

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2018

Bc. VÁCLAV BRANSKÝ

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Analýza aromatických látek obsažených v zeleném čaji

Bc. Václav Branský

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Václav Branský**  
Osobní číslo: **C16601**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Analýza aromatických látek obsažených v zeleném čaji**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na využití plynové chromatografie pro analýzu aromatických látek obsažených v přírodních matricích, zejména v čajích.
2. Optimalizujte mikroextrakci těkavých látek obsažených v zeleném čaji s využitím sorpce na vlákne.
3. Optimalizovanou chromatografickou separací využijte pro analýzu adsorbovaných aromatických látek.
4. Porovnejte a diskutujte obsah aromatických látek v zeleném čaji. Zaměřte se rovněž na porovnání obsahu a zastoupení těchto látek v závislosti na typu čaje.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucí práce.**

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Aleš Eisner, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Ostatní konzultanti: **Ing. Petra Šilarová**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1

autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

## **Poděkování**

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za její odborné rady, věcné připomínky, strávený čas a odpovědi, které mi vždy ráda poskytla, a které mi byly nápomocí při psaní této práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Petře Šilarové za odborné rady a strávený čas, který mi věnovala i nad rámec svých povinností. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat celé mé rodině za materiální a psychickou podporu během dlouhých let mého studia a především své snoubence Lucii Rackové, která mi byla oporou ve chvílích nejtěžších.

## **ANOTACE**

Cílem této diplomové práce byla optimalizace extrakce a separace těkavých látek ve vzorcích zeleného čaje pomocí plynové chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem. Nejprve byly optimalizovány podmínky SPME extrakce s využitím headspace techniky. K optimalizaci byl použit Box, Hunter & Hunter faktorový plán. Optimalizované podmínky separace a extrakce byly využity pro analýzu 13 vzorků zelených čajů. Dále byly těkavé látky identifikovány pomocí spojení GC/MS.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Zelený čaj, SPME, plynová chromatografie, extrakce, plánování experimentů

## **TITLE**

Analysis of Aromatic Compounds Present in Green Tea.

## **ANNOTATION**

The aim of this thesis was optimization of extraction and separation of volatile compounds presented in green tea samples by gas chromatography with a flame-ionization detector. First, SPME extraction conditions were optimized using headspace technique. The Box, Hunter & Hunter factor plan was used for optimization. Optimized separation and extraction conditions were used for analysis of 13 green tea samples. Furthermore, volatile substances were identified by GC/MS.

## **KEYWORDS**

Green tea, SPME, gas chromatography, extraction, design of experiments

# Obsah

Úvod.....	13
1 Teoretická část .....	14
1.1 Čaj .....	14
1.2 Země produkující čaj.....	15
1.3 Technologie zpracování čaje.....	16
1.3.1 Zelený čaj .....	17
1.4 Těkavé látky v zeleném čaji.....	20
1.5 Extrakce.....	22
1.5.1 Extrakce rozpouštědlem .....	23
1.5.2 Extrakce kapalina-kapalina .....	23
1.5.3 Mikroextrakce na pevné fázi .....	24
1.5.3.1 Provedení SPME .....	26
1.5.4 Extrakce plynnou fází „ head-space “ .....	27
1.6 Plynová Chromatografie .....	28
1.6.1 Instrumentace V GC .....	29
1.6.2 Dávkovací zařízení .....	30
1.6.3 Nosný plyn.....	31
1.6.4 Kolona .....	31
1.6.5 Detektor .....	32
1.7 Návrh experimentů a analýza dat.....	33
1.7.1 Faktorový plán.....	33
1.7.2 Hvězdicový plán.....	34
1.7.3 Metoda odezvové (responzní) plochy .....	35
1.8 Stanovení těkavých látek v zeleném čaji .....	36



2 Experimentální část.....	38
2.1 Přístroje a zařízení.....	38
2.2 Vzorke.....	39
2.3 Pracovní postup.....	40
2.3.1 Chromatografická analýza vzorků.....	40
2.3.2 Headspace mikroextrakce na pevnou fázi .....	41
2.3.3 Optimalizace teplotního programu .....	41
2.3.4 Optimalizace HS-SPME pro kombinaci 2 teplot.....	42
2.3.5 Optimalizace HS-SPME pro 1 teplotu .....	44
2.3.6 Optimalizace času extrakce .....	45
3 Výsledky a diskuze .....	46
3.1 Optimalizace teplotního programu.....	46
3.2 Vyhodnocení HS-SPME pro kombinaci 2 teplot .....	47
3.3 Vyhodnocení HS-SPME pro 1 teplotu.....	49
3.4 Optimalizace celkového času HS-SPME .....	50
3.5 Analýza vzorků .....	51
4 Závěr .....	60
5 Použitá literatura .....	61
6 Přílohy.....	67

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 <i>Camellia sinensis</i> [3,4] .....	14
Obrázek 2 Světová produkce čaje [22] .....	16
Obrázek 3 Schéma výroby jednotlivých druhů čajů [7] .....	17
Obrázek 4 Hala pro zavádání čajových lístků [34] .....	19
Obrázek 5 Roller na svinování čaje [35] .....	19
Obrázek 7 SPME v manuálním uspořádání [39] .....	26
Obrázek 8 Proces extrakce metodou SPME [39] .....	27
Obrázek 9 Princip plynové chromatografie [42] .....	29
Obrázek 10 Plynový chromatograf [43] .....	30
Obrázek 11 Jednotlivé druhy kapilárních kolon [45] .....	32
Obrázek 12 Grafické znázornění modelu 2 <sup>3</sup> [48] .....	34
Obrázek 13 Grafické znázornění hvězdicového modelu [48] .....	35
Obrázek 14 Grafické znázornění odezvové plochy [47] .....	36
Obrázek 15 Analyzované vzorky zelených čajů rozdělené dle země původu .....	40
Obrázek 16 Chromatografická separace těkavých látek obsažených v zeleném čaji Dukat. HS-SPME 70 °C 30 minut, doba sorpce 25 minut, teplota nástřiku 250°C , teplota detektoru 250°C, lineární rychlost 25 cm/s, teplotní program 50°C- 3 minuty, 6°C/min do 250 °C. ....	46
Obrázek 17 Paretův graf standardizovaných efektů HS-SPME pro kombinaci 2 teplot .....	48
Obrázek 18 Profily pro předpovědi a vhodnost pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci 2 teplot .....	48
Obrázek 19 Odezvové responzní plochy pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci 2 teplot	49
Obrázek 20 Odezvová responzní plocha HS-SPME pro 1 teplotu .....	50
Obrázek 21 Závislost plochy píků na celkovém čase extrakce .....	51
Obrázek 22 Analýza hlavních komponent: A) Cattelův graf, B) komponentní váhy PC1-PC2, C) komponentní váhy PC1-PC3, D) komponentní váhy PC2-PC3 .....	53
Obrázek 23 Analýza hlavních komponent a faktorová analýza: A) komponentní skoré PC1-PC2, B) komponentní skoré PC1-PC3, C) komponentní skoré PC2-PC3, D) Faktorové skoré F1-F2.....	54

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Výskyt těkavých látek odpovědných za aroma čaje [36] .....	21
Tabulka 2 Přehled vláken používaných pro SPME [25].....	25
Tabulka 3 Experimentální matrice $2^3$ [48] .....	33
Tabulka 4 Experimentální matice hvězdicového plánu [45] .....	34
Tabulka 5 Přehled analyzovaných vzorků .....	39
Tabulka 6 Tabulka testovaných teplotních gradientů .....	42
Tabulka 7 Faktorový návrh Box, Hunter & Hunter ( $2^k$ ) pro optimalizaci 2 teplot, $k = 4$ .....	42
Tabulka 8 Faktorový návrh Box, Hunter & Hunter ( $2^k$ ) pro optimalizaci 1 teploty, $k = 2$ .....	44
Tabulka 9 Testované časy pro optimalizaci celkové doby extrakce.....	45
Tabulka 10 Identifikované látky pomocí GC/MS.....	55

## SEZNAM ZKRATEK

DOE	Návrh experimentů a analýza dat (Design of Experiments)
ECD	Detektor elektronového záhytu (Electron Capture Detector)
ESI	Ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
FID	Plamenově-ionizační detektor (Flame Ionization Detector)
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GC/MS	Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
HS-SPME	Headspace SPME (Headspace Solvent Microextraction)
IMS	Hmotnostní spektrometrie s iontovou mobilitou
LOD	Mez detekce (Limit of Detection)
PPO	Polyfenol oxidáza
RSM	Metoda odezvové (responzní) plochy (Response Surface Methodology)
SFE	Extrakce superkritickou tekutinou (Supercritical Fluid Extraction)
SPME	Mikroextrakce na pevné fázi (Solid Phase Microextraction)
TCD	Tepelně-vodivostní detektor (Thermal Conductivity Detector)
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě (Thin-Layer Chromatography)
UAE	Ultrazvuková extrakce (Ultrasonic Extraction)

## Úvod

Zelený čaj zná lidstvo již více jak 5 tisíc let a patří tak v celosvětovém měřítku mezi nejvíce konzumované a oblíbené nealkoholické nápoje. Svoji oblibu získal především díky svým vlastnostem, ať už jde o chuťové, či vonné vlastnosti, ale také díky svým pozitivním zdravotním účinkům na lidský organismus. Těkavé látky tvoří v zeleném čaji celkový aromatický profil a tím tvoří významný parametr pro určení kvality i ceny samotného čaje. Na výskyt těkavých látek v zeleném čaji má vliv mnoho faktorů jako jsou země původu, klimatické podmínky či způsob zpracování.

Těkavé látky v zeleném čaji jsou nejčastěji stanovovány pomocí chromatografických metod, které jsou z důvodů nízkých koncentrací spojeny s předchozím zakoncentrováním pomocí mikroextrakčních metod, kdy mezi nejvýznamnější mikroextrakční techniky pro stanovení těkavých látek v zeleném čaji patří mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) v provedení headspace (HS-SPME). Dalšími důvody pro použití mikroextrakčních metod jsou velmi nízké náklady, nízká časová náročnost, malá spotřeba vzorků a velmi krátká příprava vzorků pro samotné stanovení. Další výhodou SPME je možnost kombinace sorpčních teplot během jednoho extrakčního procesu, díky čemuž lze analyzovat více látek najednou. Kombinaci teplot používaných je nutno optimalizovat, aby v průběhu extrakce nedocházelo k desorpci již nasorbovaných látek na vlákne.

Pro Analýzu izolovaných těkavých látek je nejčastěji používána plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC/FID) nebo s hmotnostním detektorem (GC/MS).

# 1 Teoretická část

## 1.1 Čaj

Čaj je v dnešní době a v dlouhodobém měřítku, po vodě nejvíce konzumovaným nápojem na světě a je značnou částí populace oceňován pro svou charakteristickou chuť, vůni, přínos pro zdraví a pro kulturní význam. Jako čaj pravý lze označit takový čaj, který je vyrobený z výhonků, listů, pupenů nebo jemných částí zdřevnatělých stonků čajovníku *Camellia sinensis* (Linnaeus) O. Kuntze (Obrázek 1), nebo také čaje vyrobené jejich kombinováním. Čajovník je stálezelený subtropický strom nebo keř patřící do rodu *Camellia* L. řadící se do čeledi *Camelliaceae* (čajovníkovité), která sdružuje nejméně 50 druhů. Pro výrobu samotného čaje mají však praktický význam pouze druhy jednoho druhu *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (syn. *Thea sinensis* L.) [1,11].

Legislativa České Republiky pohlíží na čaj formou vyhlášky MZ č. 330/1997 Sb. pro čaj a kávovinu ve znění Vyhlášky č. 91/2000 Sb. a Vyhlášky č. 78/2003 Sb. která označuje čaj za výrobek rostlinného původu sloužící k přípravě nápoje určeného k přímé spotřebě nebo nápoj připravený z tohoto výrobku [2].



Obrázek 1 *Camellia sinensis* [3,4]

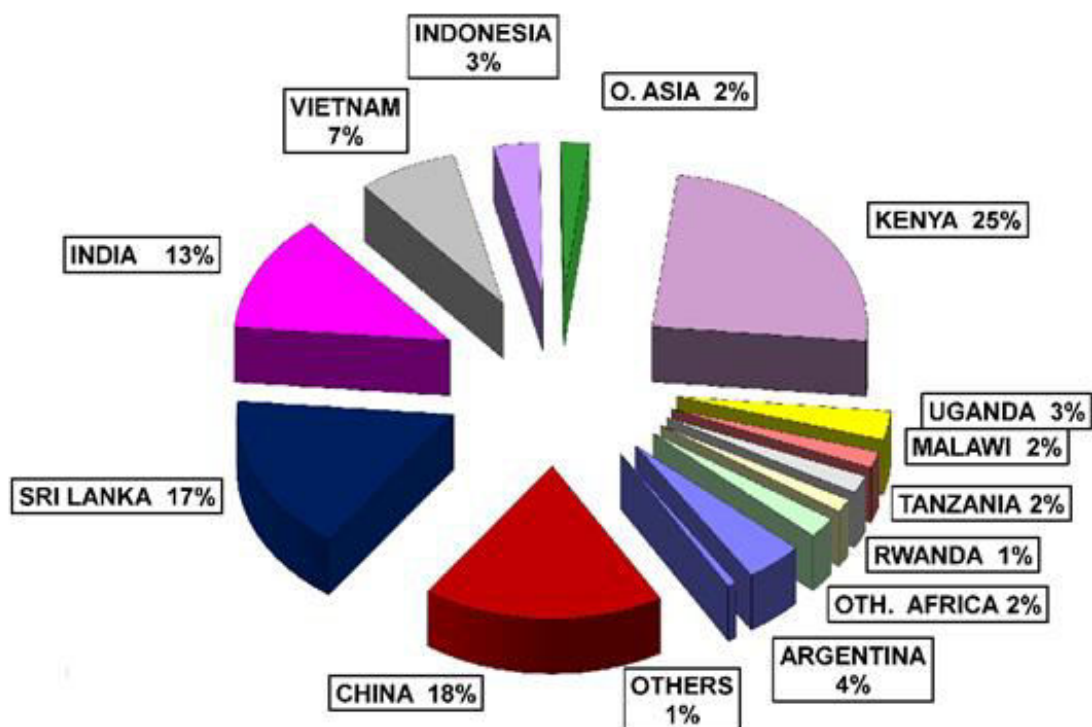
Pěstitelé a zpracovatelé dělí čajovník čínský na základní tři skupiny, tzv. džáty [1]:

- **Čínská skupina:** čajovníky z této skupiny jsou pomalu rostoucí stromy 4-6 metrů vysoké s malými, vzpřímenými, poměrně úzkými, výrazně zoubkovanými, tmavě zelenými listy, jejichž povrch je matný. Čajovníky čínské skupiny jsou odolné k nízkým teplotám a pěstují se především v Číně, Japonsku, Turecku a Indii, především v místech s vyšší nadmořskou výškou [5].
- **Asámská skupina:** na tuto skupinu čajovníků lze hledět jako na skupinu rychle rostoucích vysokých stromů 12-15 metrů vysokých s lesklými a eliptickými listy. Čajovníky jsou poškozovány teplotami pod -4 °C a jako takové mohou přežít pouze ve vysokých nadmořských výškách poblíž rovníku. Čajovníky asámské skupiny jsou pěstovány především v Indii, na Srí lance, Jávě a v Africe [1, 5].
- **Indočínská (kampučijská) skupina:** v porovnání s ostatními skupinami má velmi malý význam. Čaje produkované touto skupinou mají vysokou barvitost v šálku, nálev je drsnější s typickou čajovou vůní a chutí [1].

## 1.2 Země produkující čaj

Na světovém trhu lze nalézt čaje z nejrůznějších koutů světa. V dnešní době máme možnost zakoupit čaje asijské, africké a v menší míře také čaje jihoamerické. Mezi největší producenty čaje na světě řadíme Indii, Čínu, Srí Lanku (Cejlon), Keňa, Turecko, Indonésii, Japonsko a Vietnam. Graf největších světových producentů je zobrazen na obrázku č. 2.

Čaje jsou na trhu označovány z mnoha hledisek. Označují se podle země původu, způsobu zpracování a také podle jakosti značeného čaje. Značení dle způsobu zpracování je pro všechny země sjednocené, rozdíly však nastávají při značení jakosti, kde každá země uplatňuje svoje způsoby značení. Každá země má své typické pěstitelské regiony s vlastními způsoby a technologiemi zpracování čaje a se svým specifickým podnebím. Tyto hlediska značně ovlivňují konečnou barvu, vzhled a chuť čaje. Především z těchto důvodů jsou na trh dodávány čajové výrobky s označením výrobní oblasti pro ověření a valorizaci výsledného produktu [1, 12].



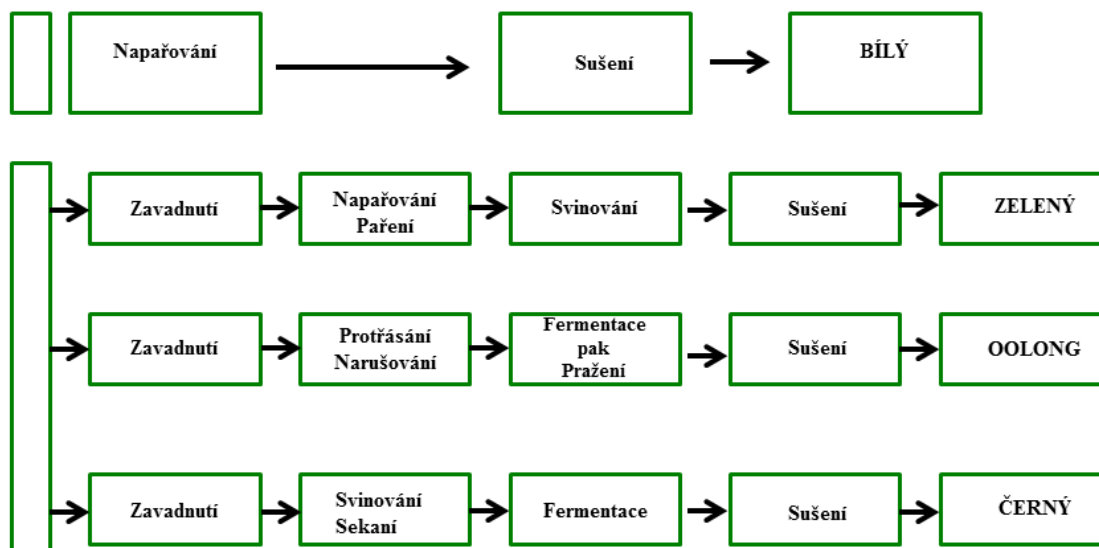
Obrázek 2 Světová produkce čaje [22]

### 1.3 Technologie zpracování čaje

Při výrobě čaje se za první základní materiál považují listy čajovníku *Camellia sinensis*, ovšem v důsledku rozdílů jednotlivých technologií a druhů zpracování, máme dnes širokou škálu druhů čajů s rozdílnými vlastnostmi. Z hlediska technologie zpracování dělíme čaje do tří základních skupin podle dosaženého fermentačního stupně: nefermentované (zelené, bílé), polofermentované (oolong) a fermentované (černé). Fermentací čaje myslíme enzymatický účinek polyfenol oxidasy (PPO), která je v čaji přítomna a katalyzuje oxidaci a kondenzaci polyfenolů na komplexní chinony a taniny. Zelený čaj prochází pouze částečnou fermentací, a to za účelem inaktivace PPO sušením a napařováním. Polofermentovaný čaj oolong podléhá fermentaci ve formě drcení listů a uvolněním PPO, kdy jsou následně listy zahřívány a vysušeny za účelem inaktivace enzymů. Černý čaj podléhá úplné fermentaci, kdy velká většina z celkové



koncentrace přítomných polyfenolů je kondenzována a dochází ke vzniku komplexních polyfenolů, ještě před zahájením inaktivace PPO. Jednotlivé postupy zpracování čaje jsou znázorněny na obrázku č. 3 [12, 13].



Obrázek 3 Schéma výroby jednotlivých druhů čajů [7]

### 1.3.1 Zelený čaj

Zelený čaj je ve světovém měřítku velmi oblíbeným nápojem a to především díky kombinaci příjemné chuti a kladných zdravotních účinků na lidský organismus. Jednotlivé čaje se od sebe liší podle odrůdy, sezóny plnění, půdy, oplodnění, klimatu a posklizňové léčby. Další rozdíly zelených čajů lze hledat v chemickém složení, které má vliv na výslednou kvalitu čajového produktu a také pro určování tržní hodnoty [14]. Zelený čaj je oblíbeným nápojem nejen pro jeho výjimečnou chuť, ale také pro jeho prokázané prospěšné léčivé vlastnosti spojené s jeho konzumací. Zelený čaj podporuje krevní oběh, zlepšuje funkci jater, podporuje metabolismus různých toxinů a je prokazatelně přínosnější než nápoje obsahující přemrštěné množství vitamínů C, E nebo  $\beta$ -karotenu. Mnoho studií již prokázalo, že konzumace zeleného čaje je spojena s prevencí kardiovaskulárních onemocnění, prevencí několika typů rakoviny kůže, plic a jater. Dále bylo prokázáno snížení cholesterolu v séru a prevence oxidace lipoproteinů s nízkou hustotou. Příznivé účinky zeleného čaje na lidský organismus jsou z velké

části připisovány flavonoidům. Z tohoto hlediska lze považovat zelený čaj za takřka ideální nápoj, ovšem některé studie popisují farmakologické účinky zeleného čaje za značně kontroverzní. Hlavním problémem je vysoká koncentrace kofeinu, který může mít negativní vliv na kardiovaskulární systém, deprivaci spánku, potraty a absorpci vápníku vedoucí k osteoporóze. Ironií osudu je, že zelený čaj byl a je stále považován za náhražku kofeinových nápojů pro těhotné ženy, kojence a děti [15- 17].

Hlavním rozdílem mezi černými čaji a čaji zelenými je samotné technologické zpracování. Při výrobě zeleného čaje je vynechán krok fermentace. Z tohoto důvodu nedochází k přeměnám přítomných tříslovin (polyfenolů) a chlorofylu, a proto si čaj ponechává svoji charakteristickou zelenou barvu. Čajové listy jsou spařeny při teplotách v rozmezí 85-90 °C, kdy se při těchto teplotách inaktivují enzymy. V dalších krocích se čajové listy suší při teplotě 95 °C a následně jsou svinovány, tříděny a dosušovány. V konečné fázi výroby jsou vysušené listy čajovníku vyleštěny a vytríděny stejným způsobem jako u čajů černých a následně jsou zabaleny. Výsledný nálev ze zeleného čaje má slámově žlutou barvu, která přechází až do žlutozelené, disponuje typickou vůní a charakteristickou svíravou chutí [1].

### **Postup při zpracování:**

#### **Sběr**

Sběr je jedním z nejdůležitějších kroků při výrobě, jelikož je na něm závislá konečná jakost čaje. Důležitá je především správná a včasná sklizeň v době, kdy se mladé listy začínají rozvíjet. U nejkvalitnějších čajů je častá ruční sklizeň, u které se dbá na správné odlamování výhonků. Při sklizni jsou ulamovány koncové výhonky tzv. fleše [6].

#### **Zavadnutí**

Zpracovatelské závody z většiny případů leží bezprostředně v blízkosti plantáží, jelikož si nemohou dovolit dlouhou přepravu sklizených lístků čaje. Aby mohli být čajové lístky dále zpracovávány, je nutné z nich odstranit část vody. Toho se dosahuje zavedeným postupem zavadnutí na drátěných lískách, kde jsou listy rovnoměrně rozvrstveny a v pravidelných intervalech se obrací. Během tohoto procesu začínají biochemické přeměny jako například zvyšování koncentrace aminokyselin, kofeinu, organických kyselin, polyfenolů a polyfenolová oxidáza je transformována z latentní na aktivní formu. Dále se zvyšuje permeabilita buněčné membrány, což umožňuje snadnější narušení buněčného obsahu v dalších krocích postupu výroby [8,9]. Příklad haly určené pro zavadnutí lístků je vyobrazen na obrázku č. 4.



Obrázek 4 Hala pro zavádání čajových lístků [34]

### **Svinování**

V tomto kroku dochází k zahájení enzymatické oxidace flavanolů molekulárním kyslíkem. Zvadnuté listy se stáčí a tím se poškozuje buněčná struktura a následně je uvolněna buněčná šťáva, která reaguje se vzdušným kyslíkem. Tento krok je popisován názvem svinování, ovšem ve skutečnosti zahrnuje kroky řezání a stlačování. Svinování probíhá ve stáčecích přístrojích po dobu alespoň 30 minut [8, 9]. Na obrázku č.5, lze vidět roller pro svinování čajových lístků.



Obrázek 5 Roller na svinování čaje [35]

## **Sušení**

Fermentovaný čaj se ihned vystavuje teplotám zhruba 90 °C pro přerušení fermentačního pochodu. Pro tento krok se využívají komory s rychlým přečerpáváním horkého vzduchu nebo průmyslové sušárny [9].

## **Třídění a balení**

Následujícím krokem je krok třídění a následné balení. Černé čaje se dělí do několika skupin: čaje listové (leaves), čaje zlomkové (brokens), čajové drtě (fannings) a čajový prach (dust) [1].

## **Technologie přípravy čaje:**

Mezi nejnovější způsoby přípravy čaje patří technologie CTC, kdy CTC zkratka vznikla spojením slov „crushing”(drcení) „tearing” (trhání) „curling” (svinování). Při využití metody CTC je list nejprve ponechán zavadnout, následně se jednou svine a poté se pomocí stroje roztrhá. Výhodou této metody je že se buněčné membrány listů rozruší rychleji a efektivněji než při klasickém postupu. Listy prochází strojem třikrát až čtyřikrát a následně se ponechávají fermentovat. Touto metodou se převážně vyrábějí sáčkové čaje, kde se rychle uvolňuje vůně a chuť. Druhou hojně používanou metodou je technologie LTP, kdy zkratkou LTP pojmenováváme „Lawrie Tea Processor” což je označení pro zkrácený způsob zpracovávání čajových listů. Převážně je tento způsob využíván pro výrobu sáčkových čajů [1,10].

## **1.4 Těkavé látky v zeleném čaji**

Výskyt těkavých látek v zeleném čaji přispívá především k výslednému aromatickému projevu, naopak netěkavé látky vyskytující se v zeleném čaji udávají chuťové vlastnosti, které jsou velmi typické a projevují se svojí charakteristickou hořkostí a astringencí. Astringence je popisována jako hmatový pocit na jazyku, který vyvolává reakce mezi čajovými polyfenoly a bílkovinami vyskytujícími se ve slinách [13]. Z hlediska zaměření diplomové práce bude upřena pozornost pouze těkavým látkám vyskytujícími se v zeleném čaji.

Těkavé látky mají vliv na aroma, které je velmi důležité pro konečnou podobu zeleného čaje, mají tedy vliv na celkový vjem z výsledného čaje a můžou tak ovlivnit i konzumenta [12].

