



Original Article

Development and Validation of a HPLC Method  
of Quantification of Caffeine and EGCG in Green Tea  
(*Camellia sinensis* L.) Extract

Tran Trong Bien<sup>1\*</sup>, Bui Thi Lan Phuong<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Hanoi University of Pharmacy, 13-15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>National Institute of Pharmaceutical Technology, 13-15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

Received 23 February 2020

Revised 27 February 2020; Accepted 03 March 2020

**Abstract:** This study investigates a simple high performance liquid chromatography (HPLC) in an isocratic eluent manner for quantification of caffeine and EGCG in green tea extract. The study separation system contained a C18-RP column (250 × 4.6 mm, 5 μm), a mobile phase of methanol/phosphoric acid/water (20/0.1/79.9, v/v) and a DAD detector at 280 nm. This system proves convenient for rapid routine analysis of caffeine and EGCG in green tea extract with good repeatability and accuracy.

**Keywords:** HPLC, caffeine, EGCG, green tea, extract.

\* Corresponding author.

E-mail address: [trantrongbien@gmail.com](mailto:trantrongbien@gmail.com)

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4212>

# Xây dựng và thẩm định phương pháp HPLC định lượng cafein và EGCG trong cao lá Chè xanh (*Camellia sinensis* L.)

Trần Trọng Biên<sup>1,\*</sup>, Bùi Thị Lan Phương<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia, 13-15 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 23 tháng 02 năm 2020

Chỉnh sửa ngày 27 tháng 02 năm 2020; Chấp nhận đăng ngày 02 tháng 03 năm 2020

**Tóm tắt:** Một phương pháp HPLC với chế độ rửa giải đẳng dòng được nghiên cứu để định lượng cafein và EGCG trong cao lá Chè xanh. Điều kiện sắc ký gồm cột C18-RP (250 × 4,6 mm, 5 μm), pha động methanol/phosphoric acid/water (20/0,1/79,9, tt/tt) và detector DAD tại bước sóng 280 nm. Phương pháp xây dựng thuận lợi để phân tích nhanh cafein và EGCG trong các mẫu cao lá Chè xanh với độ lặp lại và độ đúng tốt..

**Từ khóa:** HPLC, cafein, EGCG, Chè xanh.

## 1. Mở đầu

Chè (*Camellia sinensis* L.) là một trong những đồ uống phổ biến nhất ở Việt Nam và trên thế giới do hương vị đặc trưng và các tác dụng sinh học quan trọng của các hợp chất catechin (điển hình là epigallocatechin gallat - EGCG) trong lá như chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn, kháng virus, chống ung thư [1-3]. Ngoài ra, lá Chè xanh chứa 2-5% cafein - một alkaloid khi sử dụng thường xuyên và quá mức sẽ gây kích ứng đường tiêu hóa; hồi hộp, mất ngủ; nhịp tim nhanh, tăng huyết áp; nguy cơ dị tật thai nhi, sảy thai và thai chết lưu [4, 5]. Do đó, hiện nay nhu cầu về các sản phẩm chứa hàm lượng cafein thấp từ cây Chè nói riêng và các loại đồ uống nói chung đang ngày càng tăng. Trong công nghiệp dược phẩm, cao chiết Chè xanh chuẩn hóa (Polyphenon<sup>®</sup> E, Theaphenon<sup>®</sup> E) đã được sản xuất đã và đang trải qua nhiều thử nghiệm lâm sàng quan trọng [2]. Một trong các thuốc đã được FDA chấp nhận trong điều trị mụn cóc sinh dục

(*Condyloma acuminata*) từ năm 2006 dưới tên thương mại Veregen<sup>®</sup> (hoạt chất Sinecatechins) [6]. Cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào trong nước đề cập đến việc loại cafein đồng thời làm giàu catechin trong điều chế cao lá Chè xanh loại cafein ứng dụng trong dược phẩm mặc dù Việt Nam là một trong những quốc gia sản xuất và tiêu thụ Chè lớn trên thế giới và Chè Việt Nam được đánh giá là có chất lượng ngang bằng với Chè Trung Quốc, Nhật Bản hay Australia [7]. Hiện tại, chúng tôi đang nghiên cứu điều chế các sản phẩm cao lá Chè loại cafein. Do đó, một phương pháp HPLC đơn giản đã được xây dựng và thẩm định nhằm định lượng đồng thời cafein và EGCG trong các mẫu cao phục vụ cho nghiên cứu.

