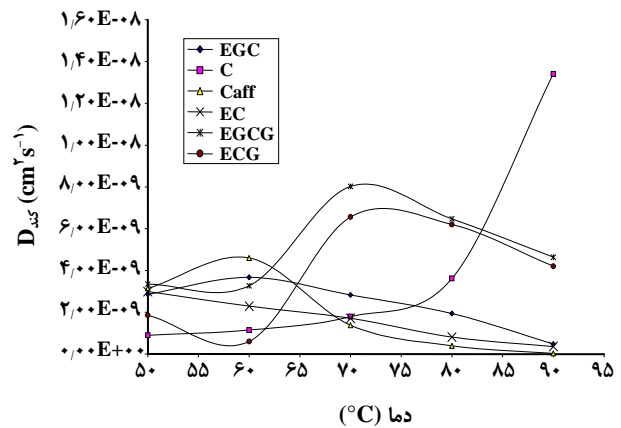
C (۹۰ درجه سانتی‌گراد، ۸۰ دقیقه)، کافئین (۸۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ دقیقه)، EC (۸۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ دقیقه)، EGC (۸۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ دقیقه)، EGCG (۹۰ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ دقیقه).

علاوه بر این، ضریب‌های نفوذ برای مراحل تند و کند محاسبه شدند (جدول ۱ و شکل ۳).

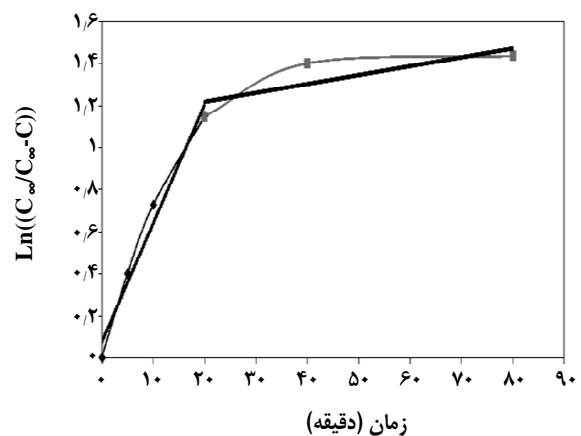
فهرست نمادها

C	غلظت جزء مورد نظر در صفحه صاف (g dm^{-3})
$D_{تند}$ و $D_{کند}$	ضریب نفوذ تند ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
$D_{تند}$ و $D_{کند}$	ضریب نفوذ کند ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
L	نصف ضخامت برگ (mm)
M	جرم منتقل شده از صفحه صاف (g)
T	دما ($^{\circ}\text{C}$)
t	زمان (min)
f_1	جزیی از حل شونده که با ضرایب نفوذ کند استخراج می‌شود
f_2	جزیی از حل شونده که با ضریب نفوذ تند استخراج می‌شود

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۸/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۸/۱۸



شکل ۳- تغییرهای ضریب‌های نفوذ مربوط به مراحل تند و کند هر یک از کاتچین‌ها و کافئین نسبت به دما. الف) تغییرهای ضریب‌های نفوذ مرحله کند نسبت به دما، ب) تغییرهای ضریب‌های نفوذ مرحله تند نسبت به دما.



شکل ۴- نمودار درجه یک برای مراحل تند و کند استخراج EGC به کمک آب در دمای 50°C .

مراجع

- [1] Wang H., Provan G.J., Helliwell K., Tea Flavonoids: Their Functions, Utilization and Analysis, *Trends Food Sci. Technol*, **11**, p. 152 (2000).
- [2] Goto T., Yoshida Y., Simultaneous Analysis of Individual Catechins and Caffeine in Green Tea, *Meth. Enzymol*, **299**, p. 107 (1999).
- [3] Uzunalic A.P., Skerget M., Knez Z., Weinreich V., Otto F., Gruner S., Extraction of Active Ingredients from Green Tea (*Camellia Sinensis*): Extraction Efficiency of Major Catechins and Coffeine, *Food Chemistry*, **96**(4), p. 597 (2005).
- [4] Yoshida Y., Kiso M., Goto t., Efficiency of the Extractim of Catechins from Green Tea, *Food Chemistry*, **67**, p. 429 (1999).
- [5] Bauzinet L., labbe D., Tremblay A., Production of Green tea EGC- and EGCG- Enriched Fractions by a Two-Step Extraction Procedure, *Separation and Purification Technology*, **56**, 53-56 (2007).
- [6] Chang S.J., Lin P.Z., Ding L., Hu X.Z., Oguni I., Hara Y., Inhibition of Green Tea Extract on Mutagenicity and Carcinogenicity, In Proc, "Of the Int'l symp. on tea Sci.", pp. 195-199 (1991).
- [7] Liang, Y., Xu, Y., Effect of Extraction Temperature on Cream and Extractability of Black Tea [*Camellia Sinensis* (L.) O.kuntze], *International Journal of Food Science and Technology*, **38**(1), 37-45 (2002).
- [8] Nwuha V., Nakajima M., Tong J., Ichikawa S., Solubility of Green Tea Extracts in Pure Solvents and Edible Oils, *Journal of Food Engineering*, **40**, p. 161 (1999).
- [9] Suematsu S., Hisanobu Y., Saigo H., Matsuda R., Komatsu Y., A New Extraction Procedure for Determination of Caffeine and Catechins in Green Tea (Studies on Presevation of Gnstituents in Canned Drinks. Part V), *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **42**, pp. 419-424 (1995).
- [10] Crank J., "The Mathematics of Diffusion", Oxford: Oxford University Press (1975).
- [11] Hojnik M., Skerget M., Knez Z., Extraction of Lutein from Marigold Flower Petals- Experimental Kinetics and Modelling, *LWT-Food Science and Technology*, Doi: 10.1016/j.lwt.2007.11.017 (2008).
- [12] Herodez S.S., Hadolin M., Skerget M., Knez Z., Solvent Extraction Study of Antioxidant from Balm (*Mellissa officinalis* L.) leaves, *Food Chemistry*, **80**, p. 272 (2003).
- [13] Osburn J.O., Katz D.L., Structure as a Variable in the Application of Diffusion Theory to Extraction, *Transactions of the American Institute of chemical Engineers*, **40**, p. 511 (1944).
- [14] Wang H., Helliwell K., You X., Isocratic Elution System for the Determination of Catechins, Caffeine and Gallic Acid in Green tea Using HPLC, *Food Chemistry*, **68**, p. 115 (2000).