Těkavé látky v zeleném čaji zabírají zhruba 0,01-0,02 % z celkové sušiny čaje. Zelený čaj je na celkový obsah těkavých látek 4-5 krát chudší než čaj černý. Z více než 300 identifikovaných

těkavých látek vyskytujících se v čajích lze považovat za důležité pouze některé. Těkavé látky jsou tvořeny v souvislosti s významnou degradací lipidů v období, kdy je čaj zpracováván. Většina aromatických sloučenin je tvořena aminoskupinou kyseliny, mastné kyseliny, karotenoidy a glykosidy. Těkavé sloučeniny lze rozdělovat na neterpenoidy, které vznikají rozkladem mastných kyselin a jsou nositeli čerstvé zelené příchutě a jejich hlavní složkou jsou monoterpenické alkoholy např. (3Z)-hex-3-en-1-ol, (2E)-hex-2-enal a hexanal, poskytující květinovou sladkou vůni a terpenoidy včetně alkoholů a aldehydů jako hlavního zdroje aromatu zeleného čaje [12, 16, 18, 19]. Další významné těkavé látky odpovědné za aroma zeleného čaje jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka 1 Výskyt těkavých látek odpovědných za aroma čaje [36]

<b>Neterpenoidní látky</b>	<b>Terpenoidní látky</b>
Isovaleraldehyd	Linalool oxide, (Z)-furanoid
2-Ethylfuran	Linalool oxide, (E)-furanoid
Hexanal	Benzaldehyde
1-Penten-3-ol	Linalool
Heptanal	$\beta$ -cyclocitral
(Z)-3-hexenal	Ho-trienol
(E)-2-hexenal	1-Ethylformylpyrrole
Penten-1-ol	Phenylacetaldehyde
(Z)-2-Penten-1-ol	$\alpha$ - Terpineol
Hexan-1-ol	Linalool oxide, (Z)-pyranoid
(Z)-3Hexen-1-ol	Linalool oxide, (E)- pyranoid
Nonanal	Methylsalicylate
(E)-2-hexen-1-ol	Nerol
(E)-2,4-Beptadienal	Geradiol
(E,E)-2,4-Heptadienal	Benzy alcohol
	Nerolidol
	Bovolide
	Dihydroactimdiolide

### **Neterpenoidní látky**

Látky spadající do skupiny neterpenoidních jsou produktem rozpadu lipidů a především nenasyčených mastných kyselin, působením lipoxygenázy. Dále lze do této skupiny zařadit kyselinu linoleovou tvořící c-3-hexenal, který je následně redukován na cis-3-hexenol neboli

alkohol oxidoreduktáz a částečně izomerizován na trans Z-hexenal enzymem izomerázou. Některé neterpenoidní látky jsou snižovány na trans-2-hexenol, jako například kyselina linolová tvořící n-hexanal, dále tvořící n-hexanol. Stejným principem probíhá degradace kyselin olejové a palmitové, které tvoří *n*-nonanal, *n*-nonanol, *n*-heptanal a *n*-heptanol. Obdobnými procesy vznikají 1-okten-3-on a 1-oktan-3-ol z kyseliny linolové, a také 1-penten-3-on, 1-penten-3-ol, cis-3-penten-1-ol a cis-3-penten-1-on z kyseliny linolenové za působení enzymů oxidoreduktáza izomeráz. Neterpenoidní látky, které jsou produkty degradace tuků během výroby čaje, mají nežádoucí vliv, jelikož mohou za trávnatý zápach a snižují tak sensorickou hodnotu výsledného čaje. Na druhou stranu jsou u zeleného čaje nositeli charakteristické zelené chuti [20, 21].

### **Terpenoidní látky**

Druhou skupinou těkavých látek ať už v zeleném nebo černém čaji jsou látky terpenoidní. Tyto látky jsou z převážné části odvozeny od glykosidů a zahrnují terpenoidy, aromáty a jiné neterpenoidy. Terpenoidní látky jsou sestaveny z oxidačních látek iniciovanými enzymy z rozpadu karotenoidů a hydrolyzou terpenoidních glykosidů. Někteří ze zástupců vznikají rozpadem z aminokyselin a cukrů pomocí Steckerovi a Maillardovy reakce. Tyto reakce znamenají významnou roli při hnědnutí potravin. Terpenoidní látky dodávají čaji sladkou květinovou vůni [20, 21].

## **1.5 Extrakce**

Extrakci řadíme mezi základní analytické separační metody, která si i nadále drží pevné postavení i v moderní analýze. Při analýze zeleného čaje využíváme extrakci jako přípravný krok před samotnou analýzou a to především kvůli nedostačující citlivosti a vlivu matrice na stanovení. U potravinářských materiálů se nejčastěji uplatňuje extrakce typu pevná fáze-kapalina. V tomto systému je za pevnou fázi považován potravinářský materiál a k samotné extrakci používáme horkou vodu, organická rozpouštědla a oxid uhličitý v nadkritickém stavu. Pokud používáme jako extrakční činidlo vodu, lze popsat proces extrakce jako vyluhování nebo také jako extrakce v jednom stupni. Extrakce jako taková má významný vliv na samotnou potravinářskou technologii, kde dochází k oddělování významných látek z přírodních materiálů, jako příklady lze uvést semena olejnatých rostlin při výrobě oleje, kávová zrna při výrobě kávy, nebo čajové lístky při výrobě čaje. Vlastní proces je velmi složitý a lze ho popsat matematickými vztahy, které vždy platí pouze s určitým omezením. Pro provedení každého procesu, především pro výpočet extraktoru je velmi důležitá znalost rovnovážných závislostí, které mezi extrakcemi

kapalina-kapalina a kapalina-pevná fáze nevykazují významnější rozdíl, jelikož jejich rovnovážné křivky lze měřit se stejnou přesností. Velmi důležité je přesně definovat fyzikální stav pevné fáze, a to především stupeň a způsob narušení materiálu [15,24].

### 1.5.1 Extrakce rozpouštědlem

Nejprve je nutné si uvědomit, v jakém uspořádání proces extrakce provádíme. Tato problematika velmi úzce souvisí nejenom s technologií procesu, mechanismem procesu, ale hlavně s charakterem ustanovení rovnováhy. V zásadě lze extraktory rozdělit na:

**Ponorné (imerzní):** Naprosto typickým příkladem tohoto uspořádání je příprava turecké kávy. Proces v těchto extraktorech je obvykle nejbližší rovnovážným podmínkám. V extraktoru je velký nadbytek rozpouštědla oproti extrahované látce, která musí být v extrakčním činidle ponořena. Takto uspořádaná extrakce je velmi neefektivní, jednak z důvodů nízké koncentrace extrahované látky tak i pro velkou spotřebu extrakčního činidla.

**Skrápěné (perkolační):** V tomto uspořádání je velmi důležitá filtrační přepážka, oddělující roztok od částic extrahovaného materiálu. Pro perkolační extraktory je typický proces, kdy je extrahovaný materiál ve vrstvě v klidu a je skrápěn rozpouštědlem, které přes tuto vrstvu protéká. Poměr rozpouštědla k materiálu je menší než u extraktorů ponorných a výhodou je i vyšší koncentrace extrahované látky [24].

### 1.5.2 Extrakce kapalina-kapalina

Extrakci v systémech kapalina-kapalina lze považovat za rovnovážnou techniku dělení látek podle rozdělovacích konstant mezi vodnou fází a fází organickou, která je nemísitelná s vodou. Tato separační technika je již dobře zavedená a je využívána i v dnešní době přes řadu nevýhod, jako například, že při provádění extrakce kapalina-kapalina spotřebováváme velké množství rozpouštědel, ve většině případů toxických, a také že vzorky mají tendenci při protřepávání přecházet na emulze. V dnešní době se nejčastěji používá on-line LLE, která je prováděna opakovaným dávkováním vodného vzorku do organického rozpouštědla a následně je směs protřepávána. Po provedené extrakci jsou jednotlivé fáze odděleny pomocí semipermeabilní membrány nebo fázového separátoru sendvičového typu. Oddělená organická fáze společně se zachyceným analytem je převedena do převodníku na dávkování velkých objemů a malá část cca 100-500  $\mu\text{l}$  je přímo dávkována do GC [37].

### 1.5.3 Mikroextrakce na pevné fázi

Mikroextrakci na pevné fázi (SPME) je jednoduchá a účinná sorpčně/desorpční technika sloužící pro zakoncentrování zkoumaného vzorku. Principem SPME je expozice malého množství extrakční fáze nadbytkem vzorku. Metoda SPME je využívána jako přípravný krok před analýzou vzorků za účelem získání dostatečného množství čistého vzorku bez případných interferencí. Při metodě SPME jsou zkoumané analyty adsorbovány na vlákne po dobu, než je dosaženo rovnováhy. Metodu SPME je možné využít jak pro kvalitativní tak pro kvantitativní analýzu, kdy nám metoda udává velmi přesné a správné výsledky a dále nám poskytuje kalibrační křivky v širokém koncentračním rozmezí. Značnou výhodou je, že při správné volbě vlákna lze dosáhnout reprodukovatelných výsledků i pro velmi malá množství vzorků. SPME má v praxi velkou výhodu oproti klasickým metodám pro přípravu vzorků jako je extrakce kapalina-pevná látka, kapalina-kapalina, především proto, že není nutné používat složité přístroje ani velká množství organických rozpouštědel. Základním kamenem SPME je křemenné vlákno (obrázek č. 6), které je pokryto různými typy stacionární fáze, které se mohou lišit sorpčními vlastnostmi nebo polaritou.



Obrázek 6: SPME vlákno [38]

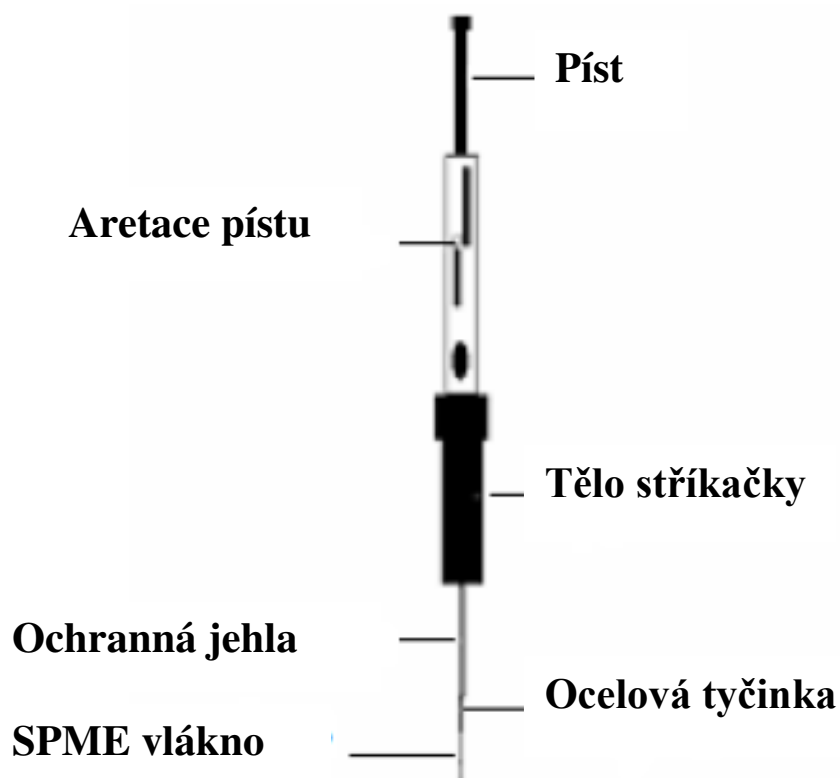
Jednotlivé rozdíly a možnosti aplikace jsou uvedeny v tabulce č. 2. Nenavázané fáze jsou stabilní pouze v organických rozpouštědlech mísitelných s vodou, v těch je možnost, že budou slabě bobtnat, proto nesmí být nikdy čištěny nepolárními organickými rozpouštědly. Z tohoto důvodu není možné čistit je nepolárními rozpouštědly. Vázané fáze jsou stabilní ve všech organických rozpouštědlech [25].



Tabulka 2 Přehled vláken používaných pro SPME [25]

Stacionární fáze/tloušťka vrstvy	Zkratka názvu stacionární fáze	Typ fáze	Určeno pro chromatografii	Doporučeno pro analýzu
<b>polydimethylsiloxan</b> 100 μm	PDMS	nevázaná	GC/HPLC	Těkavé látky
30 μm		nevázaná	GC/HPLC	Nepolární, středně těkavé látky
7 μm		vázaná	GC/HPLC	Slabě polární až nepolární středně těkavé látky
<b>polydimethylsiloxan/ divinylbenzen</b> 65 μm	PDMS/DVB	vázaná	GC	Polární těkavé látky
60 μm			HPLC	Obecné užití (pouze HPLC)
<b>StableFlex™</b> 65 μm			GC	
Polyakrylát 85 μm	PA	vázaná	GC/HPLC	Polární, středně těkavé látky
<b>Carboxen™/polydimethylsiloxan</b> 75 μm	CAR™/PDMS	vázaná	GC	Stopové koncentrace těkavých látek
<b>StableFlex™</b> 85 μm			GC	
<b>Carbowax™/divinylbenzen</b> 65 μm	CW™/DVB		GC	Polární látky
<b>StableFlex™</b> 70 μm			GC	
<b>Carbowax™/pryskyřice</b> 50 μm	CW™/TPR		HPLC	Povrchově aktivní látky, (pouze HPLC)
<b>Divinylbenzen/Carboxen™ M</b> /polydimethylsiloxan	DVB/CAR™/ PDMS		GC	Těkavé a středně těkavé látky
50 μm/30 μm			GC	C3-C20
50 μm/30 μm			GC	

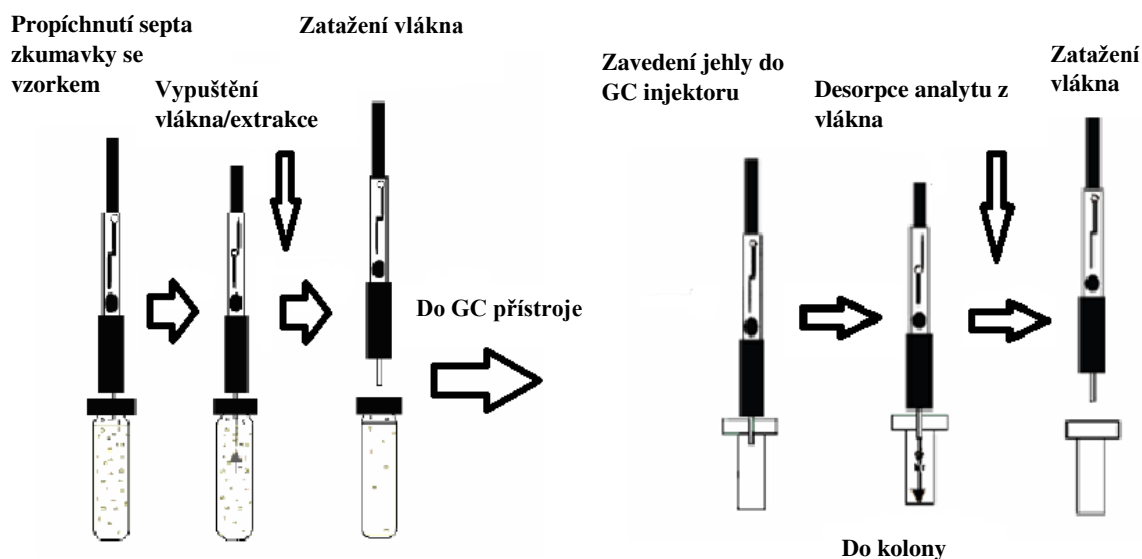
Zařízení pro SPME lze rozdělit podle dvou základních provedení na manuální SPME (obrázek č. 7) a SPME s automatickým dávkovacím systémem („autosamplerem“ SPME). V současné době jsou využívány plně automatizované vzorkovací zařízení pro analýzu vodných vzorků pomocí online SPME. Vzorek je kontinuálně čerpán přes skleněnou průtokovou celu, namontovanou na automatický dávkovač a vlákno je v intervalech ponořováno do protékajícího vzorku. Vzorek je umístěn ve skleněné nádobě a je čerpán přes skleněnou průtokovou celu pomocí peristaltického čerpadla [40].



Obrázek 7 SPME v manuálním uspořádání [39]

### 1.5.3.1 Provedení SPME

Proces SPME se skládá ze dvou hlavních částí. Z procesu extrakce a z procesu desorpce. Extrakční proces se skládá z více jednoduchých kroků. Vlákno se stáhne pomocí pístu do jehly stříkačky a následně se propíchne septum vialky, ve které je umístěn vzorek. Vlákno se pomocí pístu vytlačí do kapaliny nebo do plynné fáze. Organické analyty se zachytí na stacionární fázi podle sorpčních vlastností a po provedení sorpce se vlákno zasune do jehly a stříkačka se přesune do plynového chromatografu. Jehlou se propíchne septum dávkovače vyhřátého na požadovanou teplotu. V plynovém chromatografu dochází k termodesorpci. Extrakční proces je znázorněn na obrázku č. 8 [40].



Obrázek 8 Proces extrakce metodou SPME [39]

#### 1.5.4 Extrakce plynnou fází „head-space“

Podle způsobu odběru plynné fáze lze metodu „head-space“ na statickou a dynamickou. Tento způsob extrakce je používán výhradně pro analýzu pevných a kapalných vzorků s obsahem těkavých látek, které jsou odebírány v uzavřeném prostoru nad analyzovaným vzorkem.

##### Statická metoda „head-space“

Při statické „head-space“ metodě se analyzuje vzorek plynu odebraný z prostoru nad kondenzovanou fází v uzavřeném prostoru, který je v dynamické rovnováze. V případě tohoto provedení se koncentrace složek v koexistujících fázích nemění, a to i v případě, že při odběru dojde k porušení rovnováhy. Stupeň porušení rovnováhy je závislý na množství odebraného vzorku a také na způsobu odběru. Nevýhodou této metody je nízká citlivost a s klesající těkavostí analyzovaných látek klesá také výtěžnost metody [37].

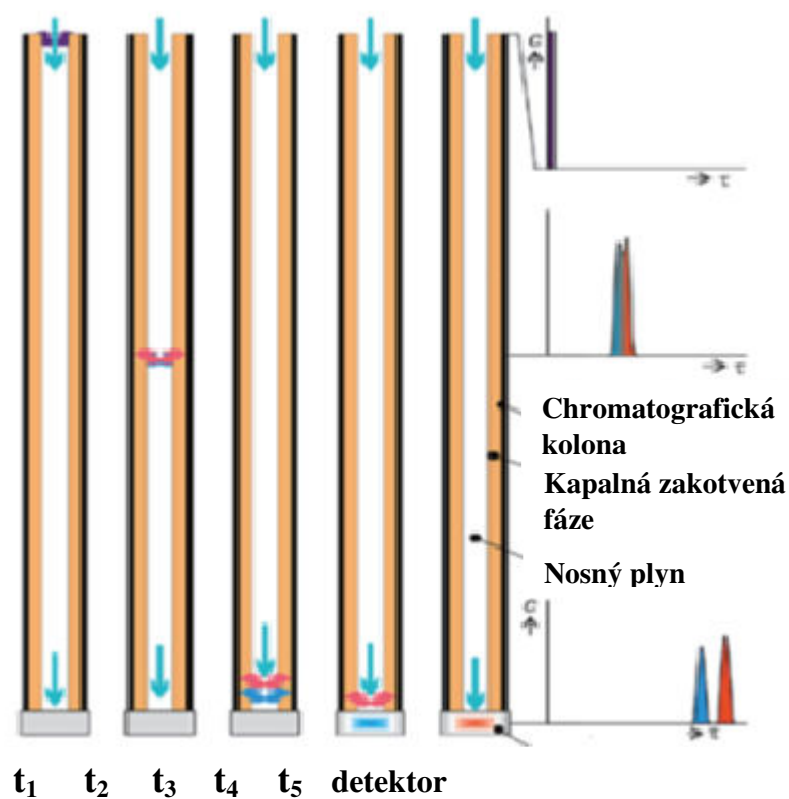
## **Dynamická metoda „ head-space “**

Princip metody je založen na extrakci kontinuálně protékající kapaliny inertním plynem, čímž dosáhneme izolace analytů z matrice vzorku. Těkavé látky jsou zachytávány v kolonkách naplněných sorbentem a z něj jsou následně desorbovány kapalinou nebo zvýšenou teplotou do chromatografické kolony. I když je systém pomocí stripování plynem neustále vyvracen z rovnováhy, předpokládáme, že můžeme i za takových podmínek dosahovat kvalitních výsledků. Míra sorpce závisí na míře interakcí mezi analytem a sorbentem a na typu samotného sorbentu. Významnou roli hrají v procesu termodynamické a kinetické faktory (teplota a rychlost průniku plynu), ale také faktory geometrické a materiálové (velikost částic sorbentu, délka kolony, hustota náplně, množství vzorku a vlhkost nosného plynu). Pro správnou volbu vhodného systému je důležitým kritériem ochota izolovaných látek přejít do inertního plynu, která je přímo úměrná teplotám varu a také afinita izolovaných látek k vodě [37].

## **1.6 Plynová Chromatografie**

Chromatografie se řadí mezi analytické metody využívané pro analýzu komplexních vzorků, pro které není k dispozici detektor s požadovanou specifitou pro jednotlivé komponenty směsi. Obecně se jedná o fyzikální metodu založenou na rozdílech v rozpustnosti látek distribuovaných mezi mobilní a stacionární fázi. Plynová chromatografie (GC) zahrnuje plynnou mobilní a kapalnou nebo pevnou fázi stacionární. Plynová chromatografie se vyznačuje fenomenálně rychlým vývojem od první zmínky o této technice. Důvody pro tento rychlý rozvoj lze hledat ve výhodách GC mezi, které lze zařadit snadná proveditelnost, vysoká citlivost, malá spotřeba vzorku, malé množství odpadu, relativně nízké náklady a snadná automatizace. V dnešní době se jedná o jednu z nejčastěji používaných separačních metod pro stanovení těkavých látek v zeleném čaji [41].

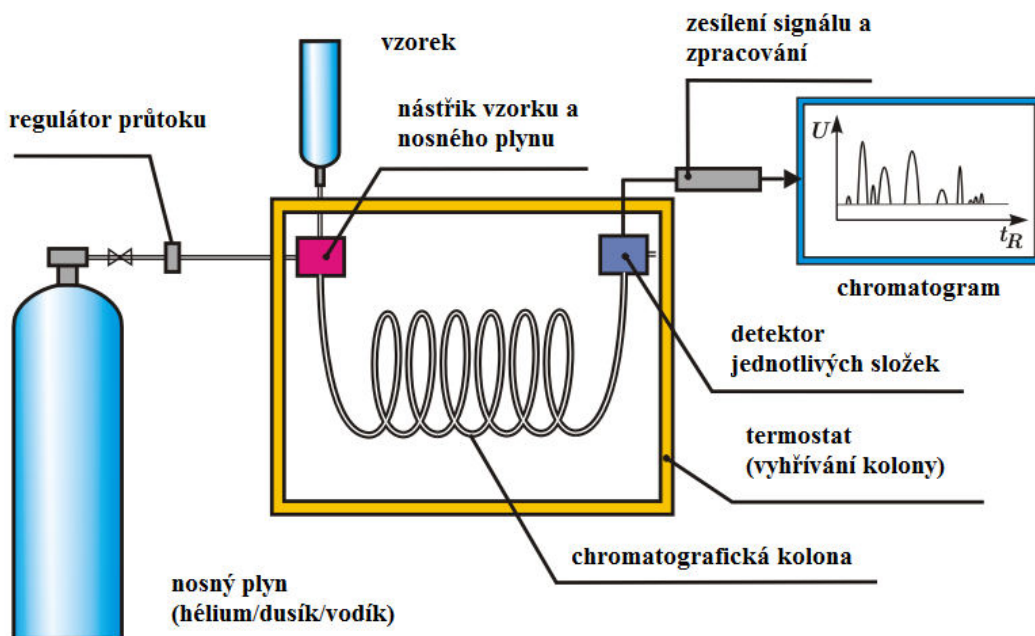
Princip plynové chromatografie lze popsat jako proces, kdy je směs plynů rozdělována na chromatografické koloně se stacionární fází, což může být kapalina nebo pevná látka interagující se složkami vzorku unášeného proudem nosného plynu, který slouží jako mobilní fáze. Při průchodu přes kolonu jsou jednotlivé složky na koloně zadržovány a to úměrně k míře absorpce kapalinou nebo absorpce na povrch pevných částic stacionární fáze [42]. Zjednodušený princip je znázorněn na obrázku č. 9.



Obrázek 9 Princip plynové chromatografie [42]

### 1.6.1 Instrumentace V GC

Plynový chromatograf (obrázek č.10) se skládá ze zásobníku nosného plynu, regulátoru průtoku nosného plynu, dávkovacího zařízení, termostatu, kolony, detektoru a vyhodnocovací techniky.



Obrázek 10 Plynový chromatograf [43]

### 1.6.2 Dávkovací zařízení

Pro dávkování vzorku u plynové chromatografie používáme injekční stříkačku, pomocí které, zavádíme vzorek přes gumové septum do proudu nosného plynu, který se rychle odpařuje v hlavě kolony. Vzorek musíme dávkovat tak abychom zachovali co možná nejkratší délku sloupce vzorku. Zbytky vzorku, které zůstávají v injekční oblasti, by měli být před zahájením analýzy systémem odstraněny. Většina průmyslově vyráběných chromatografů je vybavena dvěma základními dávkovacími systémy split, splitless [42, 44].

**Split:** Při této metodě je většina nosného plynu vstupním otvorem odvedena ven z chromatografu a pouze velmi malá část tohoto proudu je uvedena na kolonu. Ve split programu je vzorek nejprve odpařen a na základě splitovacího poměru je část vzorku vedena do chromatografické kolony a zbytek vzorku je odveden. Splitovací poměr se pohybuje od 1:5 do 1:1000 [44].

**Splitless:** Tato technika spočívá v dávkování veškerého vzorku, společně s malým přídavkem rozpouštědla zatímco vzorek se udržuje při teplotě 10-30 °C pod teplotou varu tohoto rozpouštědla [44].

### 1.6.3 Nosný plyn

Výběr nosného plynu je jedním ze základních kritérií v celém procesu. Nosný plyn musí být inertní a nesmí reagovat s analyzovanými složkami. Dalším kritériem při výběru nosného plynu je použitý detektor, protože některé detektory správně pracují pouze s určitým nosným plynem. Nejčastěji používané nosné plyny jsou dusík, helium, argon a při nižších teplotách lze použít i vzduch [42].

### 1.6.4 Kolona

Chromatografická kolona je část chromatografu nesoucí stacionární fázi. U plynové chromatografie rozeznáváme tyto typy kolon:

**Náplňové kolony:** stacionární fáze je navázána na pevné částice, kterými je následně kolona naplněna. U náplňových kolon využíváme pro zachytávání složek analyzovaných směsí adsorpci na povrch pevné hmoty, nebo adsorpci na tenkém filmu kapaliny zakotveném na pevném nosiči. Náplňové kolony jsou vyrobeny nejčastěji z mechanicky a chemicky odolných materiálů, nejčastěji ze skla a oceli [42].

**Kapilární kolony:** jedná se o tenké kapiláry o vnitřním průměru 0,1-0,5 mm. V dnešní době jsou vyráběné z taveného křemene, který je potažen vrstvou polyimidu, který dělá kolonu pružnou a tvrdou. Rozlišujeme tři základní typy kapilárních kolon.

- WCOT (Wall Coated Open Tubular): u tohoto druhu je na stěnách kapiláry zakotvená kapalina.
- SCOT (Support Coated Open Tubular): u kapilárních kolon typu SCOT je na stěnách kapiláry umístěn nosič, na který je navázána kapalina.
- PLOT (Porous Layer Open Tubular): za kolony tohoto typu považujeme takové, které mají na stěně kapiláry zachycen pórovitý adsorbent [41].



Obrázek 11 Jednotlivé druhy kapilárních kolon [45]

### 1.6.5 Detektor

Z mnoha typů detektorů, které byly v průběhu let navrženy lze považovat za nejpoužívanější detektory tepelně vodivostní, plamenově ionizační a detektor elektronového záchytu především díky jejich jednoduchosti, robustnosti a vysoké citlivosti pro velkou řadu látek [41, 42].

**Plamenově-ionizační detektor (FID):** FID detektory disponují vysokou citlivostí, širokým dynamickým rozsahem a mimo několik nízkomolekulárních látek schopností analyzovat veškeré látky obsahující uhlík. Detekci lze popsat jako proces, kdy vodík se smísí s eluentem z chromatografické kolony a začíná hořet v malé trysce. Cylindrická elektroda je obklopena plamínkem a následně mezi trysku a elektrodu je vkládáno vysoké napětí, které vybírá v plameni vzniklé ionty. Na konci detekce je pomocí vysokoimpedačního zesilovače zesílen výsledný proud a přes výstup z chromatografu je veden do vyhodnocovacího systému [46].