## 2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nguyên vật liệu

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: trantrongbien@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4212>

Mẫu nghiên cứu: Các mẫu cao nghiên cứu được chuẩn bị theo quy trình tham khảo [8], tóm tắt như sau:

Cao thô ethanol 50%: Lá Chè xanh khô thu hái tại Đại Từ, Thái Nguyên (kích thước 1-2 mm) được chiết xuất bằng phương pháp ngâm ở nhiệt độ phòng, chiết 3 lần  $\times$  12 giờ với tỷ lệ dung môi gấp 10 lần nguyên liệu, Gộp các dịch chiết và cô thu hồi dung môi dưới áp suất giảm (500 mbar, 70°C) đến khi còn 1/3 thể tích và phun sấy tạo cao khô với các điều kiện: nhiệt độ đầu vào 140°C, nhiệt độ đầu ra 67 - 70°C, tốc độ bơm 30 - 35%, áp suất phun dịch 100%, áp suất khí nóng 400 - 600 mbar, áp suất khí âm -40 mbar

Cao tinh chế loại cafein: Dịch chiết lá Chè xanh với nồng độ cafein 0,5 mg/mL được điều chỉnh về pH 4 bằng acid citric khan, thêm chất hấp phụ montmorillonit (tỷ lệ 3,5% kl/tt), khuấy hỗn hợp trong 20 phút với tốc độ 150 vòng/phút ở 15-25°C. Hỗn hợp sau hấp phụ được để lắng, gạn, lọc thu lấy dịch chiết đã loại cafein và đông khô (tiền đông -70°C trong 24 giờ, thăng hoa 24 giờ ở -40°C, 0,1 mbar).

Cao tinh chế giàu EGCG: Dịch chiết lá Chè xanh sau loại cafein được pha loãng để được nồng độ EGCG là 0,5 mg/mL và hấp phụ qua cột nhựa macroporous HPD826. Rửa tạp chất bằng nước và giải hấp phụ bằng ethanol 30%. Dịch giải hấp phụ được cô thu hồi ethanol dưới áp suất giảm (500 mbar, 70°C) và đông khô với điều kiện như trên.

Chất chuẩn: Cafein chuẩn (hàm lượng 98,73%, lô MUST-17060110) và EGCG chuẩn (hàm lượng 99,78%, lô MUST-17060113) từ Chengdu Must Biological Technology Co., Ltd. (Trung Quốc).

Thiết bị: Máy sắc kí lỏng hiệu năng cao Shimadzu (Nhật Bản) với các bộ phận chính: bơm cao áp LC-10ADVP, buồng cột CTO-10AVP, bộ phận điều khiển SCL-10AVP, detector mảng diod SPD-M10AVP, bộ phận đuôi khí DGU-14A, phần mềm điều khiển Class vp 6.14.

## 2.2. Phương pháp định lượng cafein và EGCG

Tham khảo các tài liệu [3, 9], các điều kiện HPLC được lựa chọn gồm: Cột C18 InertSustain® (250  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m); pha động

methanol - nước - acid phosphoric (20 : 79,9 : 0,1, tt/tt); tốc độ dòng: 0,8 mL/phút; thể tích tiêm mẫu: 20  $\mu$ L; detector DAD tại 280 nm.

Mẫu chuẩn: Dung dịch chuẩn hỗn hợp hoặc chuẩn đơn trong nước cất có nồng độ nằm trong khoảng từ 8 đến 200  $\mu$ g/mL đối với cafein và từ 12 đến 300  $\mu$ g/mL đối với EGCG.

Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 10 mg cao khô vào bình định mức 100 mL, hòa tan và bổ sung nước cất đến vạch, pha loãng đến nồng độ thích hợp và lọc qua màng cellulose acetat 0,45  $\mu$ m. Hàm lượng cafein (hoặc EGCG) trong mẫu thử được tính theo công thức:

$$\text{Hàm lượng (\%)} = \frac{(S_t - b) \times k \times 10000}{a \times 1000 \times m_t \times (100 - B)}$$

Trong đó,  $S_t$  là diện tích pic sắc ký của cafein (hoặc EGCG) trong mẫu thử, a và b là các hệ số của đường chuẩn ( $y=ax+b$ ) của cafein (hoặc EGCG), k là hệ số pha loãng của mẫu thử,  $m_t$  là khối lượng mẫu thử (g), B là hàm ẩm của mẫu thử (%).

## 3. Thực nghiệm và kết quả

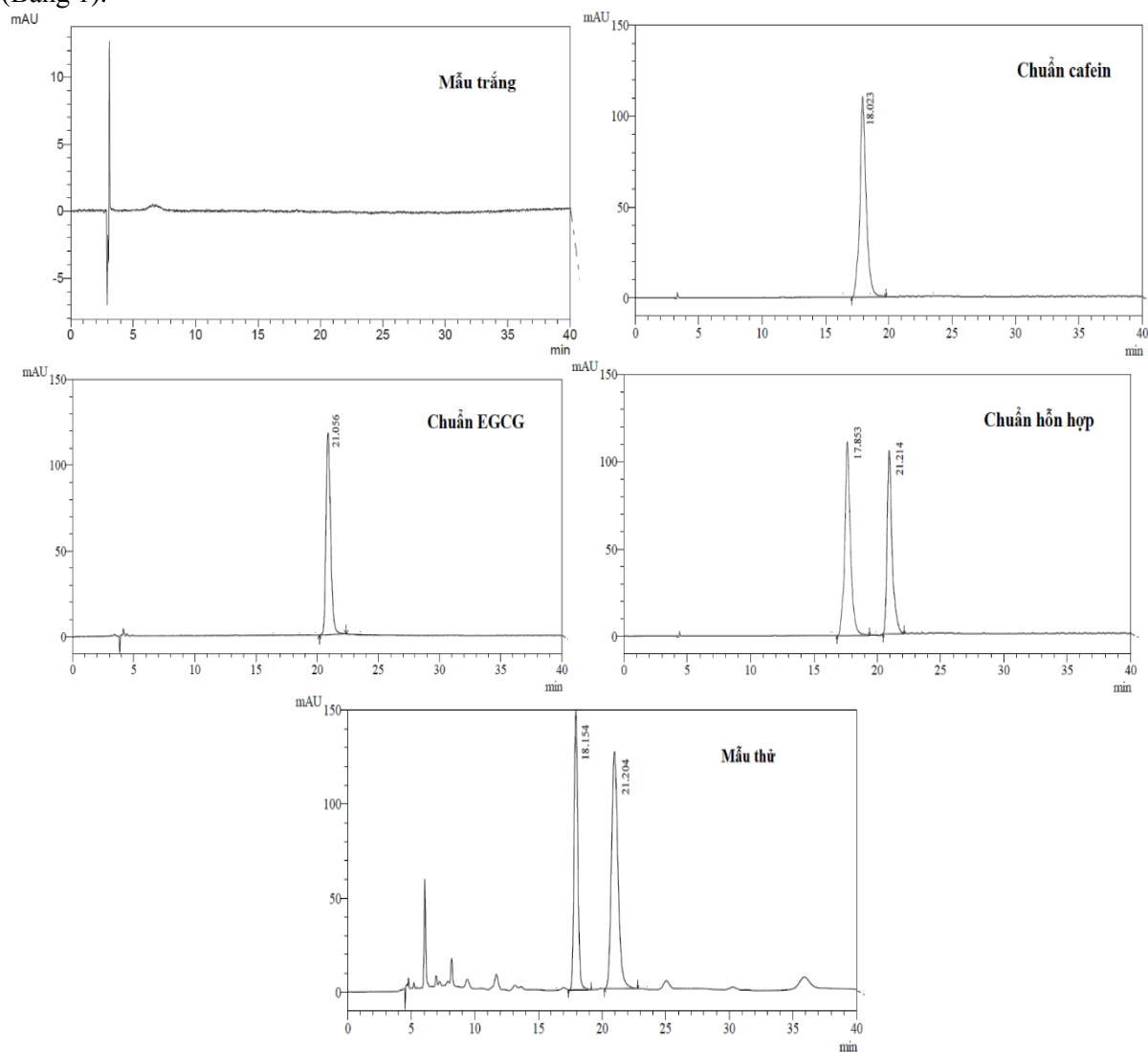
### 3.1. Thẩm định phương pháp định lượng