**Detektor elektronového záchytu (ECD):** ECD je složen z ionizační komůrky se zdrojem  $\beta$  záření (nikl-63) a trysky přivádějící inertní plyn. Inertní plyn je následně ionizován  $\beta$  paprsky a vytváří tak tok volných elektronů. Ionizační cela je připojena ke zdroji potenciálu, následně vložený potenciál zahájí migraci volných elektronů a to směrem k anodě, kde jsou vybírány. Jakmile se dostanou elektrofilní sloučeniny do detektorové cely okamžitě dochází k reakci s volnými elektrony a v důsledku reakce jsou rychle se pohybující elektrony zaměněny za pomalé negativní ionty. Poté tedy dochází ke vstupu elektrofilní látky do detektoru a k poklesu proudu, což detektor zaznamená jako pík [46].

**Tepelně vodivostní detektor (TCD):** TCD využívá principu rozdílných tepelných vodivostí nosného plynu a analyzované složky směsi. Konstrukce detektoru je velice jednoduchá, detektor



se skládá z komůrky válcového tvaru, v jejíž ose se nachází elektrickým proudem vytápěný drátek, ve většině případů platinový. V průběhu analýzy se mění teplota drátku, což se projeví změnou odporu, který se převádí na elektrické napětí [42].

## **1.7 Návrh experimentů a analýza dat**

Návrh experimentů a analýza dat (DOE) je v dnešní době zaváděna do výrobního procesu jako nejúčinnější prostředek pro zajištění kvality a spolehlivosti prováděného procesu. DOE je velmi účinným nástrojem, který je lehce zaveditelný již do rané fáze vývojového cyklu. Dnes se již DOE využívá v mnoha odvětvích průmyslů (automobilový, polovodičový, zdravotnický či chemický), nicméně není omezen pouze na inženýrství, lze ho snadno uplatnit v administraci nákladů, zlepšení účinností operačních procesů nebo vytvoření lepších reklamních strategií. DOE používáme k rychlému zjištění rušivých prvků a eliminaci jejich vlivů na experiment. Následně můžeme poskytnout návrh pro zefektivnění procesu a ke zvýšení spolehlivosti [47].

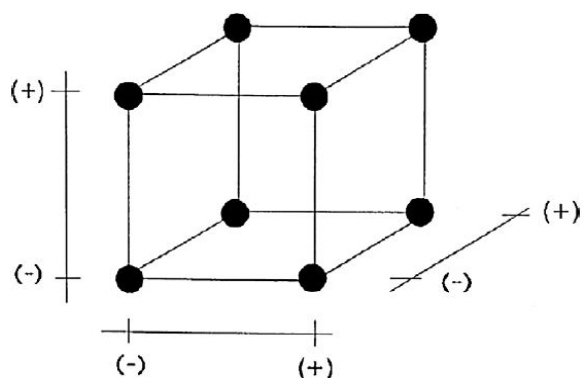
Pro zajištění vyšší spolehlivosti analyzujeme přenosové funkce, což je vztah mezi vstupními proměnnými a výstupní odezvou, které lze analyzovat v případě, že jsou již malá množství proměnných identifikována jako důležitá pro jejich vliv na výkon nebo reakci systému. Pokud se funkce přenosu vyskytuje mezi proměnnými a odpověďmi, lze ji využít pro optimalizaci systému. DOE nám poskytuje inteligentní sekvenční strategii pro posunutí experimentu do oblasti obsahující optimálně nastavené proměnné. Mimo optimalizaci systému lze použít techniku DOE pro zjištění robustnosti systému, která zahrnuje faktory prostředí a ostatní faktory [47].

### **1.7.1 Faktorový plán**

Faktorový plán patří mezi nejobecnější a nejčastěji používaný design, který vyžaduje počet experimentů rovný  $2^k$ , kde  $k$  vyjadřuje počet proměnných. Každá proměnná se vyskytuje ve dvou úrovních kódovaných jako +1 (vyšší úroveň) a -1 (nižší úroveň). Pro 3 faktory ve dvou úrovních jejich hodnot bude výsledný počet experimentů  $2^3 = 8$  jak lze vidět v tabulce č. 3 [48, 49]. Grafické vyobrazení faktorového plánu lze vidět na obrázku č. 13.

Tabulka 3 Experimentální matrice  $2^3$  [48]

Faktor A	Faktor B	Faktor C
-1	-1	-1
1	-1	-1
-1	1	-1
1	1	-1
-1	-1	1
1	-1	1
-1	1	1
1	1	1



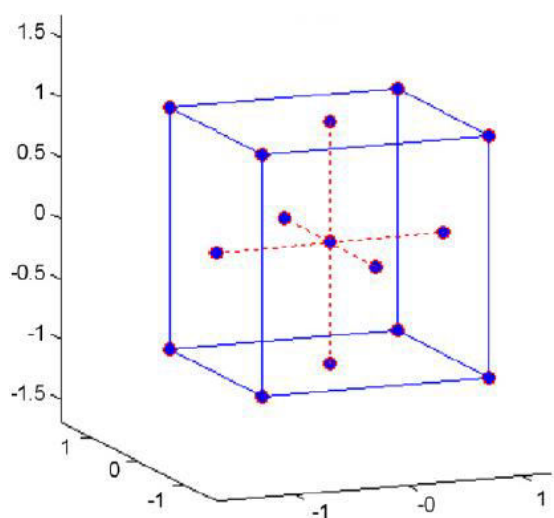
Obrázek 12 Grafické znázornění modelu  $2^3$  [48]

### 1.7.2 Hvězdicový plán

Hvězdicový plán slouží k odhadu zakřivení plochy. I v tomto případě je budování experimentální matice poměrně jednoduché a obdobné jako u faktorového plánu, nicméně hvězdicový plán disponuje třemi úrovněmi na faktor značenými -1, 0, 1 (tabulka 4), ovšem vyhýbá se rohům prostoru a vyplňuje kombinace centra a extrémních úrovní [48-50]. Na obrázku č. 14 je vyobrazeno grafické znázornění hvězdicového modelu.

Tabulka 4 Experimentální matice hvězdicového plánu [45]

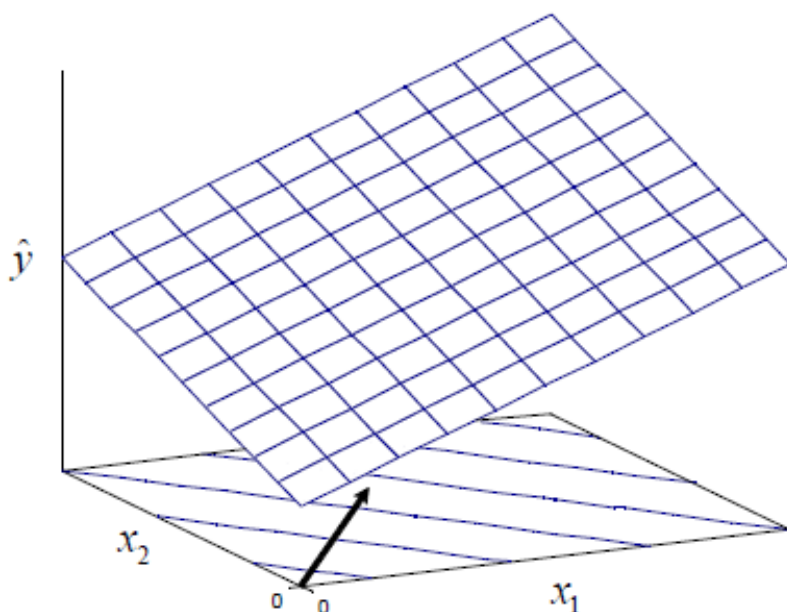
Faktor A	Faktor B	Proměnná	Klasifikátor	$Y_1$	$Y_2$
-1	-1	5	1	79,00	0,05
1	-1	15	1	66,58	1,44
-1	1	5	3	63,50	0,03
1	1	15	3	58,42	0,50
-1	0	5	2	80,75	,001
1	0	15	2	69,22	0,88
0	-1	10	1	73,25	0,40
0	1	10	3	63,31	0,08
0	0	10	2	77,31	0,12



Obrázek 13 Grafické znázornění hvězdicového modelu [48]

### 1.7.3 Metoda odezvové (responzní) plochy

Metoda odezvové plochy RSM (Response Surface Methodology) je používána k odhadu přenosové funkce v optimální oblasti. Slouží k optimalizaci podmínek. Využívá se kvadratický model. Při modelování se používá matematická funkce vyjadřující celkovou variabilitu pozorované odezvy (závisle proměnné  $y$ ) vlivem vstupních faktorů (nezávisle proměnné  $x_1, x_2, \dots, x_i$  a náhodné složky ( $\epsilon$ ), která v sobě zahrnuje chybu měření a chybu modelu konkrétního rozdělení pravděpodobností [47,50].



Obrázek 14 Grafické znázornění odezvodé plochy [47]

## 1.8 Stanovení těkavých látek v zeleném čaji

Z předpokladu, že čaj je v globálním měřítku jedním z nejoblíbenějších nápojů a také vzhledem k tomu že se s čajem obchoduje po celém světě, je velmi důležité dohlížet na kvalitu čaje a chránit tak konzumenty. K těmto účelům je nezbytné, aby celníci a obchodní vyšetřovatelé získali jednoduchou a spolehlivou metodu pro kontrolu a odlišování čaje, která by přinesla zamezení klamavých technik, kvůli kterým jsou spotřebitelé uváděni v omyl. Do této doby neexistovala standardní a mezinárodně uznávaná metoda pro klasifikace čaje kromě metod sensorických, které požadují zkušené a proškolené odborníky na čaj. Nejdůležitějším parametrem je tzv. chuť čaje, která je popsána chutí a vůní. V minulosti byl zaměřen výzkum především na organické složky odpovědné za chuť čaje, jako jsou polyfenoly, kofein a aminokyseliny. V dnešní době se již provádí náročnější testy pro stanovení těkavých látek odpovědných za aroma výsledného čaje. Postupným zdokonalování jednotlivých metod stanovení je zabráněno falšování čaje, kdy jsou některé oolongové čaje vydávány za zelené a dochází tak ke klamání spotřebitelů [23].

Z mnoha studií vyplývá, že řada analytických technik se dnes již hojně využívají ke stanovování látek v čaji. Mezi tyto technik řadíme vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) [26-28], plynovou chromatografii spojenou s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) či s plamenově ionizačním detektorem (GC/FID) [27, 29], chromatografii na tenké vrstvě (TLC) [27], UV

spektrofotometrii [30, 31], FT-IR spektrofotometrii [32] a lze nalézt zmínky o hmotnostní spektrometrii s iontovou mobilitou (ESI-IMS). Za nejdůležitější metodu pro stanovení těkavých látek lze považovat plynovou chromatografii ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) a to zejména pro její potenciál, kdy lze analyzovat komplexní směsi a rovnou identifikovat separované složky pomocí hmotnostních spekter. Další výhody GC-MS je její vysoká citlivost a nízká mez detekce (LOD) [15].

Nicméně především kvůli nedostačující citlivosti a velkému vlivu matrice na stanovení je přímá analýza rostlinných materiálů značně omezena. Pro izolaci těkavých látek z rostlinných tkání, je před samotnou analýzou důležité provést krok separace nebo předkoncentrace. Mezi často používané přípravné separační a koncentrační kroky lze zařadit destilaci, extrakci rozpouštědlem [27, 33], extrakci superkritickou tekutinou (SFE) [27,33], ultrazvukovou extrakci (UAE) [27, 33] a mikroextrakci na pevné fázi (SPME) [27, 29, 33].

Stanovení těkavých látek v zeleném čaji bylo publikováno v mnoha člancích a vědeckých pracích [51-57]. Izolaci těkavých látek ze vzorků zelených čajů je možné provést několika způsoby, např. Soxhletova extrakce [51], destilace vodní parou [57], destilace za sníženého tlaku [56], ovšem nejčastěji používanou technikou pro extrakci těkavých látek je SPME [51] většinou v provedení HS-SPME (headspace SPME) [52-55]. Pro samotnou separaci a následnou identifikaci těkavých látek ve vzorcích zeleného čaje se nejčastěji využívá plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC/FID) [57], a ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) [51-55]. Celkem 190 těkavých látek bylo identifikováno v zeleném čaji pomocí Soxhletovy extrakce a SPME v kombinaci s GC/MS a dále byly vzorky analyzovány pomocí plynové chromatografie s olfaktometrickou detekcí pro zjištění aromatické úrovně [51]. 97 těkavých látek bylo stanoveno ve speciálním Biluochun zeleném čaji pomocí HS-SPME ve spojení s GC/MS [53]. Stejnou technikou tedy HS-SPME ve spojení s GC/MS byly porovnávány zelené čaje Jingmai a Wuliang [54], sušené Wujiatai zelené čaje [52] a tato technika byla využita i pro stanovování těkavých látek v čaji černém [55]. Plynová chromatografie v provedení GC/FID byla použita pro kvantifikaci výsledků z GC/MS při testování zelených čajů z oblasti jihovýchodní Asie [57].

Jednotlivé výsledky získané různými koncentračními či extrakčními technikami nejde porovnávat z důvodu odlišně použitých odrůd čaje, místa pěstování a způsob zpracování, což je pro obsah těkavých látek velmi důležité.

## 2 Experimentální část

### 2.1 Přístroje a zařízení

- Plynový chromatograf GC- 2010 Plus s FID detekcí (Shimadzu, Japonsko)
- Plynový chromatograf GC 17 A spojený s hmotnostním spektrometrem QP-5050 A, (Shimadzu, Japonsko)
- Tlakové láhve s heliem a vodíkem (Linde Gas, ČR)
- Kapilární kolona DB 5 (30 m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm), (Agilent Technologies, USA)
- Kapilární kolona ZB5 5HT Inferno (30 m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm), (Phenomenex)
- Datová stanice s vyhodnocovacím programem GC Solution 2.4, GCMS Solution 1.2
- Datová stanice s vyhodnocovacím programem Origin
- Mikroextrakční vlákno Supelco, Stableflex 50/30 μm DVB/CAR/PDMS (šedé-divinylbenzen/carboxen/polydimethylsiloxan)
- SPME držák (Supelco, USA)
- Termostatová vodní lázeň Julabo ED 5 (Julabo Labortechnik, Německo)
- Sušárna Thermo Scientific (Fisher Scientific, ČR)
- Skleněné vzorkovací nádoby (Simax, ČR)
- Vialky (Supelco, USA)
- Analytické váhy Sartorius (Fisher Scientific, ČR)
- Hmoždíř a tlouček

## 2.2 Vzorky

Pro analýzu těkavých látek v zelených čajích byly použity vzorky sypaných i porcovaných zelených čajů zakoupených v obchodních řetězcích v ČR. Přehled použitých vzorků je uveden v tabulce č. 5.

Tabulka 5 Přehled analyzovaných vzorků

Označení	Typ čaje	Název	Země původu	Specifikace
A	Sypaný čaj	Gunpowder Temple of Heaven	Čína	-
B	Sypaný čaj	Ché ngon so	Vietnam	Sklizeno v oblasti Tam Duong v provincii Zai Chau
C	Sypaný čaj	Ceylon Green	Srílanka	Sklizeno v oblasti Kandy, oblast hlavního města Srílanky
D	Sypaný čaj	Assam Green Tea OP	Indie	-
E	Sypaný čaj	Joongjak	Korea	Čaj z ostrova Čedžu
F	Sypaný čaj	Sencha	Čína	-
G	Sypaný čaj	Zealong Green	Nový Zéland	-
H	Sypaný čaj	Tesco Green Leaf Tea	Čína	-
I	Sypaný čaj	Chun Mee	Čína	-
J	Sypaný čaj	Bancha Arashiyana	Japonsko	Arashiyana označení bouřlivé hory
K	Porcovaný čaj	Jemča Zelený Čaj	neuveдена	Garantovaný český výrobek
L	Porcovaný čaj	Sir Winston Tea	neuveдена	Vyrobeno v EU
M	Porcovaný čaj	Dukat Green Tea	Čína	-
N	Porcovaný čaj	Sonnentor bio zelený čaj	Čína	-



Obrázek 15 Analyzované vzorky zelených čajů rozdělené dle země původu

## 2.3 Pracovní postup

### 2.3.1 Chromatografická analýza vzorků

#### GC/FID

Pro separaci byla použita kapilární kolona DB 5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m), Agilent Technologies USA. Nosným plynem bylo helium 5.0 s lineární rychlostí 25 cm/s. Teplota nástříku byla udržována na 250 °C. Desorpce analytů z vlákna probíhala při nástříkové teplotě.



Teplotní program byl nastaven na 50 °C po dobu 2 minut, následně docházelo ke zvyšování teploty až na 250 °C rychlostí 6°C/min. Dávkování vzorků probíhalo při splitovacím poměru 1:5.

## **GC/MS**

Pro separaci byla použita kapilární kolona ZB5 5HT Inferno, Phenomenex. Nosným plynem bylo helium 5.0 s lineární rychlostí 30 cm/s. Teplota nástřiku byla udržována na 200 °C. Desorpce analytů z vlákna probíhala při nástřikové teplotě. Teplotní program byl nastaven na 50 °C po dobu 2 minut, následně docházelo ke zvyšování teploty až na 250 °C rychlostí 6°C/min. Dávkování vzorků probíhalo při splitovacím poměru 1:5. Byla použita ionizační energie 70 eV. Látky byly porovnávány s knihovnamí spekter FF NSC 2, NIST 14, NIST 14s.

### **2.3.2 Headspace mikroextrakce na pevnou fázi**

Pro stanovení těkavých látek bylo použito šedé mikroextrakční vlákno se stacionární fází DVB/CAR/PDMS 50/30 µm. Před první extrakcí byla provedena kondicionace vlákna podle návodu doloženého výrobcem. Přesně podle postupu bylo vlákno vloženo do nástřikového prostoru vyhřátého na 270 °C po dobu 1 hodiny. Pro analýzu bylo naváženo vždy 0,5 g zeleného čaje do 15 ml vialky. Vialky byly uzavřeny víčky se septy pokrytými filmem teflonu. Každý vzorek byl před samotnou extrakcí temperován při teplotě v rozmezí 70-100 °C (v závislosti na teplotě extrakce) po dobu 30 minut. Po temperaci byla provedena extrakce při teplotě v rozmezí 70-100 °C po dobu 25 minut, kdy pomocí jehly bylo propíchnuto septum víčka a s pomocí pohyblivého pístu bylo vlákno zasunuto do prostoru nad vzorkem. Po extrakci byla provedena krátká desorpce v nástřikovém prostoru plynového chromatografu.

### **2.3.3 Optimalizace teplotního programu**

Optimalizace teplotního gradientu byla prováděna na vzorcích porcovaného čaje Dukat Green Tea s uvedenou zemí původu Čína. Extrakce byla prováděna podle postupu popsáno v kapitole 2.3.2. Vzorek byl temperován při teplotě 70 °C po dobu 30 min a následně byla provedena SPME při teplotě 70 °C po dobu 25 min. Gradienty použité pro optimalizaci jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tabulka 6 Tabulka testovaných teplotních gradientů

Teplotní gradient	Ohřev [°C/min]	Teplota [°C]	Čas udržování teploty na koloně [min]
Gradient 1	-----	55	3
	7	250	0
Gradient 2	-----	55	3
	6	250	0
Gradient 3	-----	50	3
	6	250	0

### 2.3.4 Optimalizace HS-SPME pro kombinaci 2 teplot

Pro optimalizaci headspace mikroextrakce na pevnou fázi byl použit vzorek sypaného čaje Chun Mee původem z Číny. Optimalizace HS-SPME byla provedena pomocí plánování experimentu s faktorovým plánem Box, Hunter & Hunter ( $2^k$ ). Nejprve byla optimalizována kombinace 2 teplot v jednom kroku, kdy jako proměnné byly zvoleny 2 teploty T1 a T2 a 2 časy t1 a t2, tzn. 4 proměnné ( $k = 4$ ). Do faktorového plánu byly zahrnuty 2 centrální body, a 4 opakování. Optimalizace byla prováděna pro rozmezí teplot T1 = 30-50 °C a T2 = 70-90°C se současnou optimalizací časů extrakce v rozmezí t1 = t2 = 5-20 minut. Jednotlivé podmínky optimalizace jsou uvedeny v tabulce č. 7. Vzorek byl pro extrakci vždy připraven nadrcením pomocí hmoždíře a tloučku, naváženo bylo 0,5 g a dále bylo postupováno podle návodu popsaného v kapitole 2.3.2. Rozdílem v provedení extrakce byly pouze dvě rozdílné použité teploty a dva rozdílné časy extrakce.

Tabulka 7 Faktorový návrh Box, Hunter & Hunter ( $2^k$ ) pro optimalizaci 2 teplot,  $k = 4$

Standardní pokus č.	T 1 [°C]	T 2 [°C]	t1 [min]	t2 [min]
15	30	90	20	20
40	50	90	5	5
22	50	90	5	5
25	30	90	20	5
17 (C)	40	70	12,5	12,5
54 (C)	40	70	12,5	12,5
45	30	50	5	20
24	50	50	20	5

Standardní pokus č.	T 1 [°C]	T 2 [°C]	t1 [min]	t2 [min]
16	50	90	20	20
41	30	50	20	5
19	30	50	5	5
36 (C)	40	70	12,5	12,5
37	30	50	5	5
50	50	50	20	20
44	50	90	20	5
30	50	90	5	20
61	30	90	20	5
70	50	90	20	20
64	50	50	5	20
32	50	50	20	20
72 (C)	40	70	12,5	12,5
20	50	50	5	5
49	30	50	20	20
39	30	90	5	5
69	30	90	20	20
6	50	50	20	5
9	30	50	5	20
28	50	50	5	20
47	30	90	5	20
8	50	90	20	5
53 (C)	40	70	12,5	12,5
10	50	50	5	20
56	50	50	5	5
5	30	50	20	5
58	50	90	5	5
1	30	50	5	5
71 (C)	40	70	12,5	12,5
27	30	50	5	20
55	30	50	5	5
23	30	50	20	5
62	50	90	20	5
42	50	50	20	5
4	50	90	5	5
26	50	90	20	5
46	50	50	5	20
57	30	90	5	5
35 (C)	40	70	12,5	12,5
65	30	90	5	20
14	50	50	20	20
59	30	50	20	5
31	30	50	20	20
60	50	50	20	5
18 (C)	40	70	12,5	12,5
29	30	90	5	20

Standardní pokus č.	T 1 [°C]	T 2 [°C]	t1 [min]	t2 [min]
2	50	50	5	5
13	30	50	20	20
11	30	90	5	20
52	50	90	20	20
63	30	50	5	20
33	30	90	20	20
43	30	90	20	5
48	50	90	5	20
21	30	90	5	5
3	30	90	5	5
68	50	50	20	20
38	50	50	5	5
12	50	90	5	20
51	30	90	20	20
7	30	90	20	5
66	50	90	5	20
67	30	50	20	20
34	50	90	20	20

### 2.3.5 Optimalizace HS-SPME pro 1 teplotu

Na základě výsledků z první série byla vybrána pouze jedna teplota pro celý HS-SPME experiment. Z tohoto důvodu byl pro další krok zvolen plán pouze s 2 proměnnými a to s teplotou  $T_1$  a časem  $t_1$ . Optimalizace teploty byla prováděna v rozmezí teplot 40-100 °C a se současnou optimalizací času extrakce v rozmezí 10-50 min. Podmínky optimalizace jsou uvedeny v tabulce č. 8. Extrakce byla prováděna podle postupu popsaného v kapitole 2.3.2.

Tabulka 8 Faktorový návrh Box, Hunter & Hunter ( $2^k$ ) pro optimalizaci 1 teploty,  $k = 2$

standard pokus č.	T [°C]	čas [ min]
11 (C)	70	30
14	100	10
10	100	50
19	40	10
1	40	10
3	40	50
22	100	50
4	100	50
18 (C)	70	30
13	40	10
15	40	50
21	40	50

<b>standard pokus č.</b>	<b>T [°C]</b>	<b>čas [ min]</b>
7	40	10
9	40	50
23 (C)	70	30
6 (C)	70	30
12 (C)	70	30
17 (C)	70	30
5 (C)	70	30
24 (C)	70	30
20	100	10
16	100	50
2	100	10
8	100	10

### 2.3.6 Optimalizace času extrakce

Pro optimalizaci konečné doby extrakce byl použit vzorek sypaného čaje Chun Mee původem z Číny. Postup byl identický s postupem popsáním v kapitole 2.3.2. Jednotlivé testované časy jsou uvedeny v tabulce č. 9.

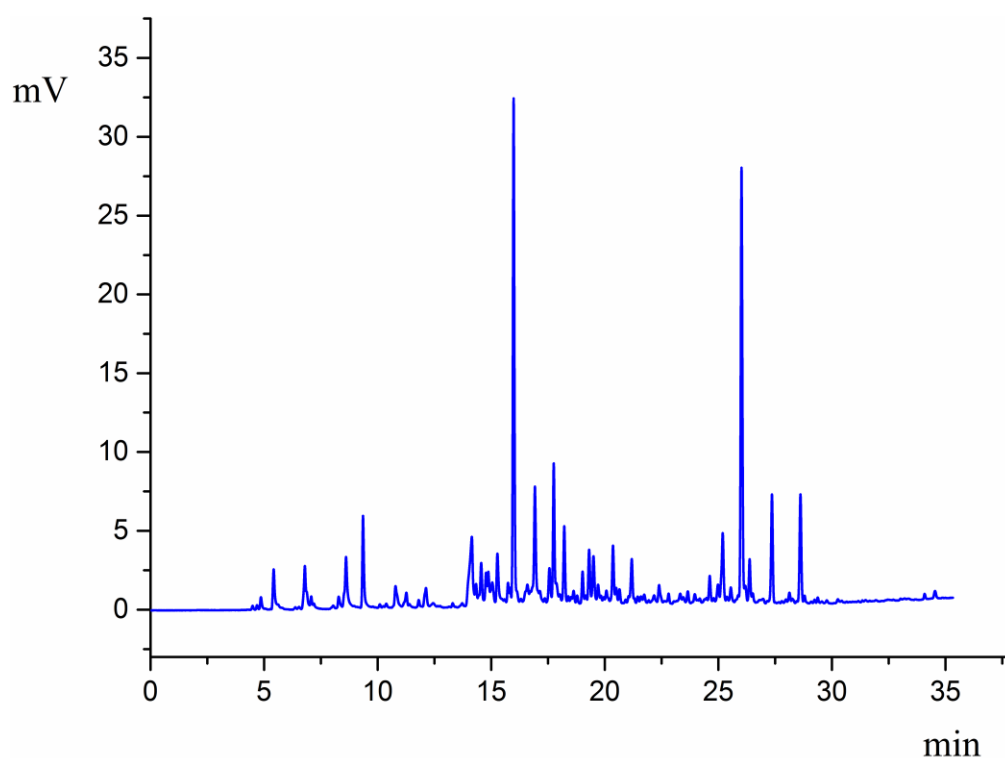
Tabulka 9 Testované časy pro optimalizaci celkové doby extrakce

<b>standard pokus č.</b>	<b>T [°C]</b>	<b>čas [ min]</b>
1	80	10
2	80	20
3	80	30
4	80	40
5	80	50
6	80	60

## 3 Výsledky a diskuze

### 3.1 Optimalizace teplotního programu

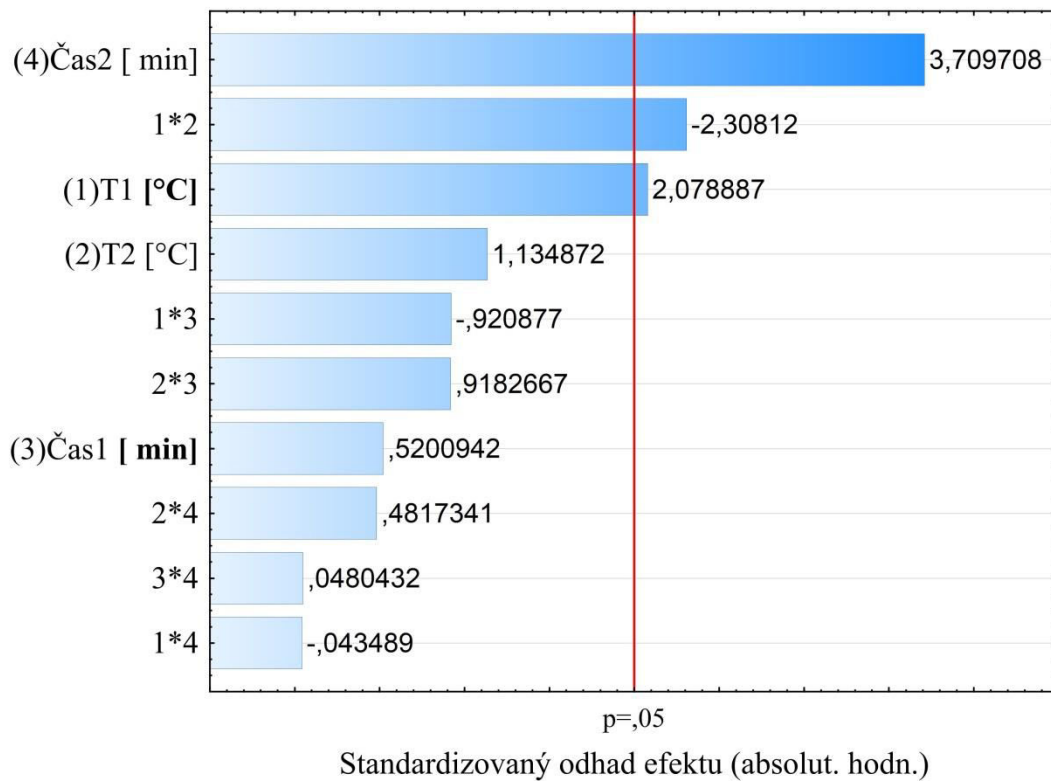
Nejprve byla provedena optimalizace separace těkavých látek v porcovaném zeleném čaji, tak aby bylo co nejvíce látek rozseparovaných. Optimalizace separace byla provedena se vzorkem porcovaného zeleného čaje (Dukat). Optimalizované parametry byly počáteční teplota a strmost gradientu (tabulka č. 6). Ukázky jednotlivých chromatogramů jsou uvedeny v příloze na obrázcích P1-P3. Nejlepší separace všech přítomných těkavých látek byla pozorována s použitím gradientu č. 3 s počáteční teplotou 50 °C a koncovou teplotou 250 °C s rychlostí záhřevu 6 °C/min. Finální separace je zobrazena na obrázku č. 16.



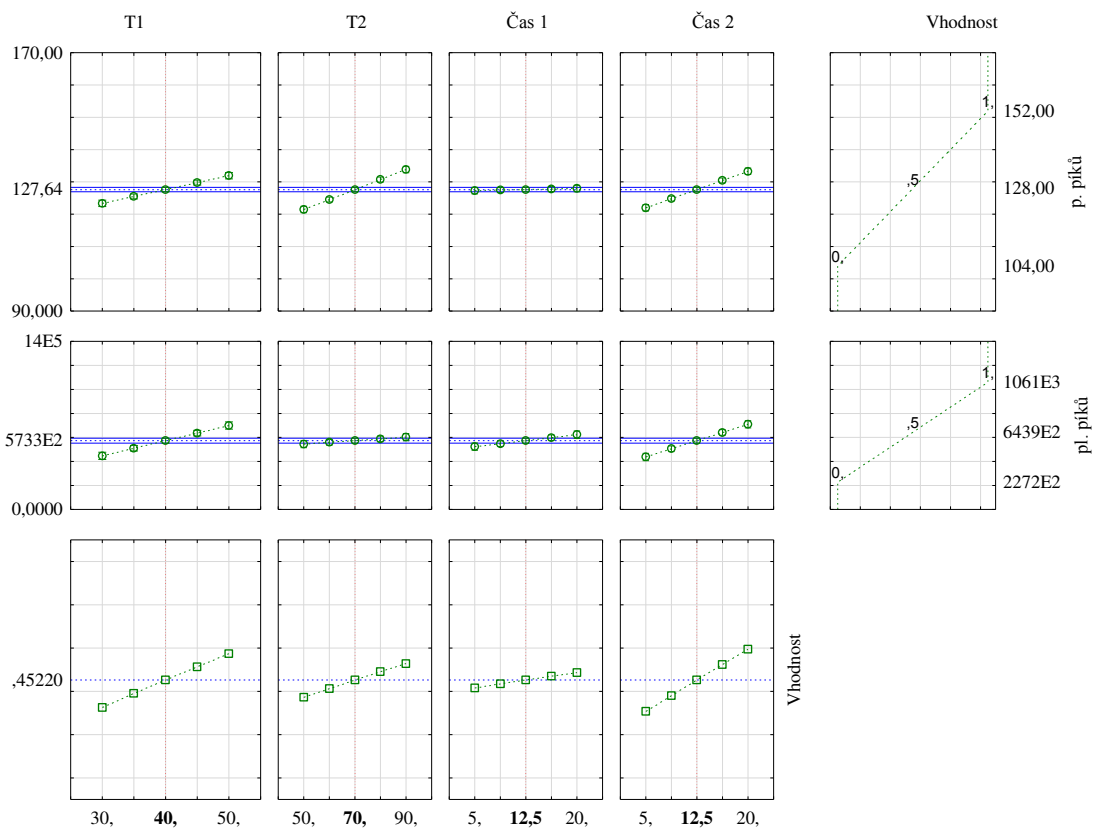
Obrázek 16 Chromatografická separace těkavých látek obsažených v zeleném čaji Dukat. HS-SPME 70 °C 30 minut, doba sorpce 25 minut, teplota nástřiku 250°C , teplota detektoru 250°C, lineární rychlost 25 cm/s, teplotní program 50°C- 3 minuty, 6°C/min do 250 °C.

### 3.2 Vyhodnocení HS-SPME pro kombinaci 2 teplot

Optimalizace extrakčních podmínek byla provedena se vzorkem sypaného čaje Chun Mee, ze kterého byly těkavé látky extrahovány pomocí HS-SPME s kombinací dvou teplot a dvou časů vytvořených z faktorového plánu uvedeného v tabulce č. 7. Jednotlivé chromatografické záznamy jsou zobrazeny na obrázcích P4-P20 v příloze. Chromatogramy byly vyhodnoceny z hlediska celkového počtu píků a celkových ploch píků. Z Paretova grafu (obrázek č. 17) je patrné, že čas  $t_1$  a teplota  $T_2$  nejsou statisticky významné, z ostatních parametrů má největší významnost čas  $t_2$ . Na obrázku č. 18 jsou uvedeny profily pro předpověď jednotlivých parametrů, kde je rovněž vidět malá významnost času  $t_1$ . Dále je možné vyčíst dobrou opakovatelnost měření při provádění optimalizaci, nicméně z profilu předpovědi a vhodnosti měření nelze zjistit optimální teplotu a čas HS-SPME a to ani z celkového počtu píků, ani z celkových ploch píků, protože jako optimální se jeví vždy maximální hodnota parametrů ze studovaného rozsahu. Ani z grafu responzních ploch (obrázek č. 19) není možné odečíst optimální kombinaci teploty a času pro extrakci těkavých látek, protože není pozorována maximální hodnota studovaných parametrů a stále dochází k nárůstu jak celkového počtu píků tak i celkové plochy píků. Ze statistických údajů vyplývá, že metoda kombinace dvou teplot a časů není pro měření přínosná, protože teplota  $T_2$  není statisticky významná. A pro měření je jednodušší využít pouze 1 teplotu extrakce.

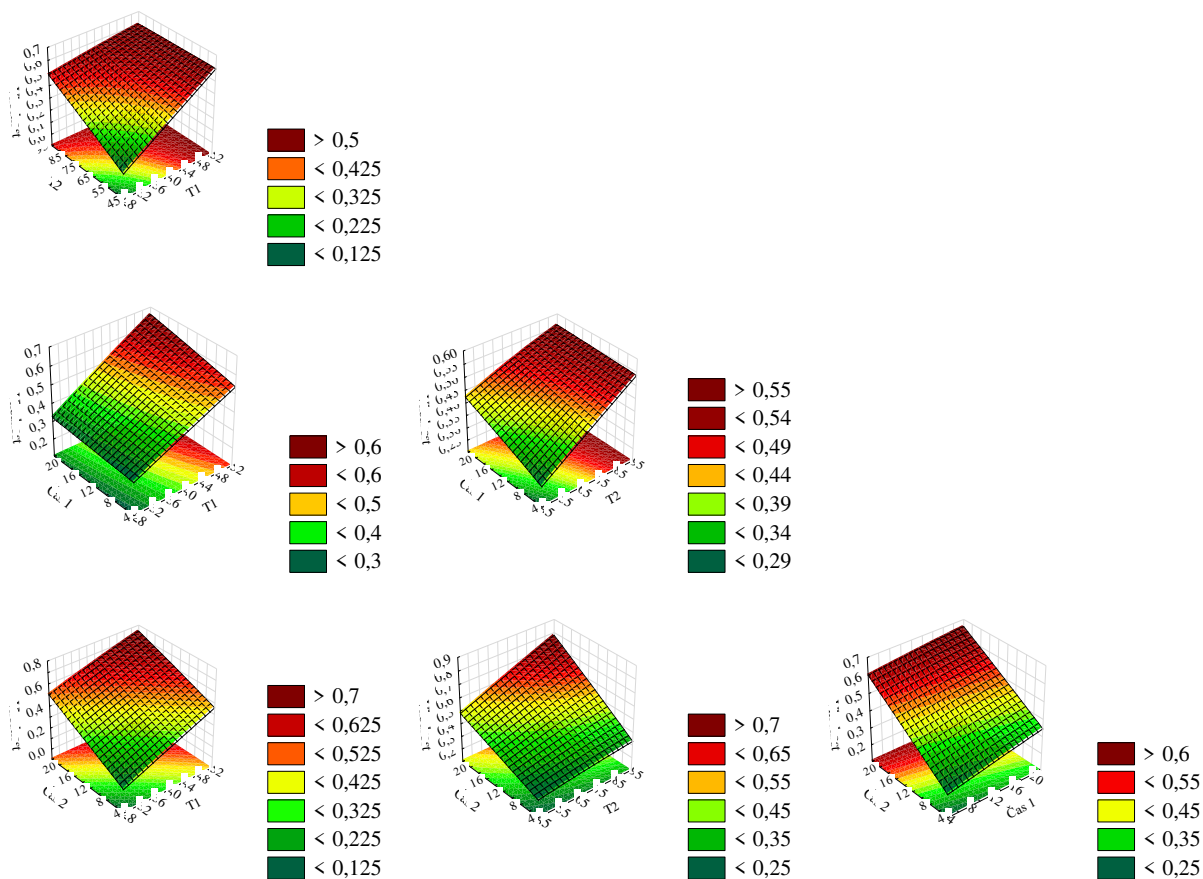


Obrázek 17 Pareto graf standardizovaných efektů HS-SPME pro kombinaci 2 teplot



Obrázek 18 Profily pro předpovědi a vhodnost pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci 2 teplot

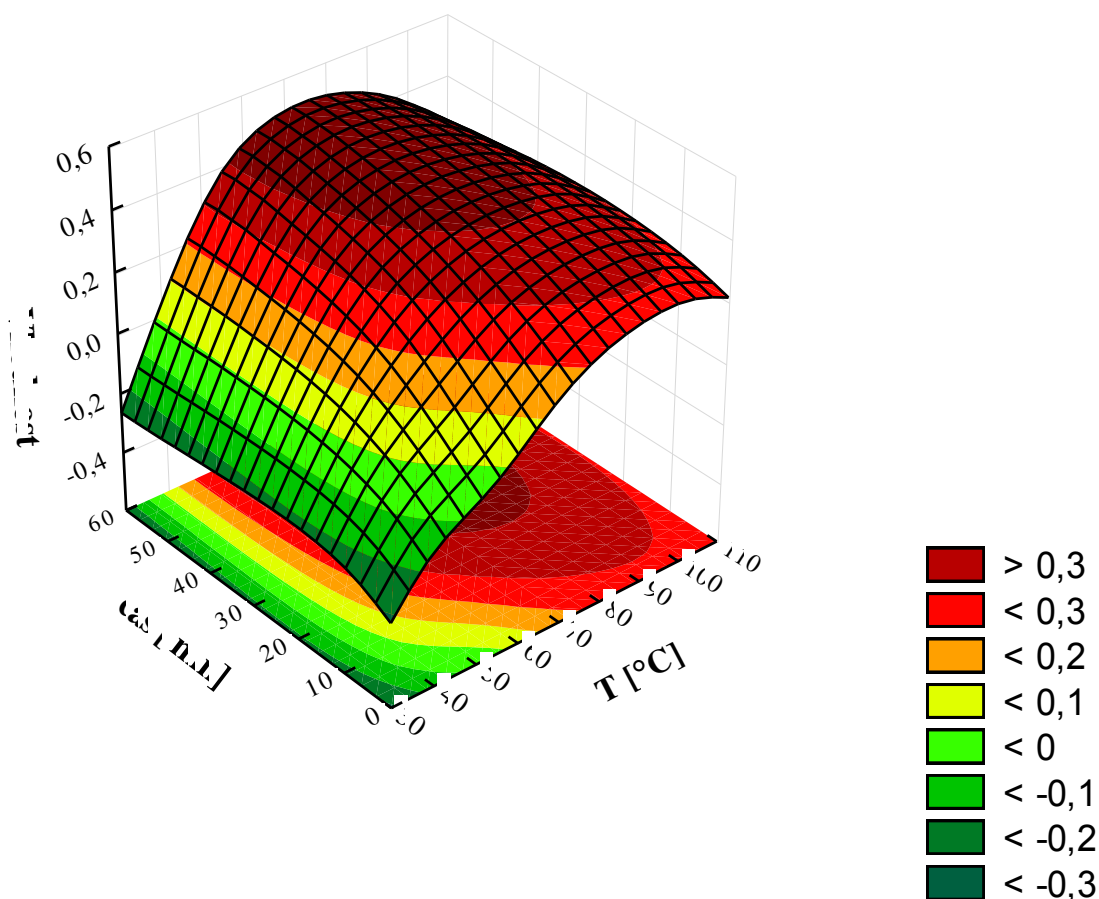




Obrázek 19 Odezvové responzní plochy pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci 2 teplot

### 3.3 Vyhodnocení HS-SPME pro 1 teplotu

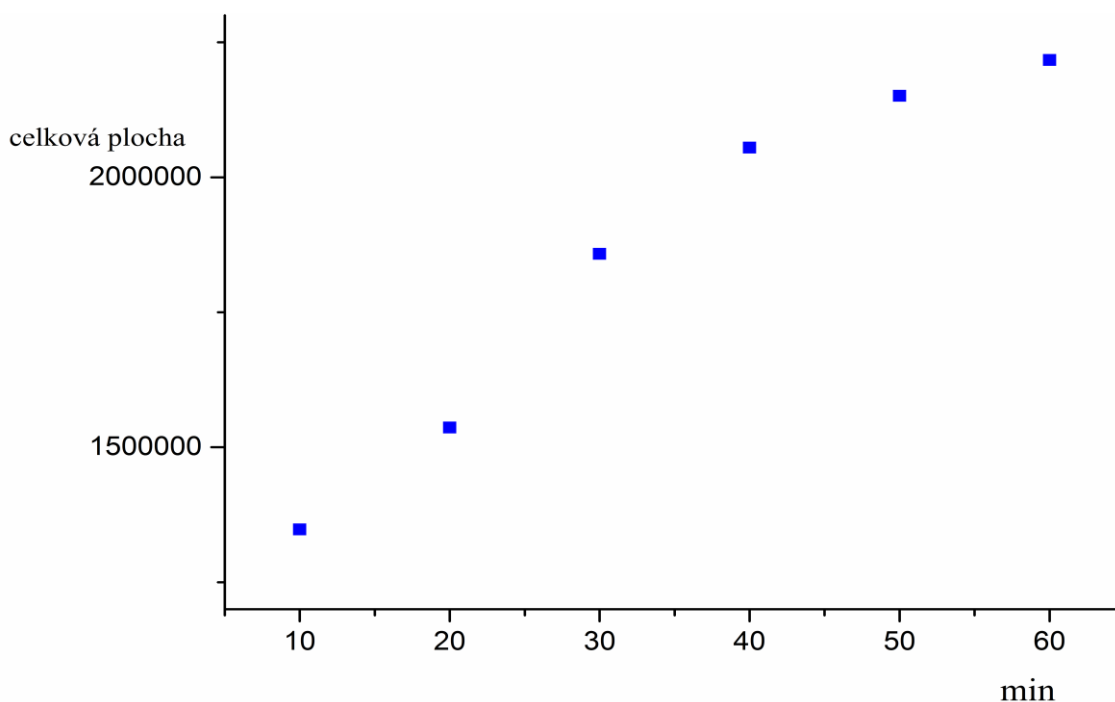
Optimalizace HS-SPME podmínek s jednou extrakční teplotou byla provedena se vzorkem sypaného čaje Chun Mee (tabulka č. 8). Na rozdíl od extrakce s dvěma teplotami bylo z grafu responzních ploch u jedné teploty (obrázek č. 20) pozorováno maximum při teplotě sorpce 80 °C. Z grafu responzních ploch však nebylo jasné optimum pro celkový čas extrakce, se zvyšujícím se časem docházelo k nárůstu ploch i počtu píků, proto bylo nutné provést další optimalizaci času pro zvolenou teplotu. Jednotlivé chromatogramy jsou zaznamenány v příloze na obrázcích P20-P25.



Obrázek 20 Odezvová responzní plocha HS-SPME pro 1 teplotu

### 3.4 Optimalizace celkového času HS-SPME

Z předchozí série plánování experimentu nebylo možné z grafu responzních ploch spolehlivě určit ideální čas extrakce, proto byl v tomto kroku optimalizován celkový čas vzhledem k celkovému počtu píků a celkové plochy píků při různých časech extrakce, jak je uvedeno v tabulce č. 9. Z obrázku č. 21 je patrné, že celková plocha lineárně roste s rostoucí dobou extrakce, až do času 40 min. S dalším zvyšováním času extrakce dochází pouze k mírnému nárůstu celkových ploch píků. S ohledem na úsporu času byl pro účely této diplomové práce vybrán čas extrakce 40 min, který je dostačující k extrakci všech analyzovaných těkavých látek a zároveň nedochází ke zbytečnému prodlužování analýzy.



Obrázek 21 Závislost plochy píků na celkovém čase extrakce

### 3.5 Analýza vzorků

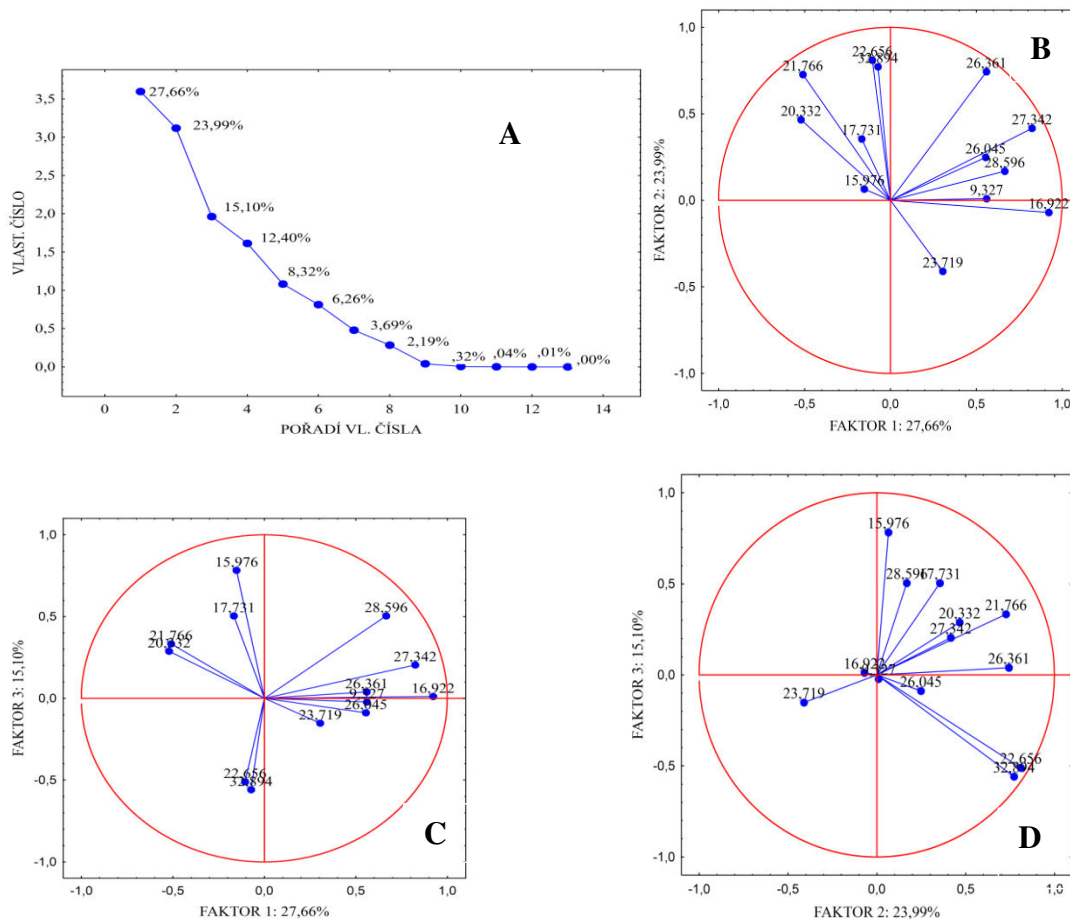
Analyzovány byly vzorky sypaných i porcovaných čajů zakoupené v ČR. Jednotlivé analyzované vzorky jsou uvedeny v tabulce č. 5. Těkavé látky byly extrahovány pomocí optimalizované HS-SPME při 80 °C po dobu 40 min postupem popsáním v kapitole 2.3.2 a následnou chromatografickou analýzou, jejíž podmínky jsou již popsány v kapitole 2.3.1. Jednotlivé chromatogramy jsou zaznamenány v příloze na obrázcích P26-P39. Vzorky byly vyhodnoceny z hlediska celkového počtu píků a celkové plochy píků a následně byly vyhodnoceny charakteristické píky pro daný vzorek. Vzhledem k počtu píků a celkové ploše píků vykazovaly jednotlivé vzorky v podstatě stejné výsledky, porcované čaje vykazovaly vyšší počty píků a větší celkovou plochu píků, což lze připsat lepšímu způsobu drcení před samotnou analýzou. U vzorků z různých zemí původu bylo pozorováno rozdílné zastoupení charakteristických látek. Z naměřených chromatogramů bylo zjištěno, že celkové zastoupení a množství těkavých látek v zelených čajích je ovlivněno více faktory, jako jsou podnebí, způsob výroby, způsob sklizeně a další. Nejprve byly vzorky posouzeny z hlediska senzorické stránky. Byl porovnáván vzhled lístků jednak barva sklizených lístků, tvar lístků a množství příměsí. Jednotlivé vzorky se značně lišily ve všech zmíněných parametrech, jak lze vidět na obrázku č. 15. Z analyzovaných vzorků však nelze najít souvislost mezi charakteristickými znaky pro určitou zemi. Každý čaj má svoji specifickou barvu, kdy lze označit čaje z Indie a Japonska za tmavší, mají charakteristický tvar sklizených lístků, který může být ovlivněný následným

zpracováním čaje. Specifický tvar mají čaje ze Srí Lanky, které poskytovaly největší lístky a Japonska, které mají charakteristické rovné lístky. Naprosto specifický tvar lístků má zelený čaj *Gunpowder Temple of Heaven* původem z Číny. Obecně senzorická analýza neposkytuje charakteristický znak pro určitou zemi.

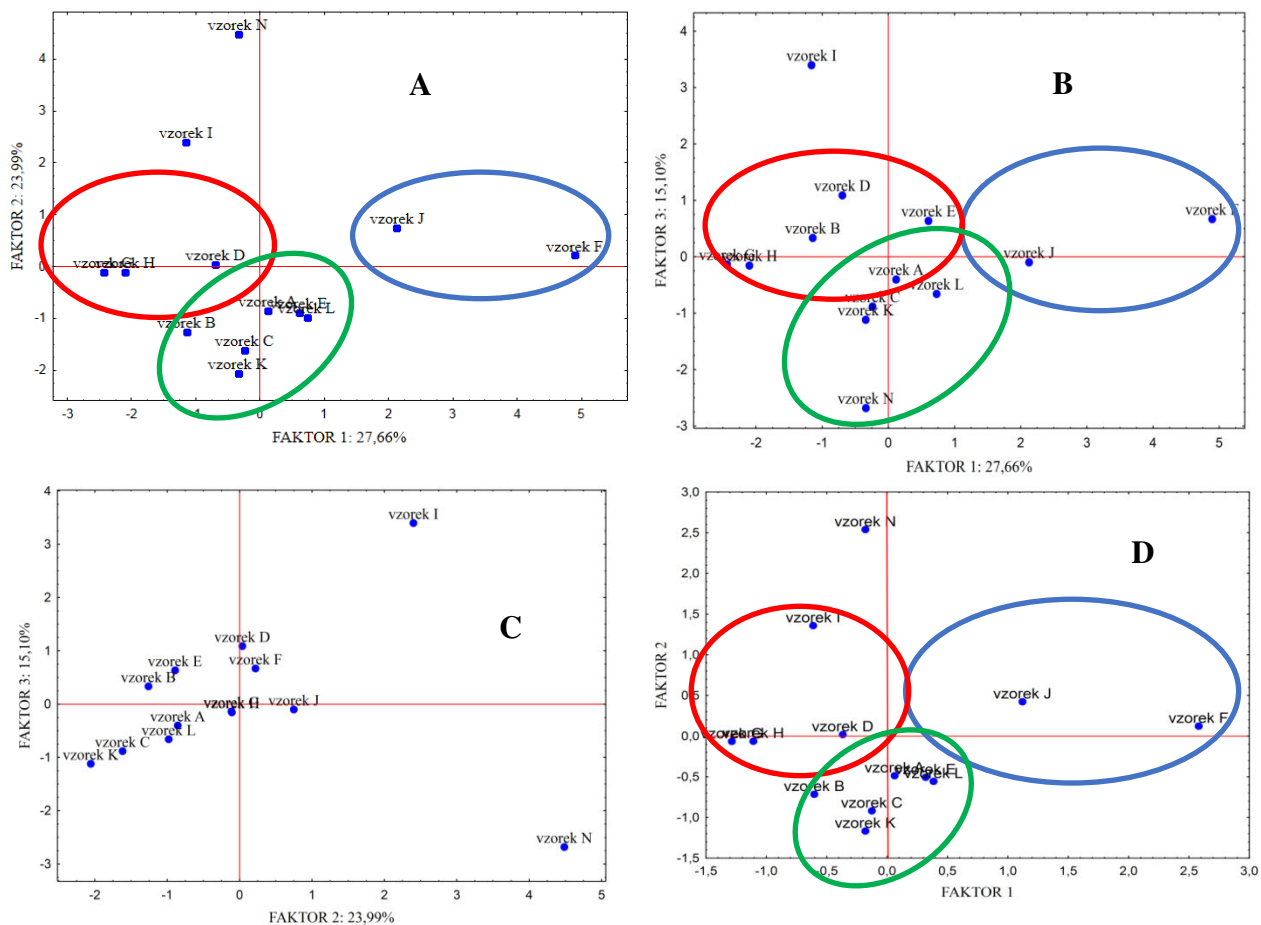
Rozdíly zastoupení těkavých látek ve vzorcích zeleného čaje z různých zemí původu byly vyhodnoceny pomocí statistické metody analýza hlavních komponent. Z Cattelova grafu (obrázek č. 22A) vyplývá, že k popisu celého systému by měly být použity 4 faktory (hodnota vlastního čísla větší než 1). Pro zjednodušení byly vybrány pouze tři faktory s celkovým pokrytím 66,75 %, což je postačující pro popis systému. Z grafů komponentních vah na obrázku č. 22B,C,D byly určeny a popsány charakteristické proměnné. Malá vzdálenost mezi proměnnou a kružnicí značí větší význam proměnné (píky s retenčními časy 21,766, 20,332). Krátká vzdálenost mezi jednotlivými proměnnými značí silnou korelaci (píky s retenčními časy 21,766, 20,332). Proměnné nacházející se na obrázku proti sobě mají zápornou korelaci a působí proti sobě (píky s retenčními časy 21,766, 23,719), proměnné na obrázku v pravém úhlu spolu nekorelují (píky s retenčními časy 26,361, 9,327).