Độ đặc hiệu: Tiến hành sắc ký các mẫu sau: mẫu trắng (nước cất), chuẩn đơn cafein, chuẩn đơn EGCG, chuẩn hỗn hợp và mẫu thử thu được các sắc ký đồ như Hình 1.

Cafein có thời gian lưu khoảng 18 phút, EGCG có thời gian lưu khoảng 21 phút. Trên sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện tín hiệu pic tại các thời gian lưu này và trên sắc ký đồ mẫu chuẩn hỗn hợp và mẫu thử có tín hiệu pic của 2 hoạt chất tại các thời gian lưu tương ứng. Như vậy, phương pháp HPLC có tính đặc hiệu phù hợp theo yêu cầu. Ngoài ra, độ phân giải giữa 2 pic cafein và EGCG trên sắc ký đồ mẫu chuẩn hỗn hợp và mẫu thử là 4,834 và 3,662 tương ứng (đều lớn hơn 1,5) chứng tỏ 2 pic tách nhau hoàn toàn và chương trình sắc ký đã chọn có khả năng tách và định lượng 2 hoạt chất.

Độ thích hợp hệ thống: Tiêm lặp lại 6 lần một mẫu chuẩn hỗn hợp có nồng độ cafein và EGCG tương ứng là 40 và 60  $\mu$ g/mL. Độ chênh lệch của diện tích pic và thời gian lưu của cafein và

EGCG đều có RSD < 2%, cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống HPLC là phù hợp (Bảng 1).



Hình 1. Sắc ký đồ HPLC thẩm định độ đặc hiệu.

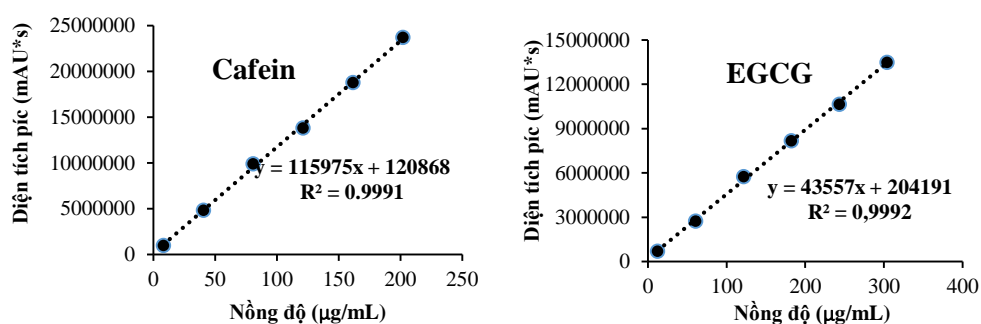
Bảng 1. Kết quả thời gian lưu và diện tích pic của dung dịch chuẩn hỗn hợp

Số thứ tự	Cafein		EGCG	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1	18,509	5070086	20,370	2618581
2	18,619	4837789	20,856	2741833
3	18,311	5111284	20,789	2694934
4	18,541	5035115	20,548	2730358
5	18,403	5099846	20,978	2689647

6	17,988	5016688	21,001	2631101
Trung bình	18,395	5028468	20,757	2684409
RSD (%)	1,23	1,99	1,20	1,88

Bảng 2. Mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ cafein và EGCG

Số thứ tự	Cafein		EGCG	
	Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diện tích pic (mAU*s)	Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diện tích pic (mAU*s)
1	8,08	967556	12,16	696180
2	40,40	4837789	60,80	2741833
3	80,80	9874559	121,60	5744600
4	121,20	13812256	182,40	8170966
5	161,60	18751344	243,20	10645533
6	202,00	23699875	304,00	13480099
Phương trình hồi quy	$y = 115975x + 120868$		$y = 43557x + 204191$	
$R^2$	0,9991		0,9992	



Hình 2. Đường chuẩn mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ.