Grafy komponentního skóre (obrázek č. 23) byl použit k identifikaci odlehlých objektů, trendů a tříd, shluku objektů a k objasnění podobnosti objektů. Pokud jsou objekty příliš vzdálené od počátku lze je označit za extrémní jako na obrázku č. 23 vzorky N (bio zelený čaj původem z Číny) a I (Čína). Objekty, které se shlukují lze považovat za podobné, což jsou vzorky C, K, B, A, E, L (obrázek č. 23). Dalším extrémem je vzorek F (Sencha původem z Číny), který je vyráběn odlišným způsobem oproti ostatním čínským čajům. Protože je vyroben jako čaj japonského typu, je zde pozorována podobnost v rámci faktoru 2 se vzorkem J (Bancha), který je původem z Japonska. Významná odlišnost vzorku N je pravděpodobně způsobena bio způsobem pěstování, zatímco odlišnost vzorku I je možné vysvětlit dlouhou dobou skladováním v laboratoři a možným znehodnocením vzorku. Vzorky D (původem z Indie), B (původem z Vietnamu), G (původem z Nového Zélandu) a H (původem z Číny) jsou si statisticky podobné, protože se nachází v jednom shluku. U vzorků B a H lze tuto podobnost vysvětlit, zemí původu, jelikož u vzorku B původem z Vietnamu je specifikována oblast sklizně Tam Duong v provincii Zai Chau, která se vyskytuje na severu Vietnamu téměř na hranicích s Čínou a pokud není u čínského čaje specifikována oblast sklizně je možné, že byly sklizeny ve stejné oblasti. Shodu se vzorky původem z Indie (D) a Nového Zélandu (G) je možné popsat pouze podobností způsobu výroby, ovšem ani u jednoho čaje nebyl způsob výroby uveden, proto se jedná o pouhou spekulaci. Další podobnost je pozorována mezi čajem A z Číny a vzorkem zeleného čaje ze Srí Lanky (C), jelikož zelený čaj ze Srí Lanky je vyroben čínským způsobem, lze shodu mezi vzorky

přičíst stejnému způsobu výroby. Podobnost mezi čaji z Číny (A) a Koreji (E) lze vysvětlit podobným podnebím pěstování, jelikož zelený čaj z Koreji je vypěstován na ostrově Čedžu nedaleko od břehů Číny. Ze shluku vyplývá, že porcované čaje K, L bez uvedených zemí původu budou pravděpodobně pocházet z Číny.



Obrázek 22 Analýza hlavních komponent: A) Cattelův graf, B) komponentní váhy PC1-PC2, C) komponentní váhy PC1-PC3, D) komponentní váhy PC2-PC3



Obrázek 23 Analýza hlavních komponent a faktorová analýza: A) komponentní skoré PC1-PC2, B) komponentní skoré PC1-PC3, C) komponentní skoré PC2-PC3, D) Faktorové skoré F1-F2

Následně byly těkavé látky ve vzorcích zeleného čaje identifikovány pomocí techniky GC/MS. Pro stanovení byly použity vzorky A (původem z Číny), B (původem z Vietnamu) a vzorek J (původem z Japonska). Ve vzorcích bylo identifikováno celkem 173 látek, které jsou zaznamenány v tabulce č. 10. Mezi identifikovanými látkami je široká škála látek od alkoholů přes aldehydy, ketony, estery a nitrosloučeniny. Jako zajímavost lze uvést přítomnost triacetinu, což je běžně využívaný fungicid. Přítomností fungicidních prostředků lze vysvětlit velkou odlišnost bio zeleného čaje, který metody komponentního skóre a komponentních vah označily za extrémní vzorek, což dokazuje bio výrobu vzorku N.

Tabulka 10 Identifikované látky pomocí GC/MS

<b>Látka</b>	<b>Retenční čas</b>
Trifluoroethanol, derivát TBDMS	3.277
1-pentanol	4.440
2-penten-1-ol, (Z) -	4.493
Toluen	4.983
Hexanal	5.037
2-Hexenal, (E) -	6.200
3-Hexen-1-ol, (Z) -	6.237
3-hexen-1-ol, formiát, (Z) -	6.250
Oxim-, methoxy-fenyl-	7.243
Heptanal	7.310
$\alpha$ -pinen	8.800
Benzaldehyd	8.850
Acetofenon	8.850
Benzen, 1,2,4-trimethyl-	9.027
Vinyl amylkarbinol	9.263
1-okten-3-ol	9.267
Bicyklo [3.1.1] heptan, 6,6-dimethyl-2-methylen-, (1S) -	9.323
3-oktanon, 2-methyl-	9.343
$\alpha$ -methylstyren	9.433
5-hepten-2-on, 6-methyl-	9.463
Furan, 2-pentyl-	9.570
2,4-nonadienal, (E, E) -	9.633
Mesitylen	9.673
2,4 nonadienal	9.760

Látka	Retenční čas
3-hexanol	9.927
3-Hexen-1-ol, acetát, (E) -	9.953
2,4-heptadienal, (E, E) -	10.107
2-propanol, 1- (2-methoxy-1-methylethoxy) -	10.190
Benzen, (1-methylethyl) -	10.427
Cymen <para->	10.490
Limonen	10.517
Hexanol <2-ethyl->	10.517
Limonen	10.573
Benzylalkohol	10.717
Benzenacetaldehyd	10.970
1H-pyrrol-2-karboxaldehyd, 1-ethyl-	11.133
2-Aminobenzylalkohol	11.150
Tetrahydrolavandulol	11.193
trans- $\beta$ -Ocimen	11.270
1-dekanol	11.307
Cyklopenten <3,5-dimethylen-1, 4,4-trimethyl->	11.337
Ethanon, 1- (1H-pyrrol-2-yl) -	11.373
gama-Terpinen	11.390
Izoforon	11.527
3,5-oktadien-2-on	11.617
2-Nonyl	11.620
Linalool * oxid <cis->	11.707
2-furanmethanol, 5-ethenyltetrahydro-a, a, 5-trimethyl-, cis- (linanol oxid)	12.003
Benzen, 1-ethyl-2,3-dimethyl-	12.043
3-okten-2-ol	12.083
Linalool * oxid <trans->	12.117
trans-Linalool * oxid	12.123
3,5-oktadien-2-on	12.213
Linalool	12.357
Nonanal	12.460
1,7-oktadien-3,6-diol, 2,6-dimethyl-	12.467
Ethanol, 2- (hexyloxy) -	12.547
3,7-oktadien-2,6-diol, 2,6-dimethyl-	12.597
Cyklohexanol, 2,6-dimethyl-	12.627
3-okten-2-ol	12.713
Fenylethylalkohol	12.753
(E) -4,8-Dimethylnona-1, 3,7-trien	12.780
Benzen, [[(1-ethenyl-1, 5-dimethyl-4-hexenyl) oxy] methyl]	12.833
o-Cymen	12.953
Verbenen	13.133
p-Mentha-1, 5,8-trien	13.207



Látka	Retenční čas
2,5-Pyrrolidindion, 1-ethyl-	13.210
6-Azathymin	13.223
Piperidin, 1-acetyl-	13.367
Benzylnitril	13.463
Acetát <hexyl-, 2-ethyl->	13.593
Decamethylcyklopentasiloxan	13.690
Bicyklo [3.1.0] hexan-6-methanol, 2-hydroxy-1, 4,4-trimethyl-	13.827
cis-Piperitonového epoxidu	13.840
Cyklohexanon, 5-methyl-2- (1-methylethyl) -, cis-	13.853
2-nonenal, (E) -	13.920
Fenylmethylester kyseliny octové	13.993
Benzylacetát	13.997
Cyklohexanon, 5-methyl-2- (1-methylethyl) -, cis-	14.097
Dodecanal	14.113
Cyklohexanol, 2,3-dimethyl-	14.120
Linalool * oxid <trans-> * (pyranoid)	14.210
Linalool * oxid <trans-> * (pyranoid)	14.260
Cyklohexanol, 5-methyl-2- (1-methylethyl) -, [1S- (1a, 2a, 5p)	14.317
2-propanolu, 1- (2-methoxypropoxy) -	14.343
1- (1-Methoxypropan-2-yloxy) propan-2-ylacetát	14.373
Terpinen-4-ol	14.397
Terpinen-4-ol	14.453
Okta-1, 7-dien-3,6-diol <3,7-dimethyl->	14.483
3-hexenylester kyseliny butanové, (Z) -	14.580
Methyl oktylketon	14.667
3,7-oktadien-2,6-diol, 2,6-dimethyl-	14.673
a-Terpineol	14.710
Dodekan	14.823
Safranal	14.947
Cyklohexanol, 2-methyl-5- (1-methyletenyl) -, (1a, 2p, 5a)	14.967
1-cyklohexen-1-karboxaldehyd, 2,6,6-trimethyl-	15.447
2-propenové kyseliny, 6-methylheptylester	15.537
1H-pyrrol-2,5-dion, 3-ethyl-4-methyl-	15.607
cis-3-hexenyl-a-methylbutyrát	15.610
Kyselina octová, diethyl-	15.707
Kyselina uhličitá, izobutyl-2-ethylhexylester	15.753
2-ethylhexylester kyseliny pentadekafluoroktanové -	15.800
1,3-propandiol, 2,2-dimethyl-, diacetát	15.850
1-okten-3-yl-acetátu	15.857
Isoamyl ester kyseliny acetooctové	15.923
Triacetin	15.927
Carvone	16.080

Látka	Retenční čas
2,6-oktadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z) -	16.143
Linalyl acetát	16.207
2-fenylethylester kyseliny hexanové	16.233
Kyselina pentanová, 2-methyl-, anhydrid	16.250
Hexanoát <trans-2-hexenyl->	16.297
Cyclohomocitral <beta->	16.327
6-methyl-6-nitroheptan-2-on	16.723
Tridekan <n->	16.793
Heptadekan, 4-methyl-	17.053
Cyklohexanol, 5-methyl-2- (1-methylethyl) acetát, (1a, 2a, 5p)	17.147
1-dekanol, 2-hexyl-	17.177
Indolizin	17.187
2 (4H) -benzofuranon, 5,6,7,7a-tetrahydro-3,6-dimethyl-	17.343
Cyklohexanol, 5-methyl-2- (1-methylethyl) acetát, (1a, 2a, 5p)	17.437
2-isopropyl-5-methyl-1-heptanol	17.467
trans-2-dodecen-1-olu, trifluoracetátu	17.540
(4aS, 7S, 7aR) -4,7-dimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrocyklopenta [c] pyran-1 (4aH)	17.677
Triacetin	17.723
2-oxatricyklo [4.3.1.0 (3,8)] dekan	17.753
Cyklohexasiloxan, dodekamethyl-	17.777
p-Menth-8-en-1-ol, stereoizomer (Terpeniol)	18.423
a-Cubeben	18.563
2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, acetát, (Z) -	18.720
Kyselina hexanová, kyselina 3-hexenylová, kyselina (Z) -	18.993
1H-benzocyklohepten, 2,4a, 5,6,7,8,9,9a-oktahydro-3,5,5-trimethyl-9-methylen-, (4aS-cis)	19.043
Bicyklo [3.1.1] heptan-2-karboxaldehyd, 6,6-dimethyl-	19.097
Copaen <alfa -> -	19.183
1-tridecen	19.263
Bourbonen <beta->	19.343
Tetradekan	19.397
2-pentadecanon, 6,10,14-trimethyl-	19.507
Jasmone <(Z) ->	19.513
2-cyklopenten-1-on, 3-methyl-2- (2-pentenyl) -,	19.567
Tridecanal	19.597
1,2,4-Methenoazulen, dekahydro-1, 5,8a-tetramethyl-, [1S- (1a, 2a, 3aa, 4a, 8aa, 9R	19.723
Dodecanal -	19.777
Longifolene	19.817
Longipinen<beta->	19.823
β-Longipinene	20.023
Karyofylén	20.103
Ionon <(E) -, alfa->	20.110

<b>Látka</b>	<b>Retenční čas</b>
2- (3,3-dimethylbut-1-ynyl) -1, 1-dimethyl-3-methylcyklopropan	20.213
a-ionon	20.273
Kumarin	20.433
trans-a-Bergamot	20.510
5,9-Undecadien-2-on, 6,10-dimethyl-	20.547
(E) -p-Famesen	20.690
Octadekan	20.723
cis-a-Bisabolen	20.913
Isoshyobunon	20.960
2,5-cyklohexadien-1, 4-dion, 2,6-bis (1, 1-dimethylpropyl)	20.970
(1R, 3aR, 5aR, 9aS) -1,4,4,7-tetramethyl-1, 2,3,3a, 4,5a, 8,9-oktahydrocyklopenta [c] benzofuran	21.240
4- (2,6,6-Trimethylcyklohexa-1, 3-dienyl) but-3-en-2-on	21.273
Benzen, 1- (1, 5-dimethyl-4-hexenyl) -4-methyl-	21.303
trans-p-ionon	21.343
Germacrene D	21.677
a-Farnesen	21.707
Naftalen, 1,2,4a, 5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1- (1-methylethyl) -	21.707
Bisabolen <beta->	21.833
Kyselina cyklohexankarboxylová, ethenylester	22.000
(S, 1Z, 6Z) -8-isopropyl-1-methyl-5-methylcyklodeka-1, 6-dien	22.097
Nerolidol <(E) ->	22.160
(3E, 7E) -4,8,12-Trimethyltrideka-1,3,7,11-tetraen	23.440
Hexadecan <n->	23.480
Kofein	28.090

## 4 Závěr

Cílem diplomové práce bylo stanovení těkavých látek ve vzorcích zeleného čaje pomocí metody plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem, identifikace jednotlivých těkavých látek pomocí GC/MS a následné porovnání jednotlivých vzorků zelených čajů dle zemí původu. Pomocí principů plánování experimentů byla provedena optimalizace pro vzorkování HS-SPME s využitím dvou sorpčních teplot, ze které nebylo možné určit ideální podmínky vzorkování. Poté byla provedena optimalizace vzorkování HS-SPME s využitím jedné teploty opět pomocí metody plánování experimentů a poté optimalizace celkového času extrakce. Na základě vyhodnocení celkového počtu píků a celkové plochy píků pomocí statistické metody responzních ploch byly vybrány ideální podmínky vzorkování při teplotě 80 °C po dobu extrakce 40 min.

V dalším kroku byly pomocí optimalizovaného postupu HS-SPME extrahovány těkavé látky ze vzorků zelených čajů z různých zemí původu. Následně byly jednotlivé vzorky zelených čajů analyzovány pomocí plynové chromatografie ve spojení s plamenově ionizačním detektorem. Vzorky byly vyhodnoceny na základě celkového počtu píků, celkové plochy píků a přítomnosti charakteristických píků. Za pomoci statistických metod analýzy hlavních komponent a faktorové analýzy byly jednotlivé vzorky zelených čajů z různých zemí původu porovnávány a hledány podobnosti mezi jednotlivými vzorky ze stejných zemí původu. Na zastoupení těkavých látek v zeleném čaji má vliv mnoho faktorů jako podnebí, způsob sběru a způsob výroby. Jednotlivé čaje lze porovnávat na základě zemí původu nicméně je důležité, mít na vědomí další faktory. Poslední částí práce byla identifikace těkavých látek ve vzorcích zeleného čaje, kdy bylo identifikováno na 173 látek.

## 5 Použitá literatura

- [1] Dostálová J., Čaj, v Kadlec P., Melzoch K., Voldřich M. a kol., v Co byste měli vědět o výrobě potravin?, Key Publishing s.r.o. Ostrava 2009, str. 520-525.
- [2] Vyhláška MZe č.330/1997 Sb.: Online: <https://www.zakonyprolidi.cz/>.
- [3] Online:<https://www.henriettes-herb.com/galleries/photos/c/ca/camellia-sinensis-5.html>: staženo 6. 11. 2017.
- [4] Online: <http://www.pernellgerver.com/teaplant.htm>: staženo 6. 11. 2017.
- [5] Taylor S., Tea, Types, production, and Trade, v Encyklopedia of Food Sciences and Nutrition, Caballero B., Trugo C. L., Finglas P. M., Academica Press, Elsevier Science 2003, vydání 2., svazek 9., str. 5737-5743.
- [6] Bc. Mirošová P., Stanovení těkavých látek ve vybraných typech nefermentovaných čajů metodou GC/MS, Zlín 2012, 80 s., Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta Technologická, Vedoucí práce: Ing Michal Rouchal, Ph.D.
- [7] Online:<http://www.cajovna-shisha2.cz/zajimavosti/povidani-o-caji/druhy-caju-podle-zpusobu-zpracovani/>: staženo 8. 11. 2017
- [8] Balentine D. A., Tea, v Kirk-Othmer Food and feed Technology, John Wiley & Sons 2008, vydání 5., svazek 2., str. 502-526.
- [9] Studnický J., Výroba pochutin, v Drdák M. a kol., Základy Potravinářských Technologií, Vydavatelstvo Malé Centrum 1996, vydání 1., str. 473-474.
- [10] Hrubý R., Zdravotní význam čaje a kombuchy, Zlín 2011, 60 s., Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta Technologická, Vedoucí práce: Ing. Jiří Mlček, Ph.D.
- [11] Unachukwu U. J., Ahmed S., Kavalier A., Lyles J. T., Kennelly E. J., White and Green Teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): Variation in Phenolic, Methylxanthine, and Antioxidant Profiles, journal of Food Science, 75, (2010), 541-548.
- [12] Yener S., Sánchez-López J. A., Granitto p. M., Cappellin L., Tilmann D. M., Zimmermann R., Bonn G. K., Yeretzyan Ch., Biasioli F., Rapid and direct volatile compound profiling of black and green teas (*Camellia sinensis*) from different countries with PTR-ToF-MS, Talanta, 152, (2016), 45-43

- [13] Prigen Y., Soo-Lee Yeo A., Low M. Y., Zhou W., Identifying key non-volatile compounds in ready-to-drink green tea and their impact on taste profile, *Food Chemistry*, 155, (2014), 9-16.
- [14] Juntee k., komura H., Bamba T., Fukasaki E., Predication of Japanese green tea (Sen-cha) ranking by volatile profiling using gas chromatography mass spectrometry and multivariate analysis, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112, (2011), 252-255.
- [15] Sereshti H., Samadi S., Jalali-Heravi M., Determination of volatile components of green, black, oolong and white tea by optimized ultrasound-assisted extraction-dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1280, (2013), 1-8.
- [16] Abdullah H., Alluhayb, Logue B. A., The analysis of aroma/flavor compounds in green tea using ice concentration linked with extractive stirrer, *Journal of chromatography A*, 1518, (2017), 8-14.
- [17] Lee s. M., lee H. S., kim K. H., kim K. O., Sensory characteristics and consumer acceptability of decaffeinated green teas, *Journal of Food Science*, 74, (2009), 135-141.
- [18] Min L., Fucan X., Renrong C., Xiaohua Q., Xuehao Ch., Effect of Different Cover Cultivations in Later Summer on Aroma Constituents of Autumn Tea (*Camellia sinensis* L.), *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 2014, 3, 1-6.
- [19] Velíšek J., Hajšlová J., Aromatické látky, v *Chemie Potravin II, OSSIS, Tábor 2009*, str. 1-162.
- [20] Ravichandran R., Parthiban R., The impact of processing techniques on tea volatiles, *Food Chemistry*, 62, (1998), 347-353.
- [21] Rawat R., Gulati A., Kiran Babu G. D., Kaul V. K., Singh B., Characterization of volatile components of Kangra orthodox black tea by gas chromatography-mass spectrometry, *food Chemistry*, 105, (2007), 229-235.
- [22] Online: [http://worldteanews.com/wp-content/uploads/2016/10/NATC16\\_Ian-Gibbs-International-Tea-Committee\\_TeaExports.png](http://worldteanews.com/wp-content/uploads/2016/10/NATC16_Ian-Gibbs-International-Tea-Committee_TeaExports.png): staženo 23. 11. 2017
- [23] Wang L.F Lee J. Y., Chung J. O., Baik J. H., So S., Park S.K., Discrimination of teas with different degrees of fermentation by SPME-GC analysis of the characteristic volatile flavour compounds, *Food Chemistry*, 109, (2008), 196-206.
- [24] Bubník Z., Filip V., Voldřich M., Extrakce, v *Procesy a zařízení potravinářských a biotechnologických výroby*, Key Publishing s.r.o. Ostrava 2012, str. 228-243.

- [25] Procházková D., Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů, *Chemické listy*, 96, (2002), 827-852.
- [26] Wang L., Gong L. H., Chen Ch. j., han H. B., Li H. H., Column-chromatographic extraction and separation of polyphenols, caffeine and theanine from green tea, *Food Chemistry*, 131, (2012), 1539-1545.
- [27] Nyiredy S., Separation strategies of plant constituents—current status, *Journal of chromatography*, 812, (2004), 35-51.
- [28] Kerio L. C., Wachira f. N., Wanyoko j. K., Rotich M. K., Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: Extraction and identification, *Food Chemistry*, 131, (2012), 31-38.
- [29] Reto M., Figueira M. E., Helder F. M., Almeida C. M. M., Analysis of vitamin K in green tea leaves and infusions by SPME–GC-FID, *Food Chemistry*, 100, (2007), 405-411.
- [30] López-Martínez L., López-de-Alba P. L., García-Campos R., de León-Rodríguez L. M., Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares, *Analytica Chimica Acta*, 493, (2003), 83-94.
- [31] Masek A., Chrzescijanska E., Kosmalska A., Zaborski M., Antioxidant activity determination in Sencha and Gun Powder green tea extracts with the application of voltammetry and UV-VIS spectrophotometry, *Comptes Rendus Chimie*, 15, (2012), 424-427.
- [32] Tanizawa Y., Abe T., Yamada K., Black tea stain formed on the surface of teacups and pots. Part 1 – Study on the chemical composition and structure, *Food Chemistry*, 103, (2007), 1-7.
- [33] Ormeno E., Goldstein A., Niinemets U., Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species, *TrAC trends in Analytical Chemistry*, 30, (2011), 978-989.
- [34] Online: <http://posouzeno.cz/clanky/caj-pestovani-zpracovani>: staženo 1. 12. 2017.
- [35] Online: <http://ocaji9.webnode.cz/novinky/vyroba-caje/>: staženo 1. 12. 2017
- [36] Owuor P. O., Tea, Analysis and Tasting, v *Encyklopedia of Food Sciences and Nutrition*, Caballero B., Trugo C. L., Finglas P. M., Academica Press, Elsevier Science 2003, vydání 2., svazek 9., str. 5757-5761.

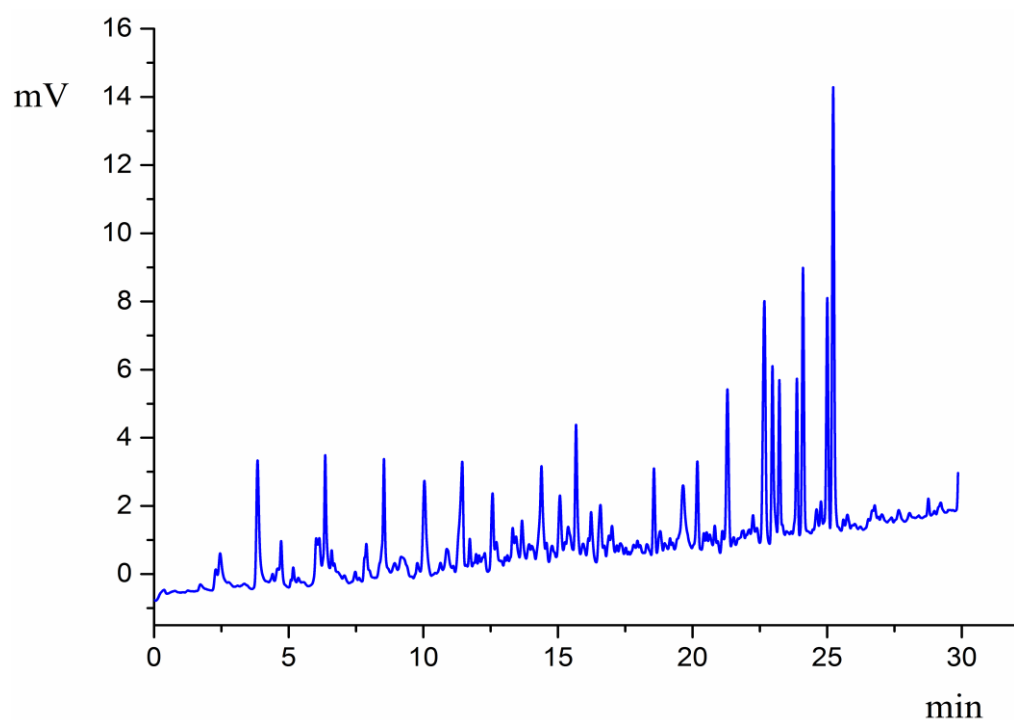
- [37] Straková M., Matisová E., SúčasnÉ trendy v analýze organických látok vo vzorkách vÓd s využitím HRGC a jej kombinácie s predkoncentračnými technikami, Chemické listy, 91, (1997), 330-341.
- [38] Online: <https://www.chromservis.eu/i/spme-arrow/c/chromatography-news>: staženo 11. 12. 2017
- [39] Sýs M., Mikroextrakční techniky využívající tuhé sorbenty, Pardubice 2009, 46 s., Bakalářská práce, Univerzita Pardubice, Fakulta Chemicko-technologická, Vedoucí práce: doc. Ing. Martin Adam Ph.D.
- [40] Sedláčková J., Matisová E., Slezáčková M., Mikroextrakcia na tuhej fáze a jej využitie v enviromentálnej analýze, Chemické listy, 92, (1998), 633-642.
- [41] Raymond A., villalobos R., PROCESS GAS CHROMATOGRAPHY Fundamentals and Applications, Instrument Society of America, 1992, str. 449.
- [42] Bartovský T., Provozní plynové chromatografy, Automa, 4, (2017), 24-29.
- [43] Online: [https://sk.wikipedia.org/wiki/Plynov%C3%A1\\_chromatografia](https://sk.wikipedia.org/wiki/Plynov%C3%A1_chromatografia): staženo 21.3.2018.
- [44] Jennings W., Shibamoto T., Qualitative Analysis of Flavour and Fragrance Volatiles by Glass Capillary gas Chromatography, Academic Press, 1980, str. 472.
- [45] Online:<http://community.asdlib.org/imageandvideoexchange/forum/files/2013/08/Figure12.25.jpg>: staženo 22.3.2018
- [46] Horák T., Čulík J., Jurková M., Čejka P., Kellner V., Dvořák J., Hašková D., Základní detektory v plynové chromatografii používané v pivovarské analytice, Kvasný Průmysl, 57, (2011), 138-142.
- [47] Guo H., Mettas A., Design of Experiments and Data Analysis, Annual Reliability and Maintainability Symposium, 2012, 14 str.
- [48] Leardi R., Experimental design in chemistry, Analytica Acta, 652, (2009), 161-172.



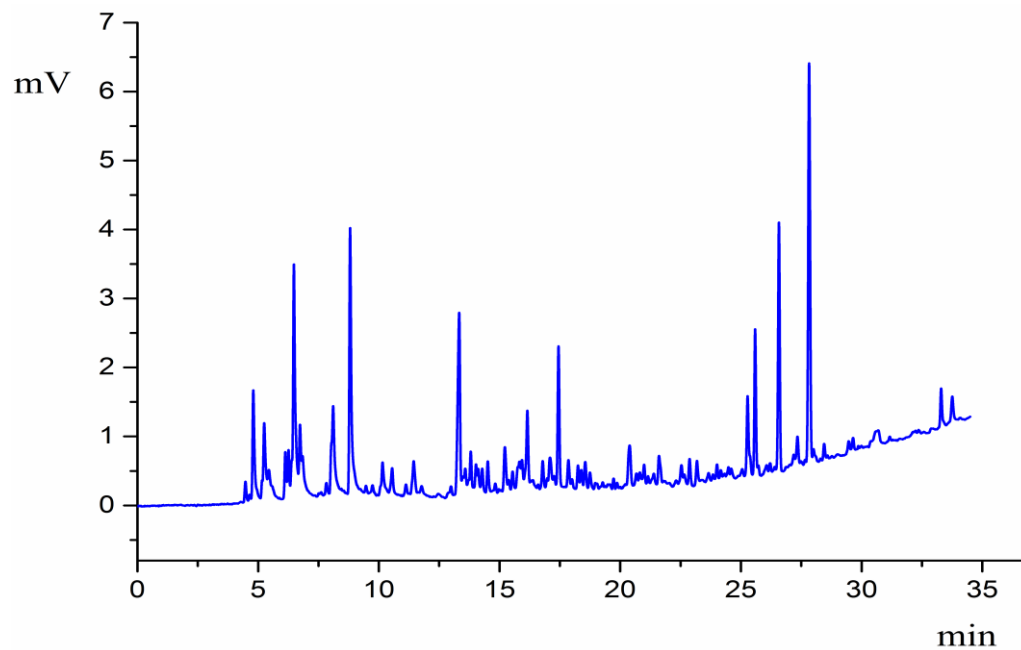
- [49] Hanrahan G., Lu K., Application of Factorial and Response Surface Methodology in Modern Experimental Design and Optimization, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36, (2006), 141-151.
- [50] Bc. Šilarová P., Využití mikroextrakce tuhou fází pro analýzu aromaprofilu bylinných čajů, Pardubice 2014, 114 s., Diplomová práce, Univerzita Pardubice Fakulta Chemicko-technologická, Vedoucí práce: doc. Ing. Martin Adam Ph.D.
- [51] Sheibani E., Duncan S. E., Kuhn d. D., Dietrich A. M., Newkirk J. J., O'Keefe S. F., Changes in flavor volatile composition of oolong tea after panning during tea processing, *Food Science & Nutrition*, 4, (2016), 456-468.
- [52] Wu Y., Lv S., Lian M., Wang Ch., Gao X., Meng Q., Study of characteristic aroma components of baked Wujiatai green tea by HS-SPME/GC-MS combined with principal component analysis, *JOURNAL of FOOD*, 14, (2016), 423-432.
- [53] Wang Ch., Lv Sh, Wu Y, Lian M., Gao X., meng Q., Study of aroma formation and transformation during the manufacturing process of Biluochun green tea in Yunnan Province by HS-SPME and GC-MS, *J. sci Food Agric*, 96, (2016), 4492-4498.
- [54] Wu Y., Lv S, Wang Ch., Gao X., li J., Meng Q., Comparative analysis of volatiles difference of Yunnan sun-dried Pu-erh green tea from different tea mountains: Jingmai and Wuliang mountain by chemical fingerprint similarity combined with principal component analysis and cluster analysis, *Wu et al. Chemistry Central Journal*, 10, (2016), 11.
- [55] Ma L., Qiao Y., Du L., Li Y., Huang S., Liu F., Xiao D., Evaluation and Optimization of a Superior Extraction Method for the Characterization of the Volatile Profile of Black Tea by HS-SPME/GC-MS, *Food Anal. Methods*, 10, (2017), 2481-2489.

- [56] Yanaginoto K., Ochi H., Lee k. G., Shibamoto T., Antioxidative Activities of Volatile Extracts from Green Tea, Oolong Tea and Black Tea, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, (2003), 7396-7401.
- [57] Kato M., Shibamoto T., variation of major Volatile Constituents in Various Green Teas from Southeast Asia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, (2001), 1394-1396.

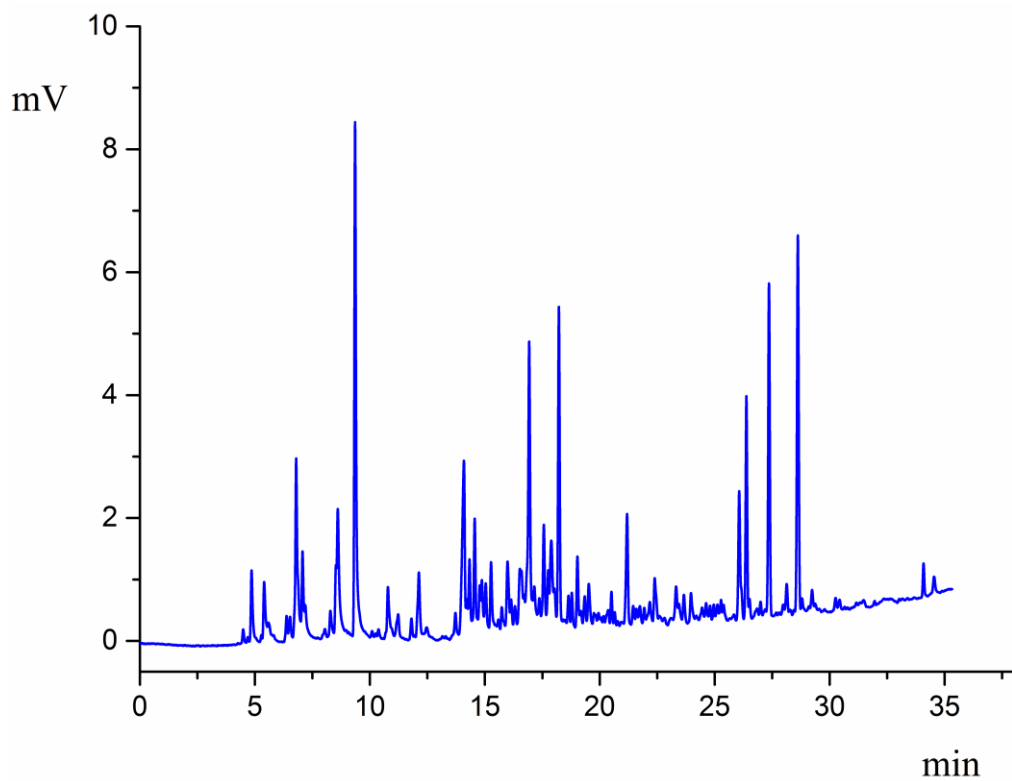
## 6 Přílohy



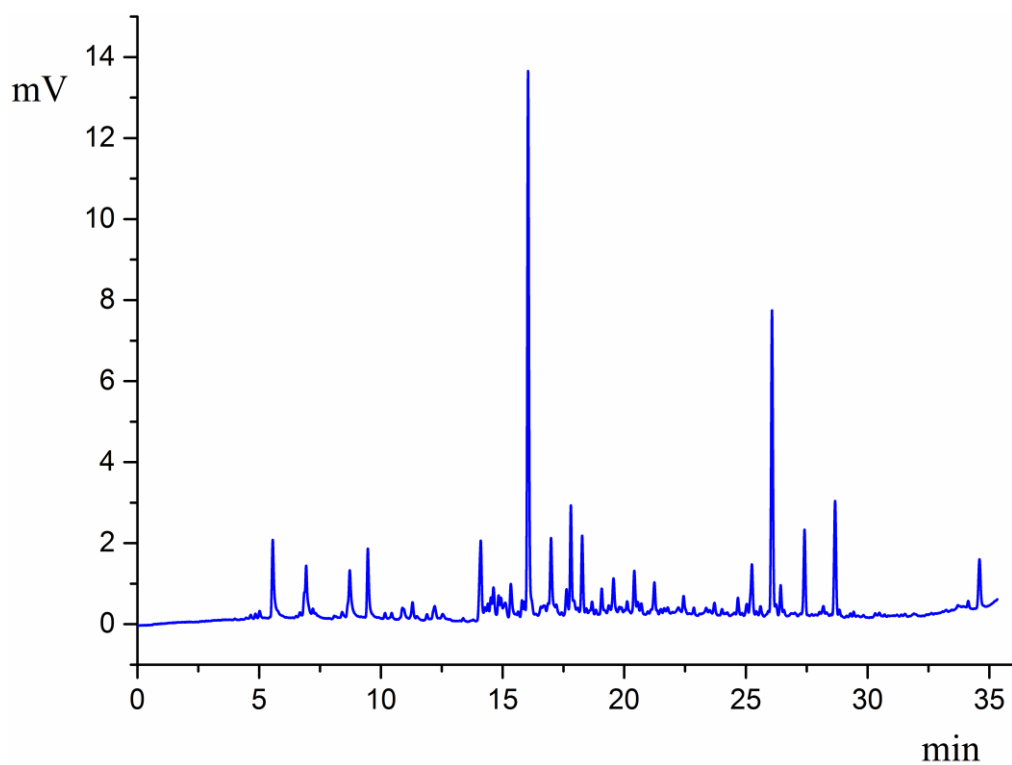
**Obr. P1** Chromatografická separace těkavých látek obsažených v zeleném čaji Dukat. HS-SPME 70 °C 30 minut, doba sorpce 25 minut, teplota nástřiku 250 °C ,teplota detektoru 250 °C, lineární rychlost 25 cm/s, teplotní program 55 °C- 5 minut, 7 °C/min do 250 °C.



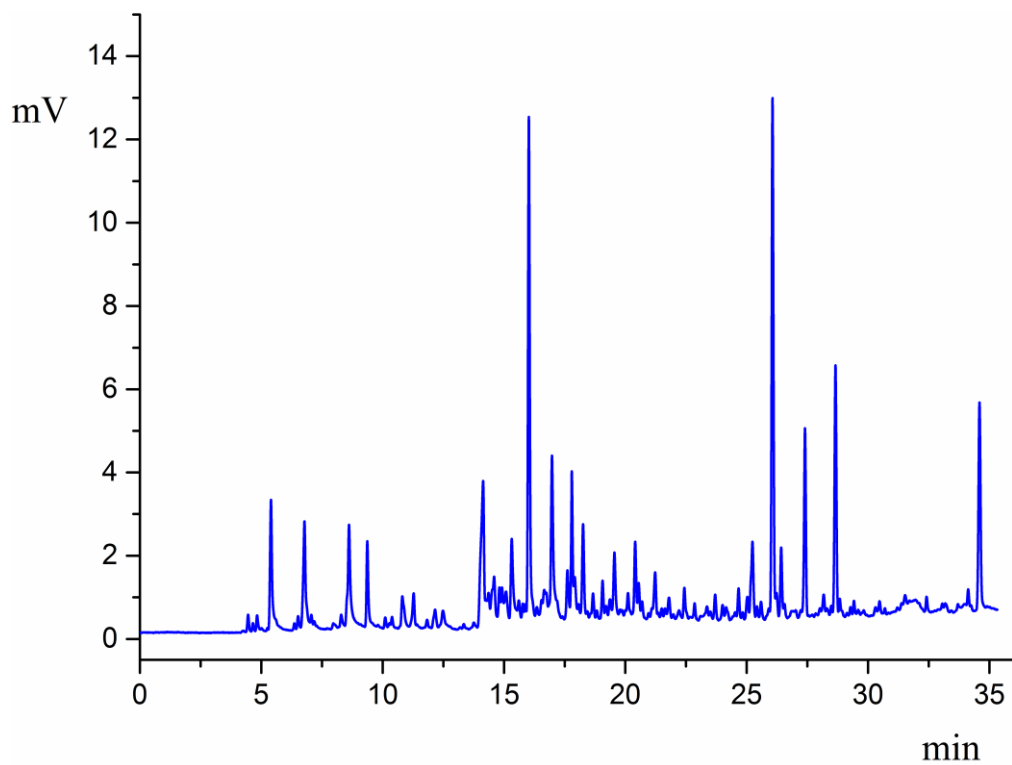
**Obr. P2** Chromatografická separace těkavých látek obsažených v zeleném čaji Dukat. HS-SPME 70 °C 30 minut, doba sorpce 25 minut, teplota nástřiku 250 °C ,teplota detektoru 250 °C, lineární rychlost 25 cm/s, teplotní program 55 °C- 5 minut, 6 °C/min do 250 °C.



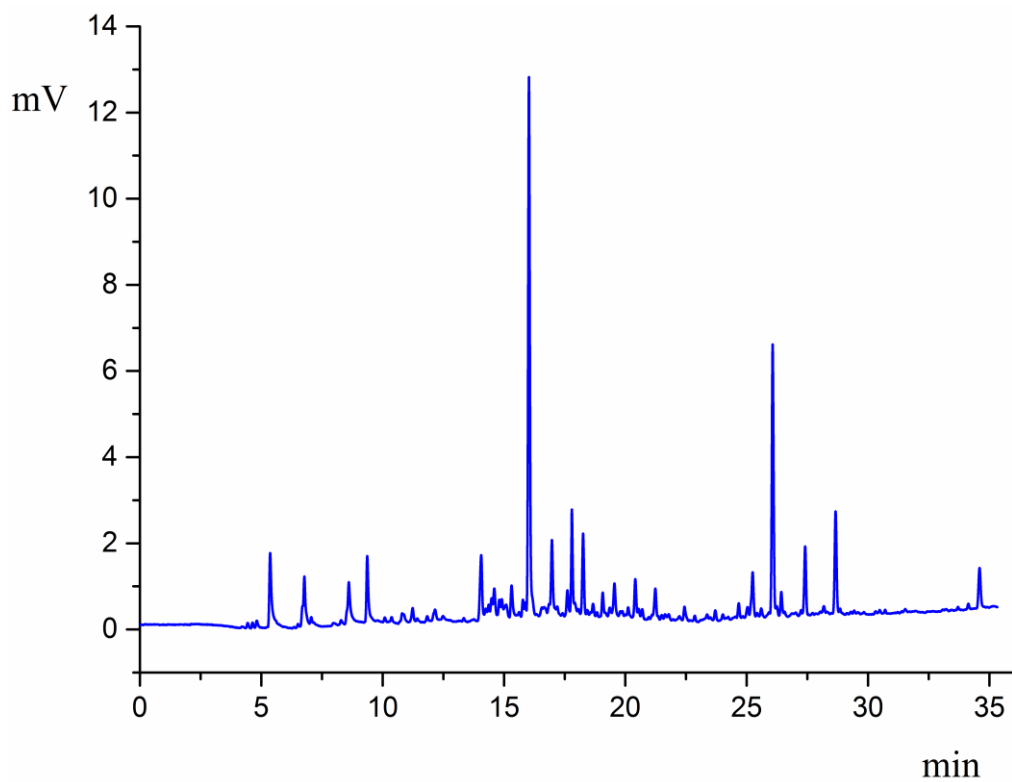
**Obr. P3** Chromatografická separace těkavých látek obsažených v zeleném čaji Dukat. HS-SPME 70 °C 30 minut, doba sorpce 25 minut, teplota nástřiku 250 °C, teplota detektoru 250 °C, lineární rychlost 25 cm/s, teplotní program 50 °C- 5 minut, 6 °C/min do 250 °C.



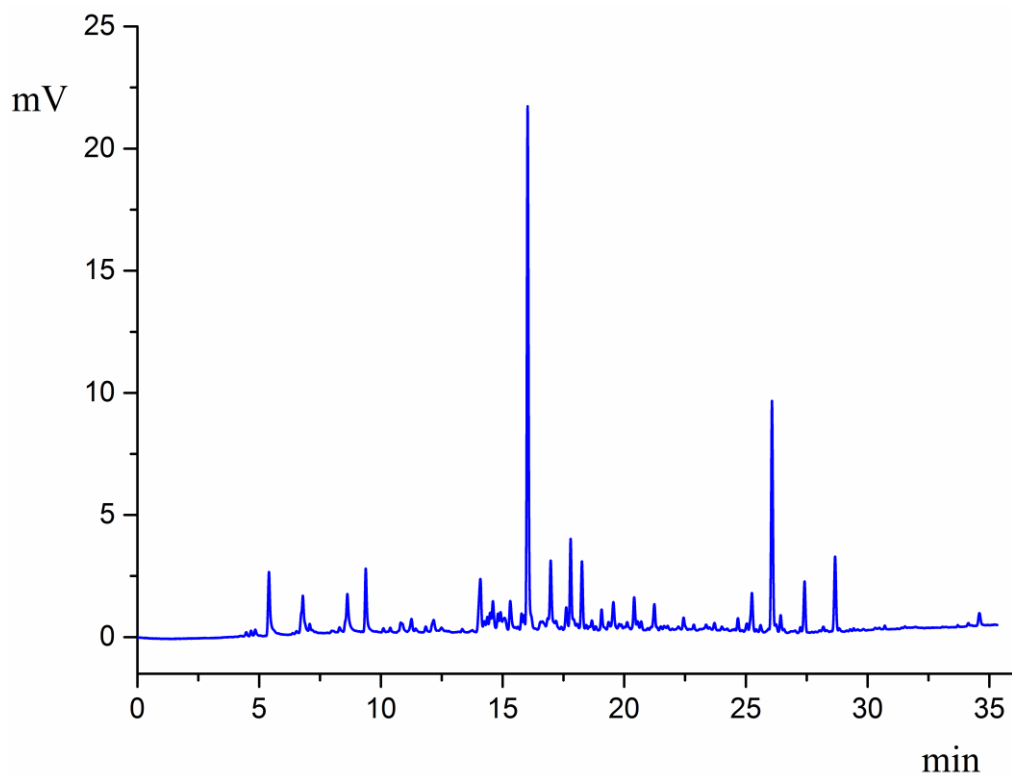
**Obr. P4** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 50/90 °C a kombinaci časů 5/5 min.



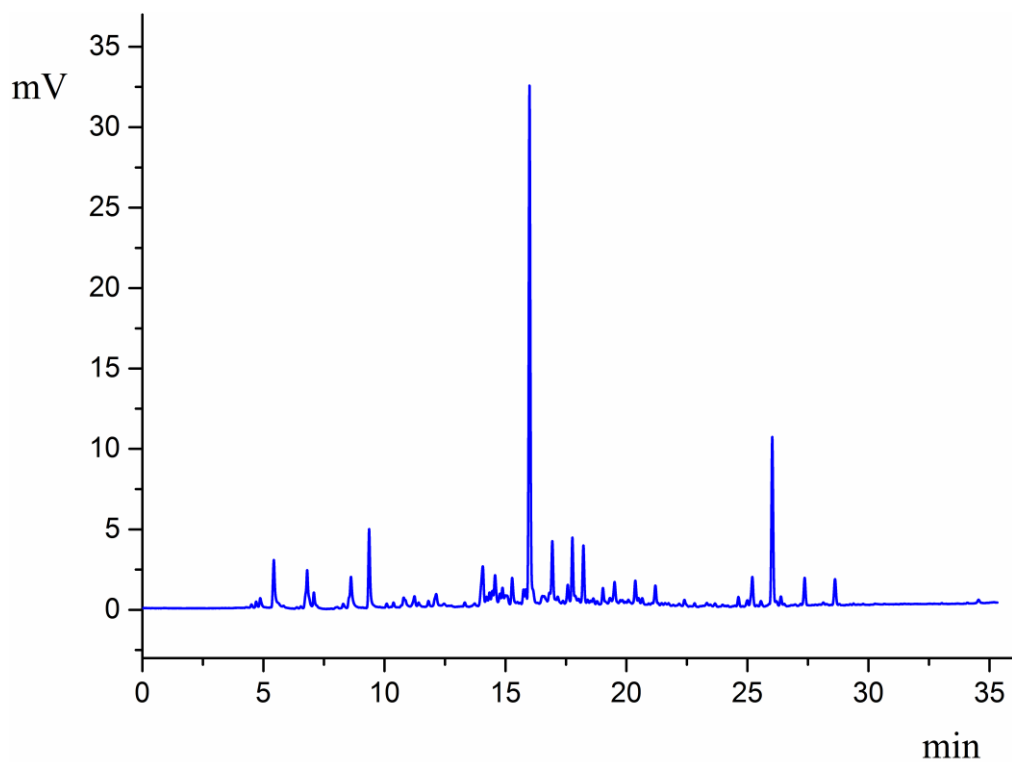
**Obr. P5** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 30/90 °C a kombinaci časů 20/20 min.



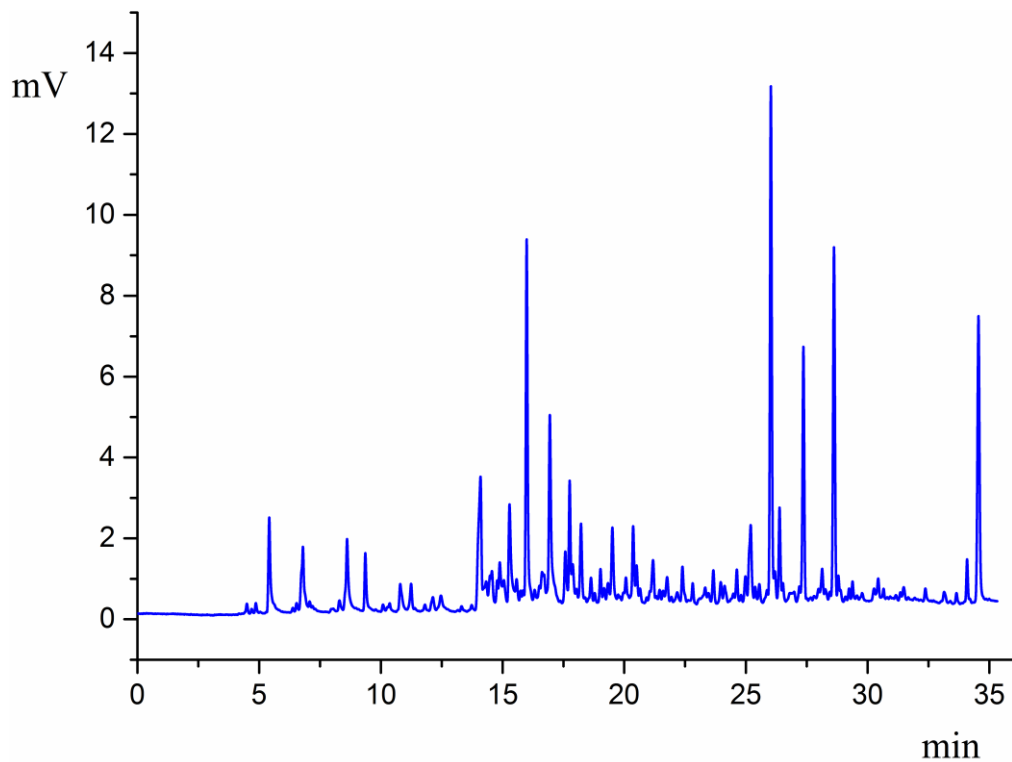
**Obr. P6** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 30/90 °C a kombinaci časů 20/5 min.



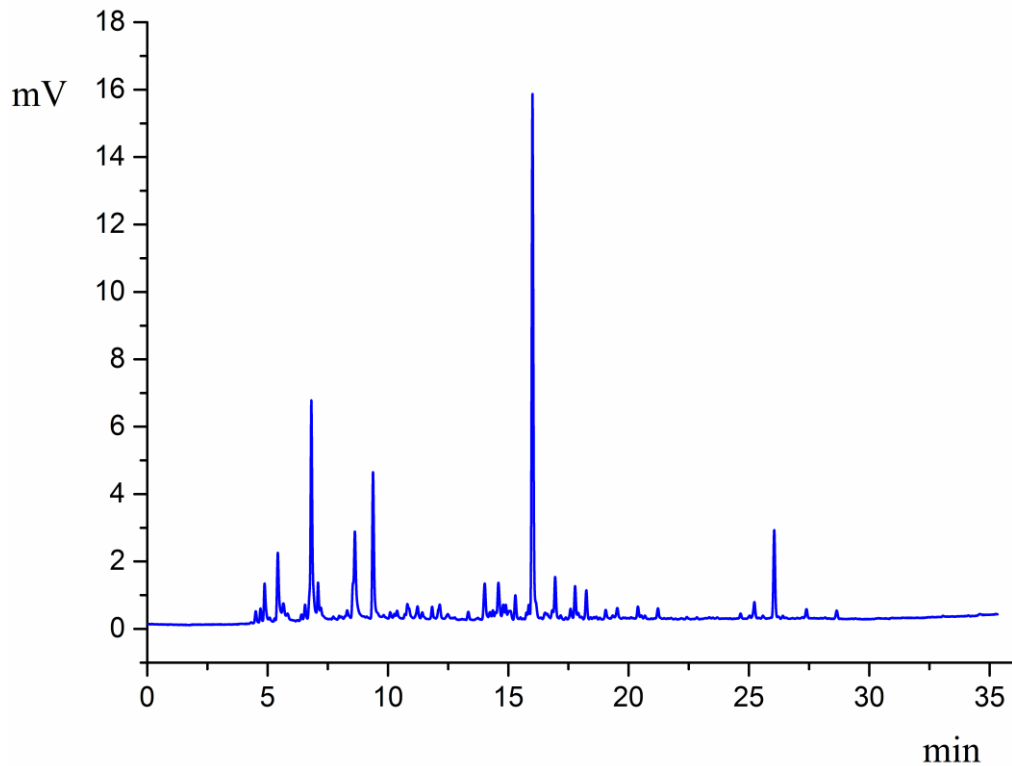
**Obr. P7** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 40/70 °C a kombinaci časů 12,5/12,5 min.



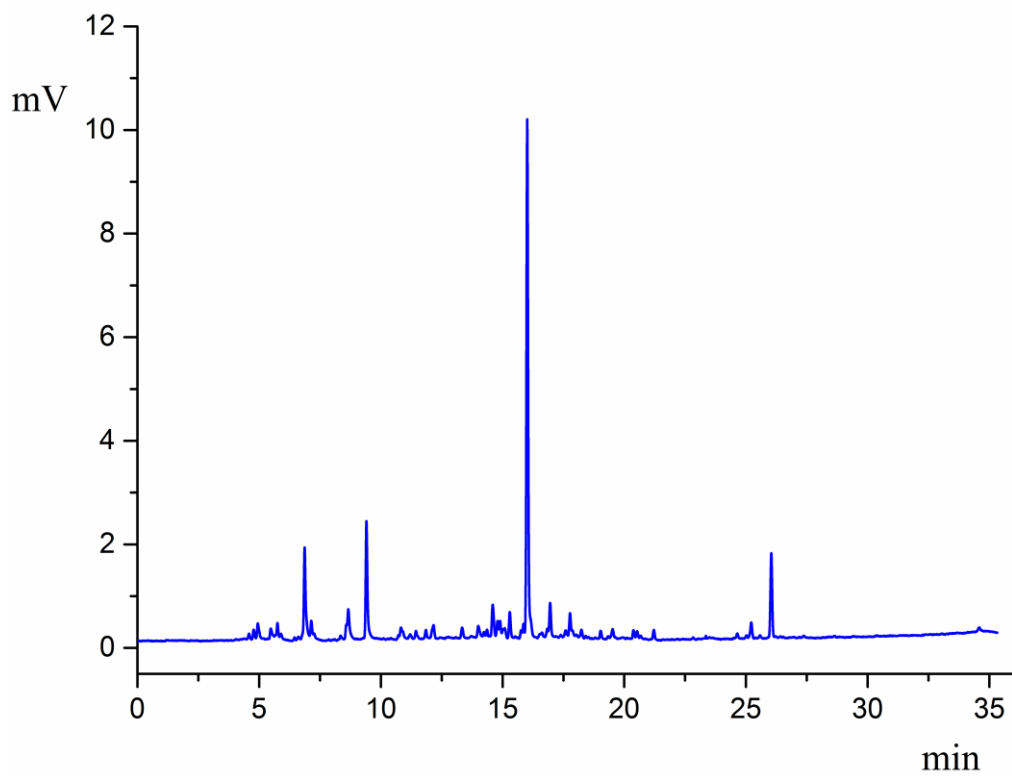
**Obr. P8** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 50/50 °C a kombinaci časů 20/5 min.