Khoảng tuyến tính: Kết quả khảo sát sự tương quan giữa diện tích pic và nồng độ cafein và EGCG được thể hiện trong Bảng 2 và Hình 2. Đường chuẩn của cafein và EGCG đều cho giá trị  $R^2 > 0,99$  thể hiện độ tuyến tính cao giữa diện tích và nồng độ chất phân tích.

Độ lặp lại: Tiêm lặp lại 6 lần một mẫu thử cao lá Chè, kết quả đánh giá độ lặp lại của phương pháp được thể hiện ở Bảng 3. Trị số RSD của thời gian lưu và diện tích pic của cafein và EGCG đều nhỏ hơn 2% cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp định lượng

Số thứ tự	Cafein		EGCG	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1	17,809	1073065	21,542	1964324
2	18,241	1087642	21,234	1977534
3	18,442	1056234	20,682	1923276
4	18,354	1103894	20,487	1945273
5	17,706	1063421	20,872	1913028

6	18,202	1085429	21,123	1951203
Trung bình	18,126	1078281	20,990	1945773
RSD (%)	1,65	1,62	1,84	1,25

Độ đúng: Trong các bình định mức 100 mL, chuẩn bị các dung dịch chuẩn như sau:

+ Chuẩn cafein:  $0,0103 \text{ g} \times 98,73\% \times 1000000 \text{ } \mu\text{g/g}/100 \text{ mL} = 101,69 \text{ } \mu\text{g/mL}$

+ Chuẩn EGCG:  $0,0192 \text{ g} \times 99,78\% \times 1000000 \text{ } \mu\text{g/g}/100 \text{ mL} = 191,58 \text{ } \mu\text{g/mL}$

Trong bình định mức 100 mL, cân chính xác khoảng 10 mg cao thô (đã biết hàm lượng cafein và EGCG tương ứng là 5,0 và 19,0%). Dùng pipet chính xác thêm vào bình định mức các lượng chuẩn cafein và EGCG tương ứng với các

mức 50, 100 và 150% so với lượng chất phân tích đã có trong mẫu thử, hòa tan và pha loãng đến vạch bằng nước cất, lọc qua màng 0,45  $\mu\text{m}$ . Kết quả khảo sát độ đúng được thể hiện ở Bảng 4 và Bảng 5.

Ở 3 mức thêm chuẩn, % tìm lại trung bình của cafein đều nằm trong khoảng 97-103% và EGCG đều nằm trong khoảng 98-102% chứng tỏ phương pháp định lượng đáp ứng yêu cầu về độ đúng.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng của cafein

% chuẩn thêm vào	Khối lượng cân (g)	Lượng có sẵn ( $\mu\text{g}$ )	Lượng thêm vào ( $\mu\text{g}$ )	Diện tích pic (mAu.s)	Lượng tìm thấy ( $\mu\text{g}$ )	% thu hồi	% tìm lại trung bình
50%	0,0110	550	254,23	505229	797,67	97,42	98,20
	0,0104	520	254,23	488302	770,77	98,64	
	0,0107	535	254,23	497582	785,52	98,54	
100%	0,0105	525	508,46	652564	1031,80	99,67	100,11
	0,0104	520	508,46	643245	1016,99	97,74	
	0,0100	500	508,46	647190	1023,26	102,91	
150%	0,0103	515	762,69	799874	1265,88	98,45	98,58
	0,0106	530	762,69	812145	1285,38	99,04	
	0,0104	520	762,69	802084	1269,39	98,26	

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng của EGCG

% chuẩn thêm vào	Khối lượng cân (g)	Lượng có sẵn ( $\mu\text{g}$ )	Lượng thêm vào ( $\mu\text{g}$ )	Diện tích pic (mAu.s)	Lượng tìm thấy ( $\mu\text{g}$ )	% thu hồi	% tìm lại trung bình
50%	0,0110	2090	957,89	1499783	3029,46	98,08	100,22
	0,0104	1976	957,89	1463013	2945,45	101,21	
	0,0107	2033	957,89	1488723	3004,19	101,39	
100%	0,0105	1995	1915,78	1874786	3886,32	98,72	99,87
	0,0104	1976	1915,78	1888279	3917,15	101,32	
	0,0100	1900	1915,78	1840284	3807,49	99,57	
150%	0,0103	1957	2873,66	2298364	4854,17	100,82	99,39
	0,0106	2014	2873,66	2296098	4848,99	98,65	
	0,0104	1976	2873,66	2280123	4812,49	98,71	

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng: Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định bằng cách pha loãng dần một dung dịch chuẩn, ghi lại sắc ký đồ và xác

định tỷ lệ tín hiệu pic/nhiều đường nền (S/N), LOD được xác định tại nồng độ có S/N  $\sim 3$  và LOQ được xác định tại nồng độ có S/N  $\sim 10$ . Kết quả cho thấy, cafein có LOD = 0,05  $\mu\text{g/mL}$ ,

LOQ = 0,2 µg/mL. EGCG có LOD = 0,2 µg/mL, LOQ = 0,5 µg/mL.

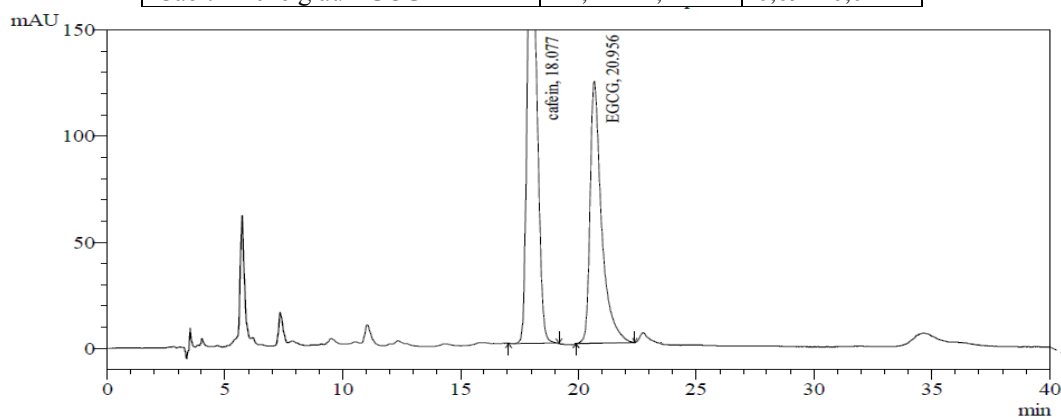
3.2. Ứng dụng phương pháp HPLC định lượng một số mẫu cao

Phương pháp HPLC xây dựng và thẩm định được ứng dụng để định lượng hàm lượng EGCG

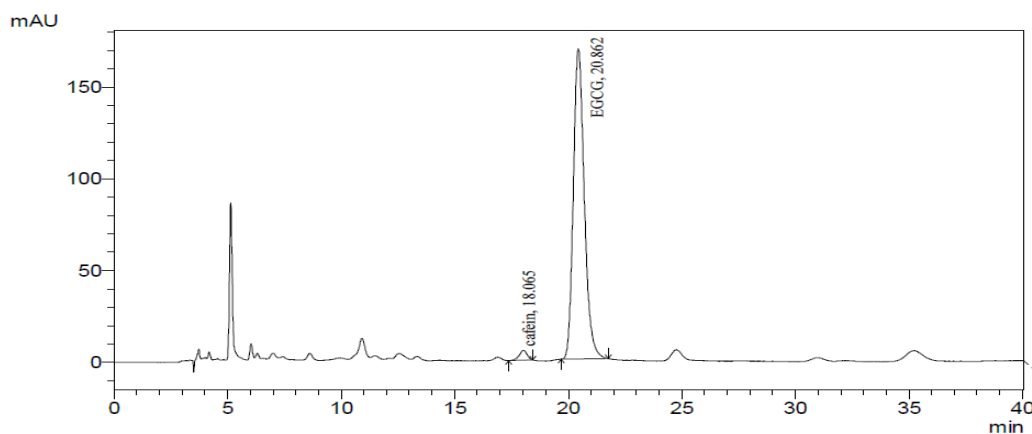
và cafein trong một số mẫu lá cao, kết quả được trình bày ở Bảng 6 và Hình 3. Có thể thấy, phương pháp HPLC cho kết quả có độ lặp lại tốt. Phương pháp loại cafein và làm giàu EGCG đã cho thấy được mức độ hiệu quả, khi so sánh hàm lượng cafein và EGCG trong các mẫu cao thô và các mẫu cao tinh chế