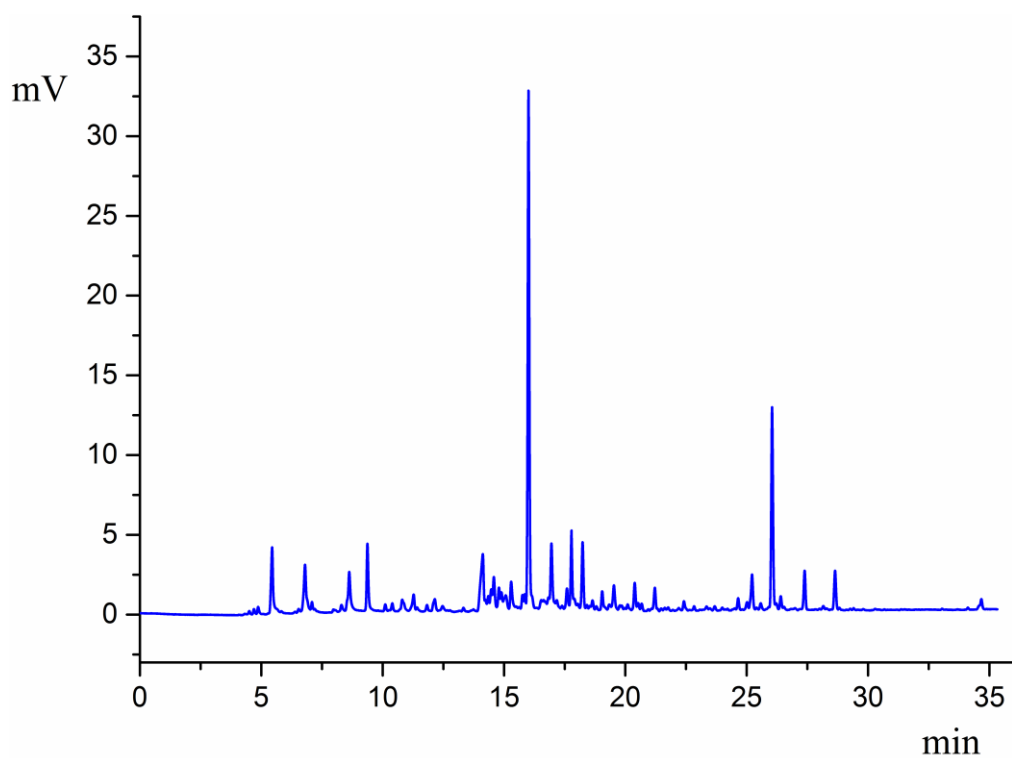
**Obr. P9** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 50/90 °C a kombinaci časů 20/20 min.



**Obr. P10** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 30/50 °C a kombinaci časů 20/5 min.

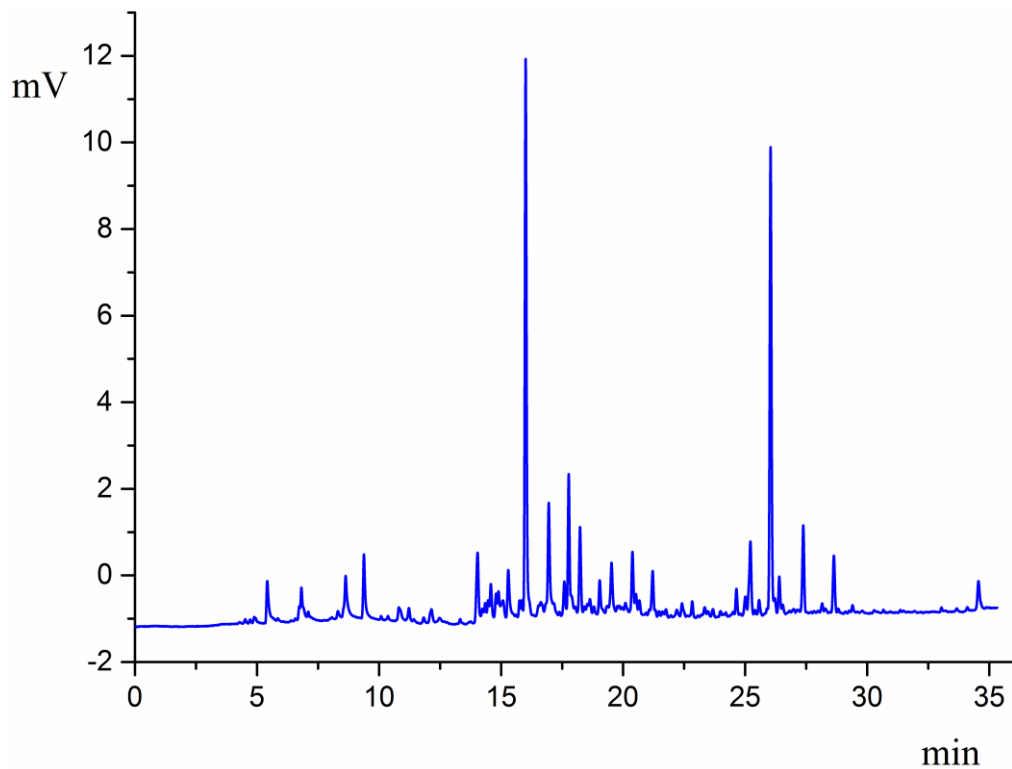


**Obr. P11** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 30/50 °C a kombinaci časů 5/5 min.

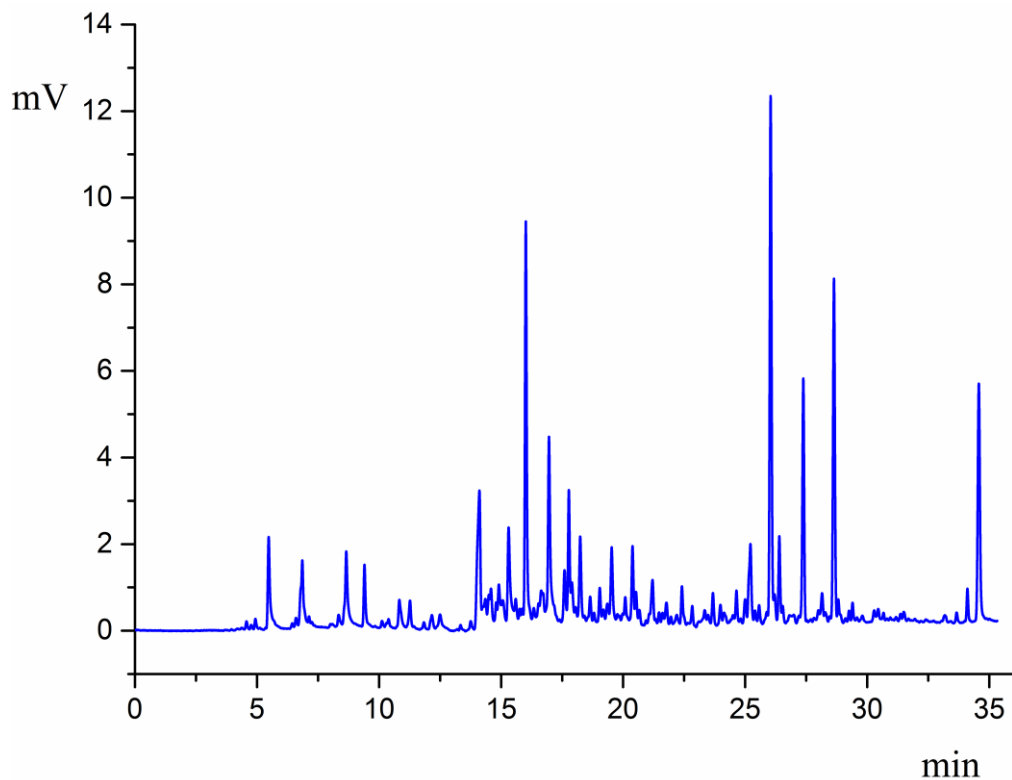


**Obr. P12** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 50/50 °C a kombinaci časů 20/20 min.

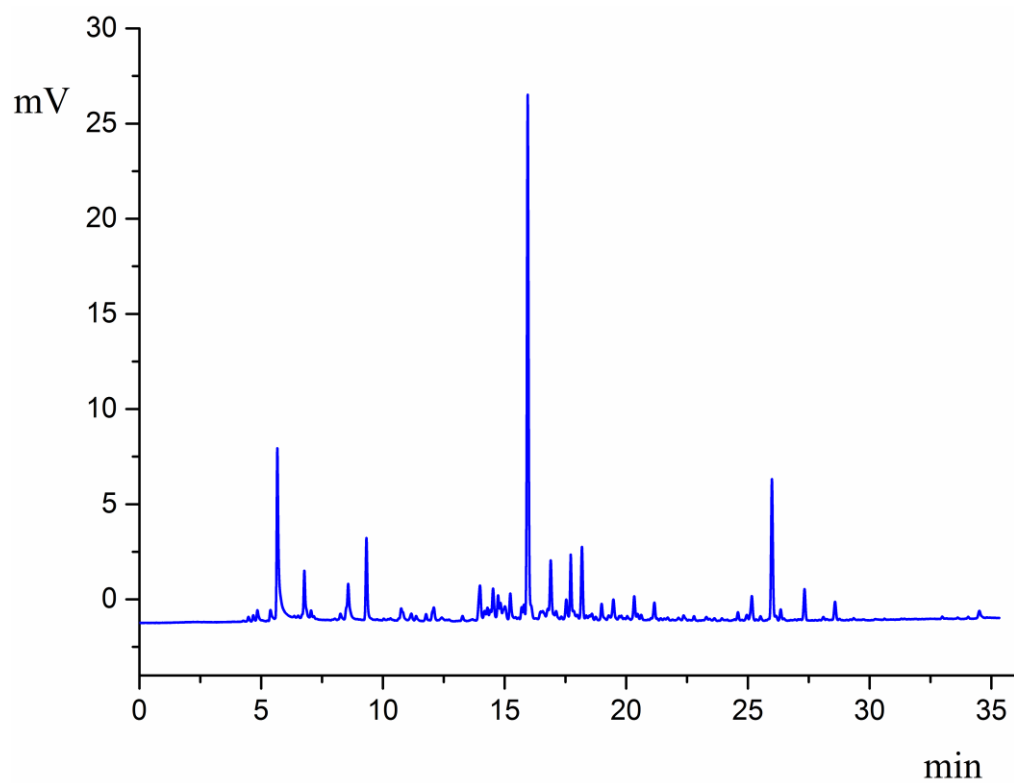




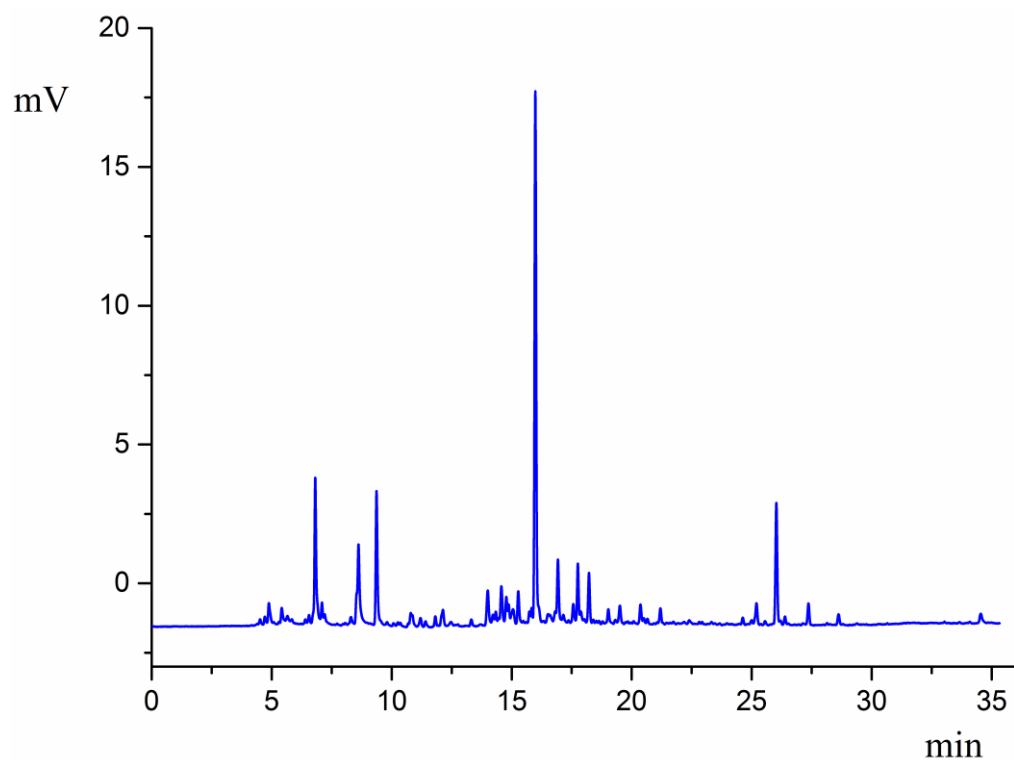
**Obr. P13** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 50/90 °C a kombinaci časů 20/5 min.



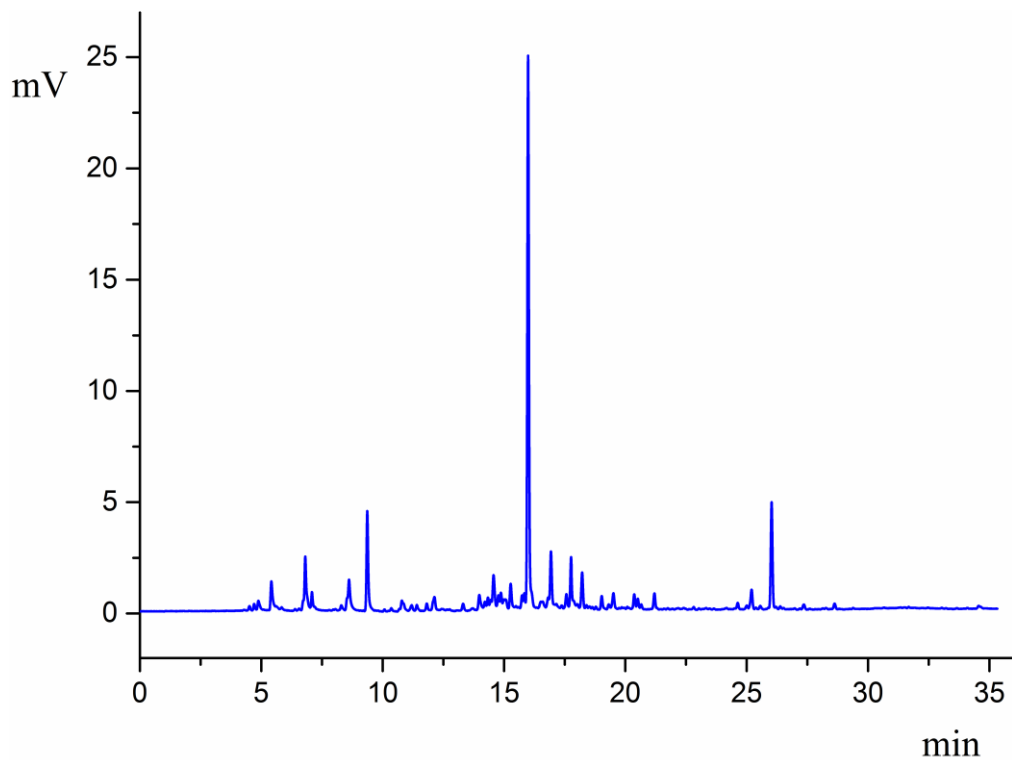
**Obr. P14** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 50/90 °C a kombinaci časů 5/20 min.



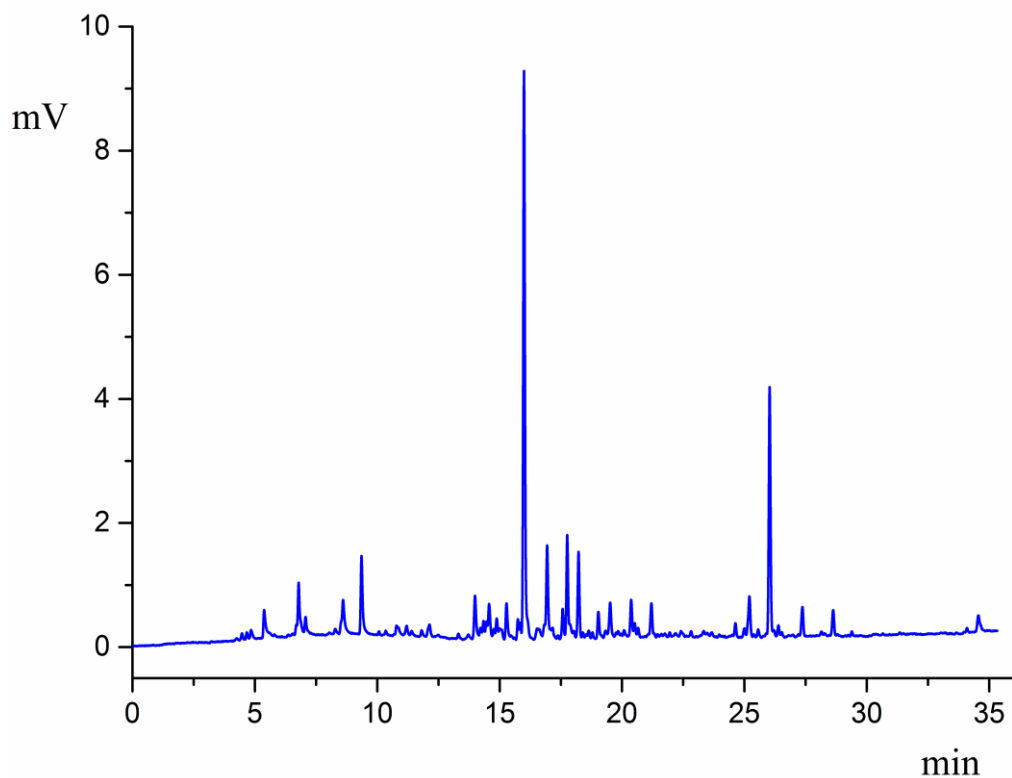
**Obr.P15** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 50/50 °C a kombinaci časů 5/20 min.



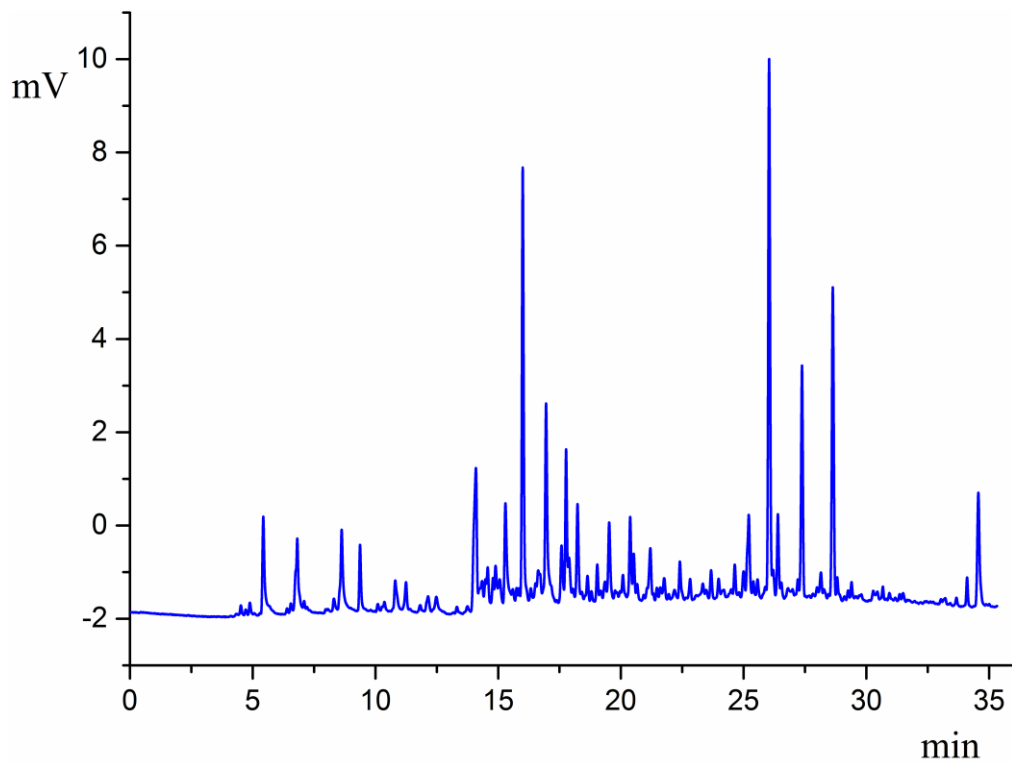
**Obr. P16** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 50/50 °C a kombinaci časů 5/5 min.



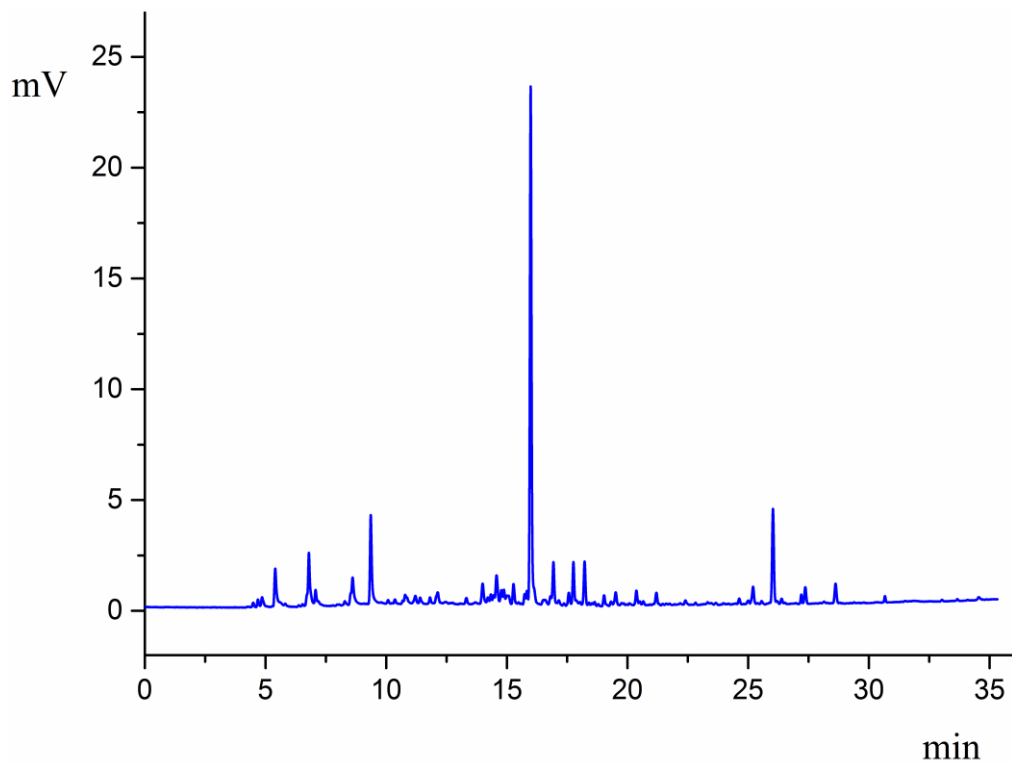
**Obr. P17** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 30/50 °C a kombinaci časů 20/20 min.



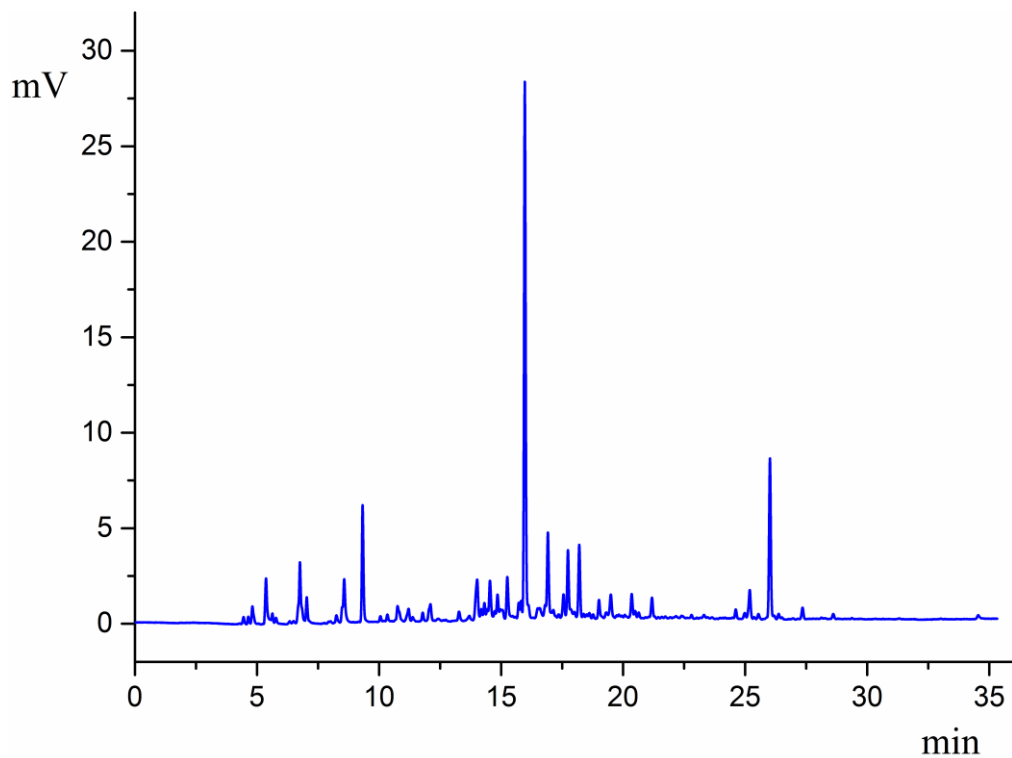
**Obr. P18** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 30/90 °C a kombinaci časů 5/5 min.



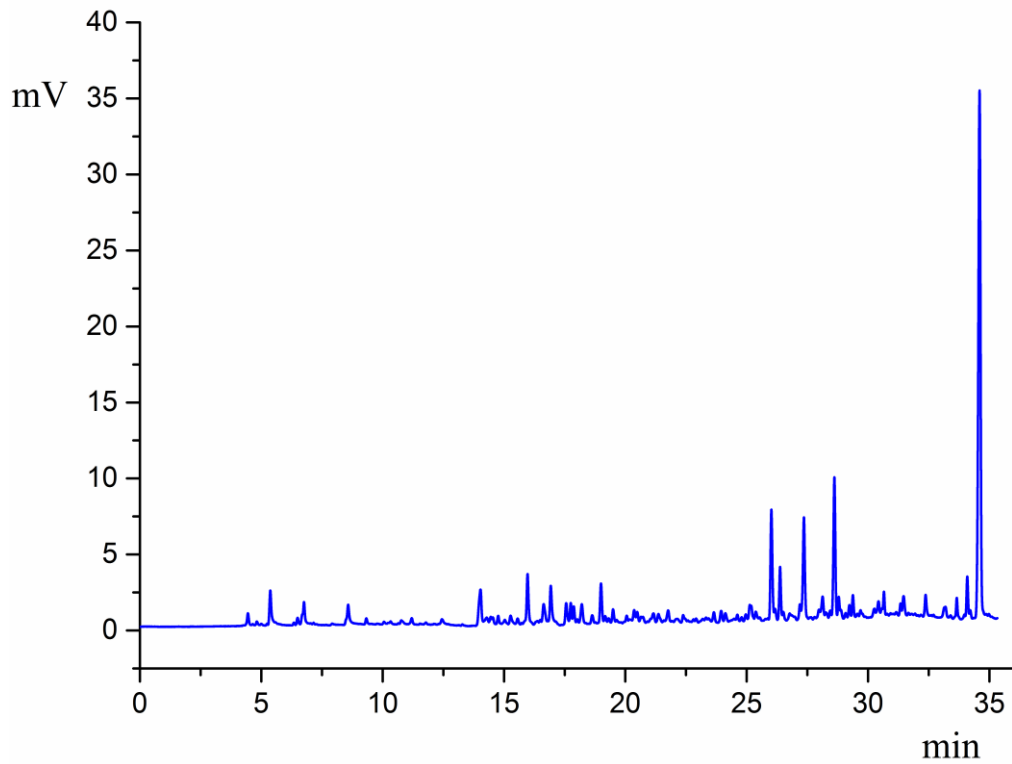
**Obr. P19** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 30/90 °C a kombinaci časů 5/20 min.