Bảng 6. Kết quả định lượng một số mẫu cao Chè (n=3)

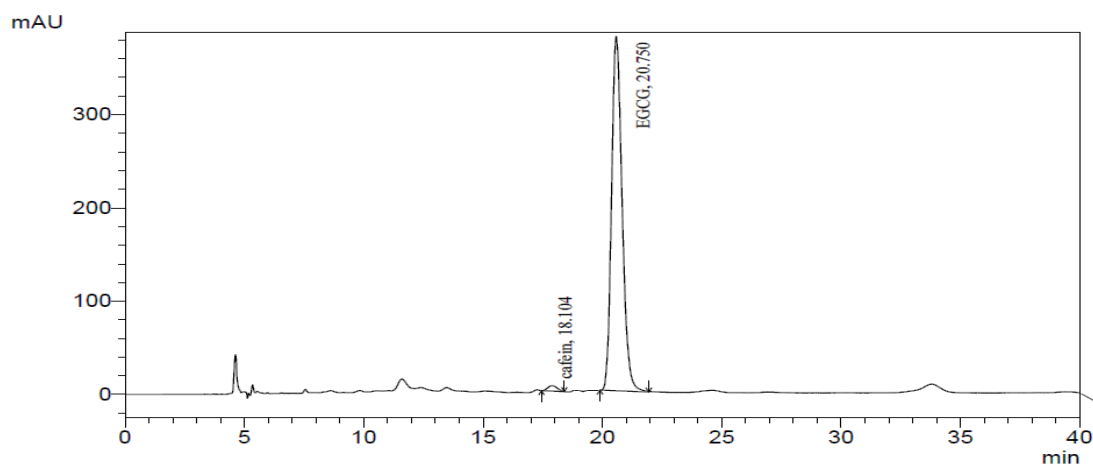
Mẫu	Hàm lượng (%)	
	EGCG	Cafein
Cao thô ethanol 50%	19,00 ± 0,15	5,00 ± 0,15
Cao tinh chế loại cafein	22,20 ± 0,83	0,08 ± 0,01
Cao tinh chế giàu EGCG	42,12 ± 1,22	0,09 ± 0,01



Mẫu cao thô ethanol 50%



Mẫu cao sau loại cafein



Mẫu cao sau loại cafein và làm giàu EGCG

Hình 3. Sắc ký đồ HPLC một số mẫu thử.

#### 4. Bàn luận

Để kiểm nghiệm các thành phần trong cao lá Chè xanh, một số phương pháp đã được nghiên cứu và áp dụng. Trong đó, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và điện di mao quản (CE) là 2 phương pháp được nghiên cứu nhiều nhất. Phương pháp HPLC với detector UV tỏ ra thông dụng và phổ biến, ngoài ra các detector khác như khối phổ, điện hóa, huỳnh quang cũng được sử dụng trong những trường hợp cần thiết. Một số phương pháp khác như sắc ký khí, sắc ký lớp mỏng, sắc ký giấy, quang phổ, phổ cộng hưởng từ hạt nhân cũng được sử dụng để phân tích định tính các thành phần trong Chè xanh [9]. Với phương pháp HPLC, đa phần các nghiên cứu xây dựng chương trình rửa giải gradient nồng độ dung môi khá phức tạp. Jun X. et al. sử dụng hệ pha động A (0,05% acid phosphoric 0,05%) và B (acetonitril) với chương trình thay đổi từ 90:10 (A:B, %) đến 70:30 (A:B, %) theo chế độ gradient trong 30 phút [3]. Shiono T. et al. sử dụng cột  $C_{18}$  (4,6 mm  $\times$  150 mm, 3 mm), hệ pha động gồm A=nước/acetonitril/acid phosphoric(1000/25/1,0, tt/tt), B=nước/methanol/acetonitril/acid phosphoric (600/300/15/0,6, tt/tt) và C=methanol/acetonitril/acid phosphoric (800/200/1,0, tt/tt), rửa giải gradient trong 24 phút [10]. Có thể thấy, tùy theo mục đích của

nghiên cứu và các điều kiện kỹ thuật sẵn có, các điều kiện HPLC được các tác giả sử dụng khác nhau. Trên cơ sở tham khảo các tài liệu, phương pháp HPLC rửa giải theo chế độ đẳng dòng đã được xây dựng phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm và được thẩm định các chỉ tiêu cơ bản như độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng. Kết quả thẩm định đáp ứng các yêu cầu cơ bản của phép định lượng, cho phép xác định chính xác hàm lượng cafein và EGCG trong các mẫu thử trong thời gian tương đối ngắn với các điều kiện sắc ký đơn giản.

#### 5. Kết luận

Phương pháp HPLC với chế độ rửa giải đẳng dòng đã được nghiên cứu để định lượng cafein và EGCG trong cao lá Chè xanh. Điều kiện sắc ký gồm cột  $C_{18}$ -RP (250  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m), pha động methanol/phosphoric acid/water (20/0,1/79,9, tt/tt) và detector DAD tại bước sóng 280 nm. Các chỉ tiêu thẩm định phương pháp phân tích như độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng đều đạt yêu cầu. Phương pháp xây dựng thuận lợi để phân tích nhanh cafein và EGCG trong cao lá Chè xanh.



### Tài liệu tham khảo

- [1] A. Chowdhury, J. Sarkar, T. Chakraborti, P.K. Pramanik, S. Chakraborti, Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: A perspective, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 78 (2016) 50-59.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.12.013>.
- [2] Y. Hara, Tea catechins and their applications as supplements and pharmaceuticals, *Pharmacological Research* 64(2) (2011) 100-104.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.03.018>.
- [3] X. Jun, S. Zhao, B. Lu, R. Zhang, Y. Li, D. Shen, G. Zhou, Separation of major catechins from green tea by ultrahigh pressure extraction, *International Journal of Pharmaceutics* 386(1-2) (2010) 229-231.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.035>.
- [4] Z. Bedrood, M. Rameshrad, H. Hosseinzadeh, Toxicological effects of *Camellia sinensis* (green tea): A review, *Phytotherapy Research* 32(7) (2018) 1163-1180.  
<https://doi.org/10.1002/ptr.6063>.
- [5] J. Michael Glade, Caffeine-Not just a stimulant, *Nutrition* 26(10) (2010) 932-938.  
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.08.004>.
- [6] MediGene AG. Press Release., MediGene AG Obtains Approval of Polyphenon®E Ointment in the USA, 2006.
- [7] Q.V. Vuong, V. Nguyen, J.B. Golding, P.D. Roach, The content of bioactive constituents as a quality index for Vietnamese teas, *International Food Research Journal* 18(1) (2011) 329-336.
- [8] Tran Trong Bien, Method for caffeine removal and catechins enrichment from green tea leaf, Master thesis, Hanoi University of Pharmacy, 2019 (In Vietnamese).
- [9] J. Joseph Dalluge, C. Bryant Nelson, Determination of tea catechins, *Journal of Chromatography A* 881 (2000) 411-424.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00062-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00062-5).
- [10] T. Shiono, et al., Selective decaffeination of tea extracts by montmorillonite, *Journal of Food Engineering* 200 (2017) 13-21.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.12.015>.