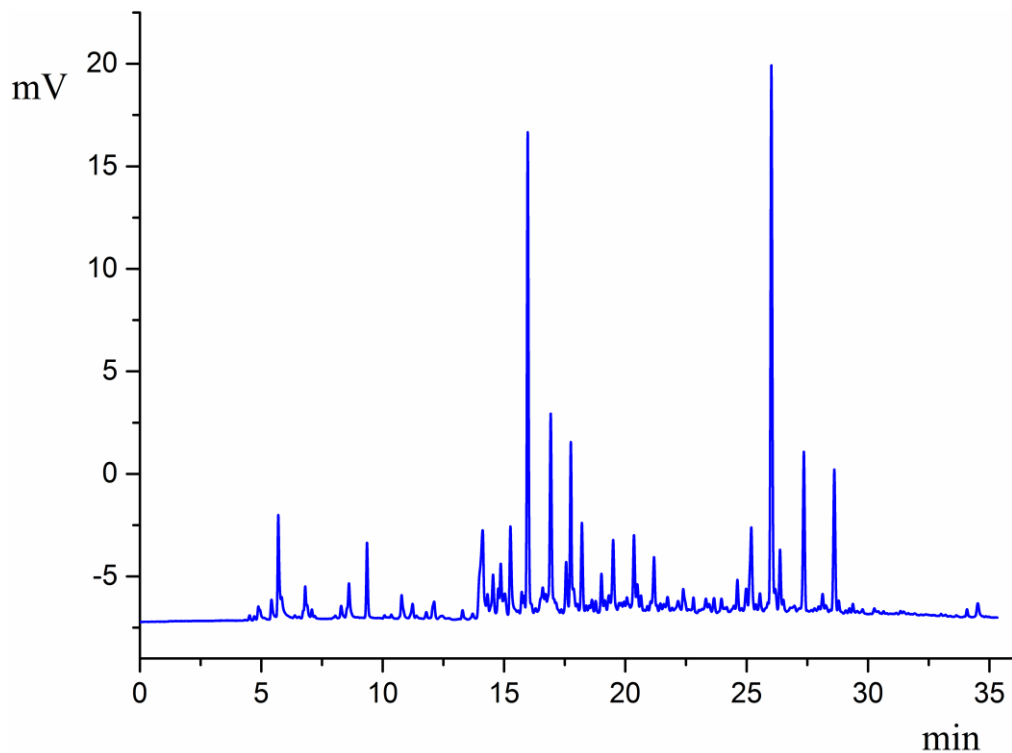
**Obr. P20** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci teplot 30/50 °C a kombinaci časů 5/20 min.



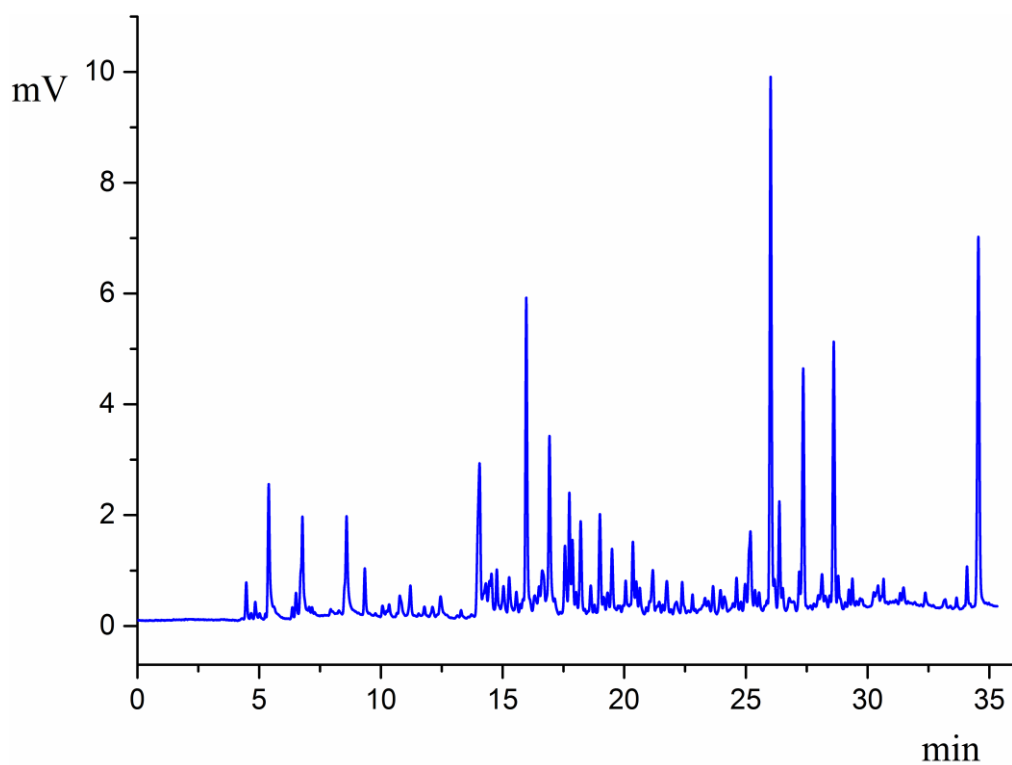
**Obr. P21** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci jedné teploty a jednoho času 40 °C/50 min.



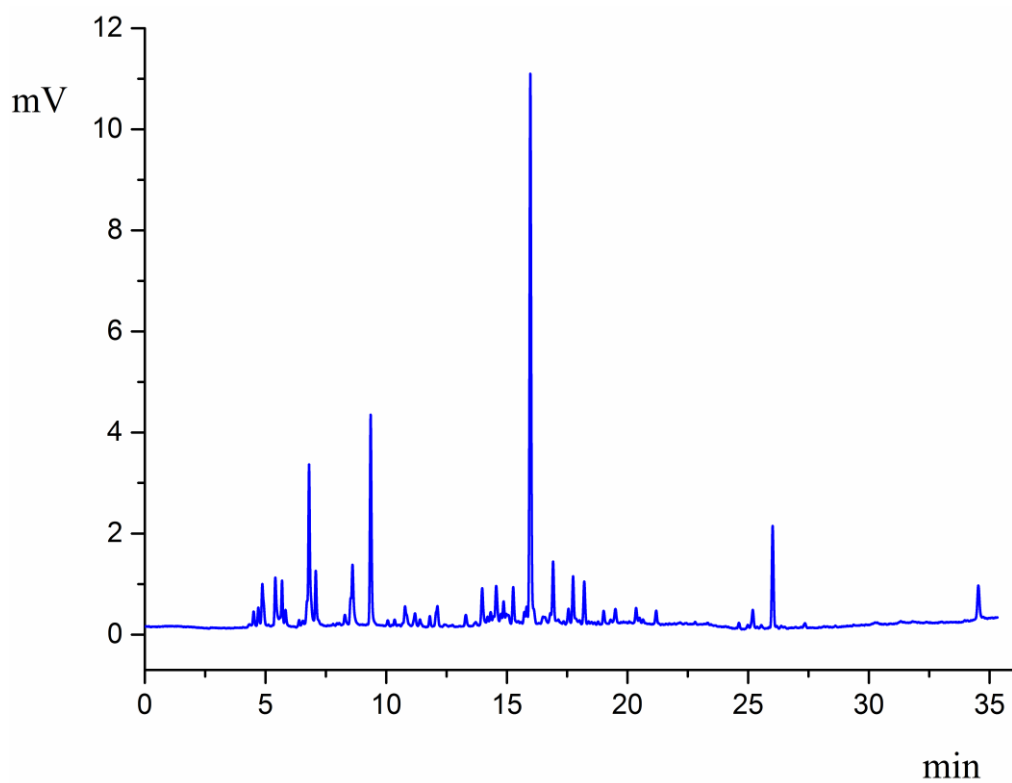
**Obr. P22** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci jedné teploty a jednoho času 100 °C/50 min.



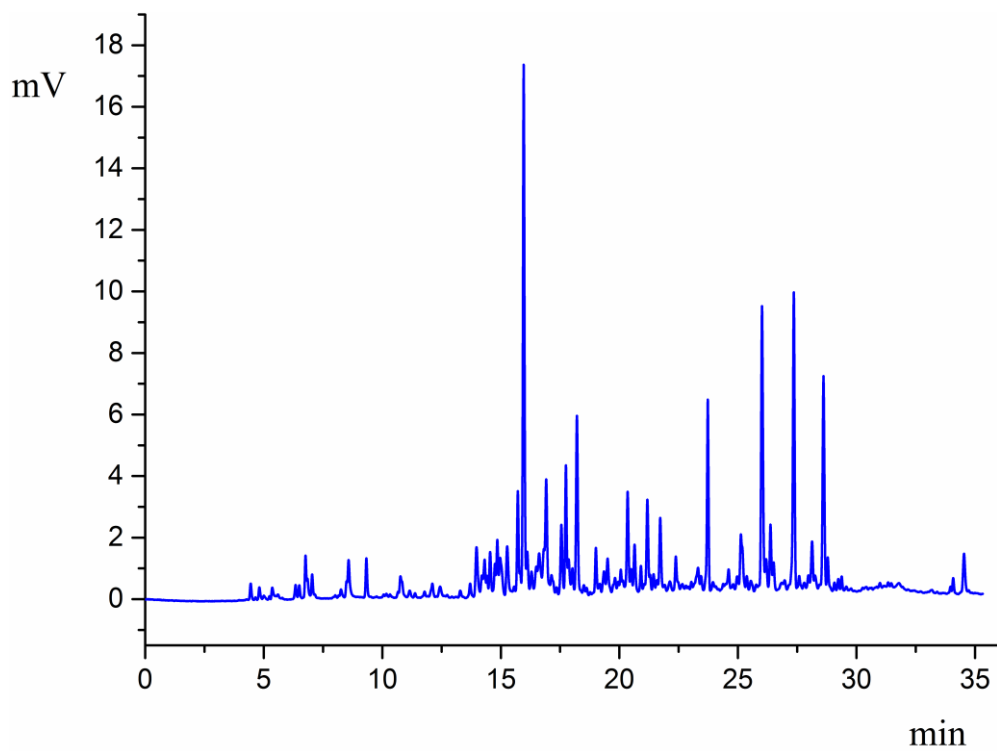
**Obr. P23** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci jedné teploty a jednoho času 70 °C/30 min.



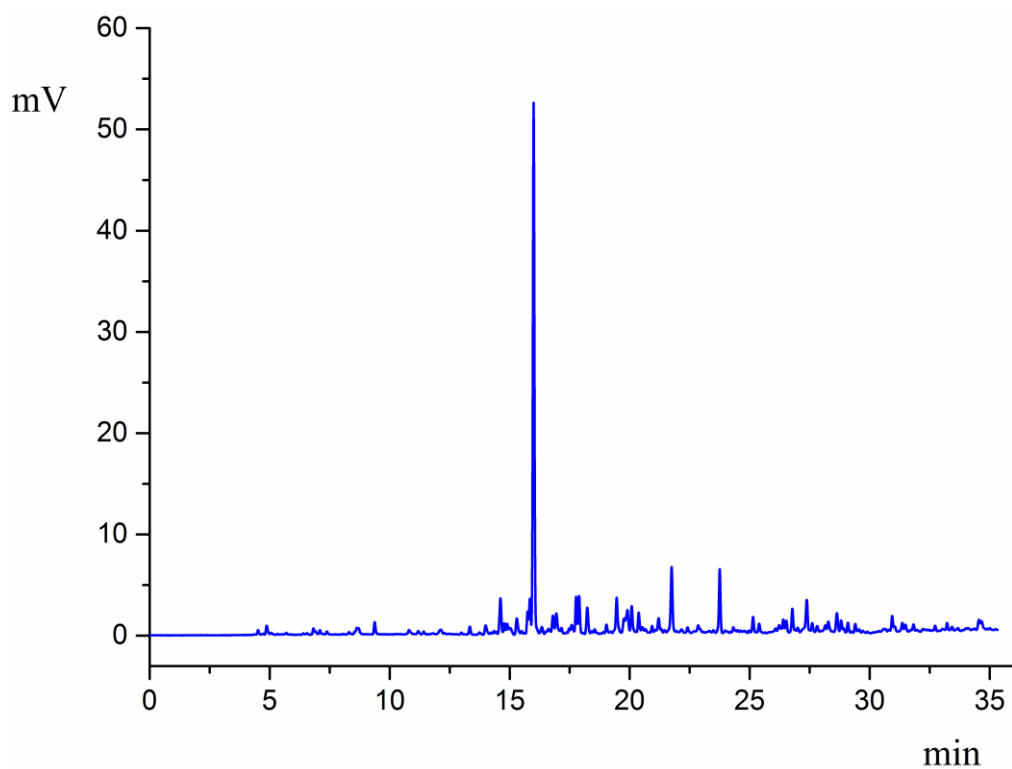
**Obr. P24** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci jedné teploty a jednoho času 100 °C/10 min.



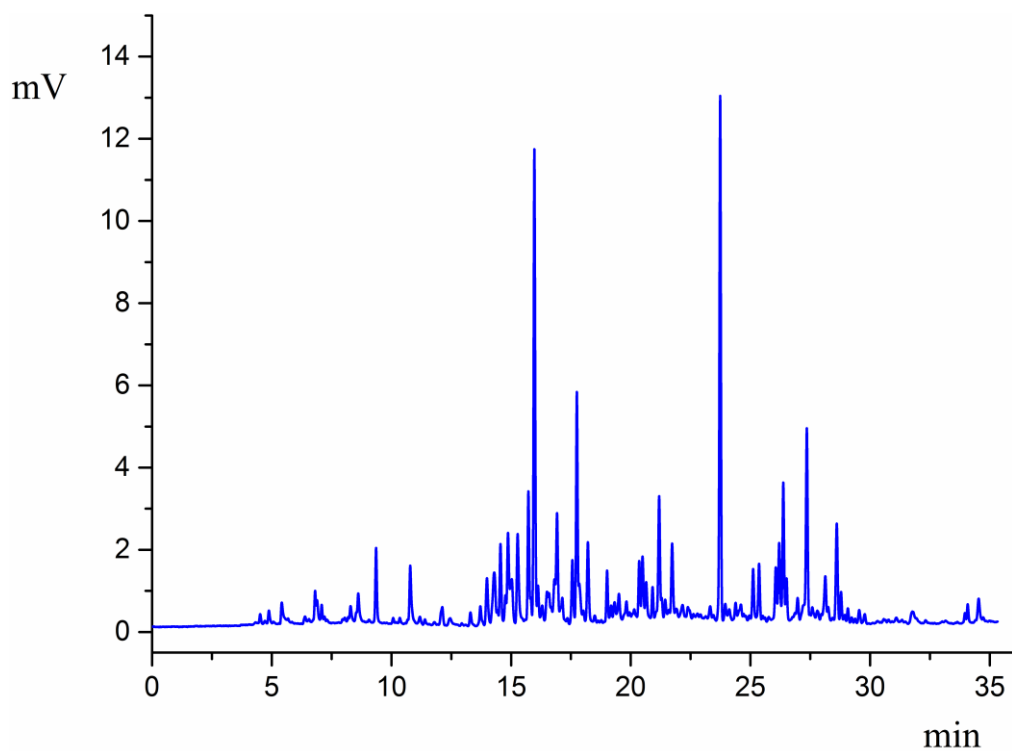
**Obr. P25** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci HS-SPME pro kombinaci jedné teploty a jednoho času 40 °C/10 min.



**Obr. P26** Chromatogram vzorku sypaného zeleného čaje *Gunpowder Temple of Heaven* původem z Číny.

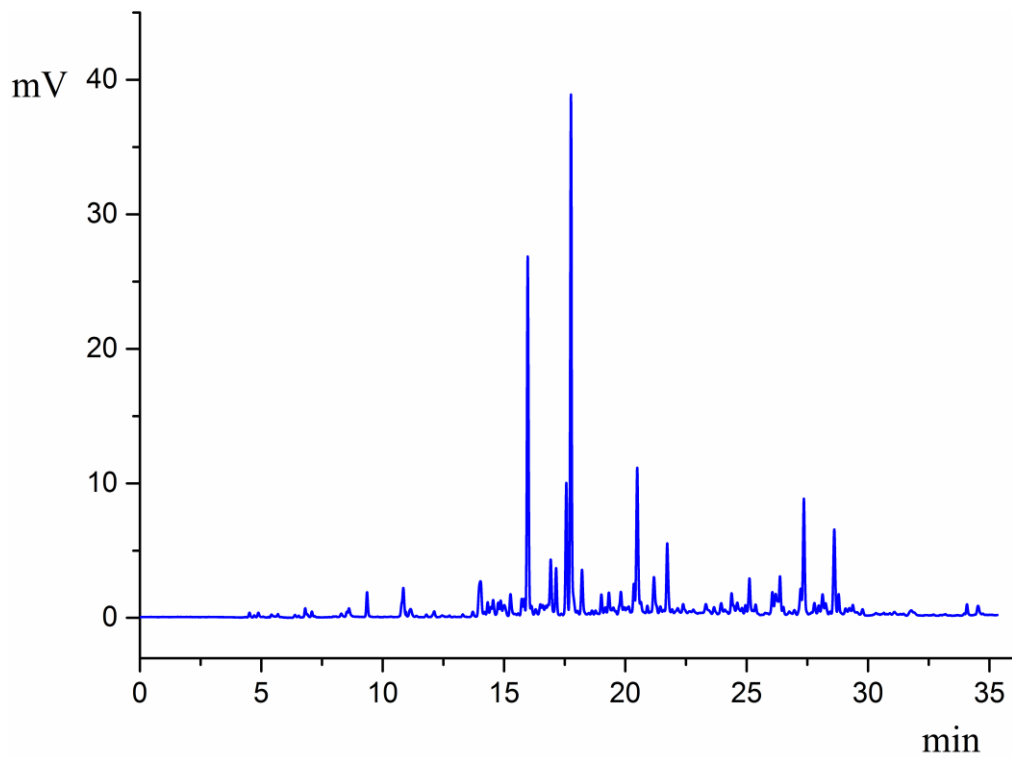


**Obr. P27** Chromatogram vzorku sypaného zeleného čaje *Ché ngon so* původem z Vietnamu.

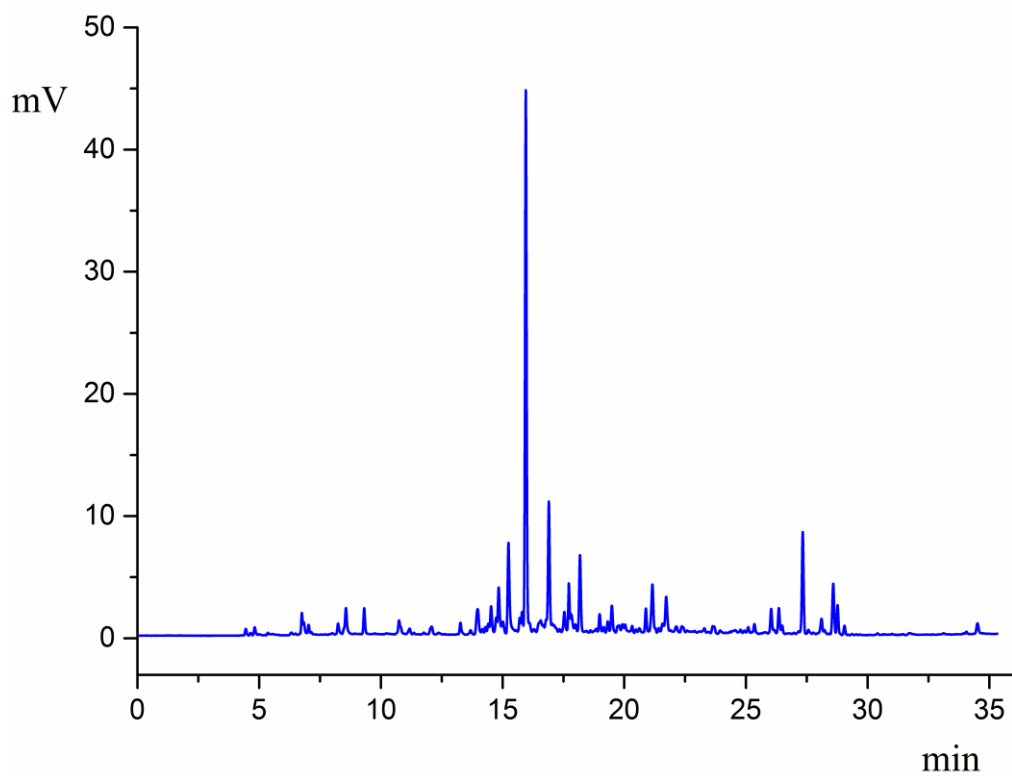


**Obr. P28** Chromatogram vzorku sypaného zeleného čaje *Ceylon Green* původem ze Srí lanky.

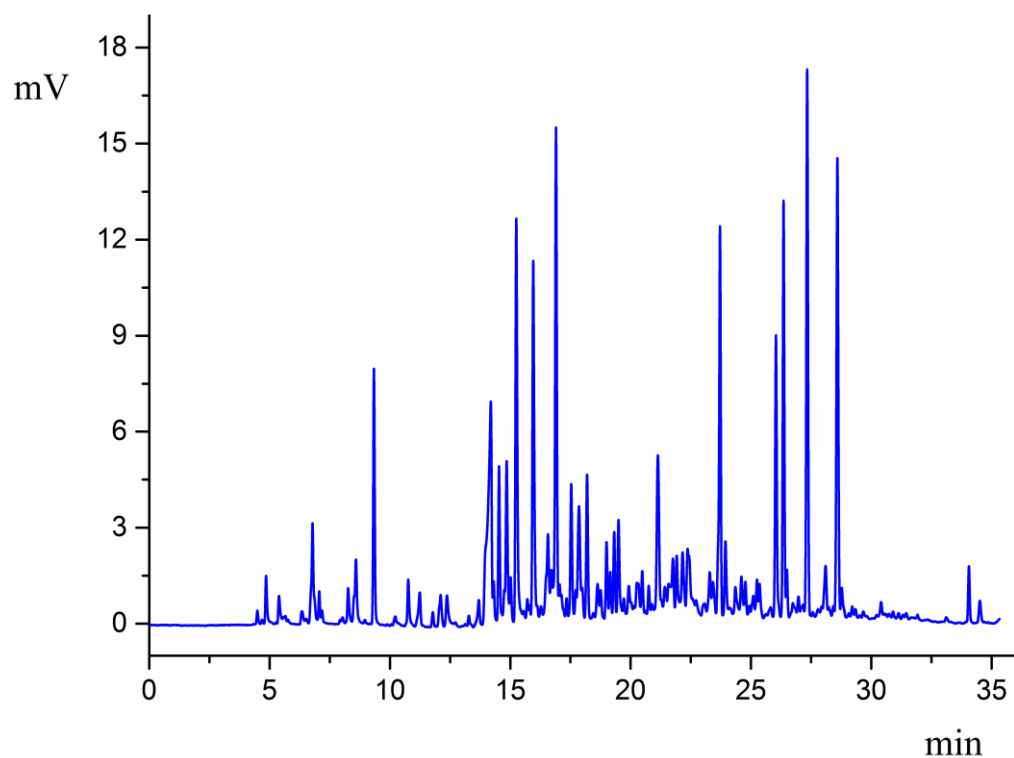




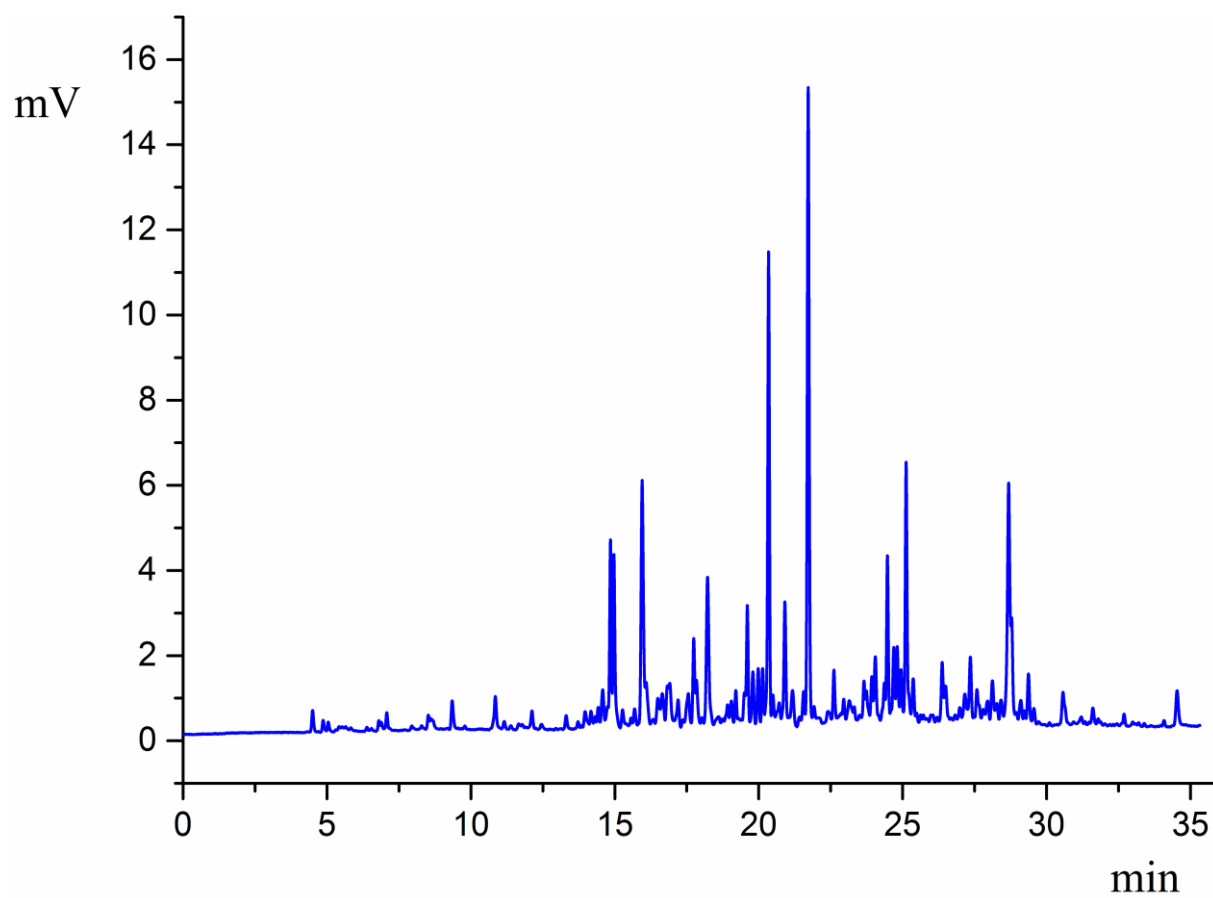
**Obr. P29** Chromatogram vzorku sypaného zeleného čaje *Assam Green Tea Op* původem z Indie.



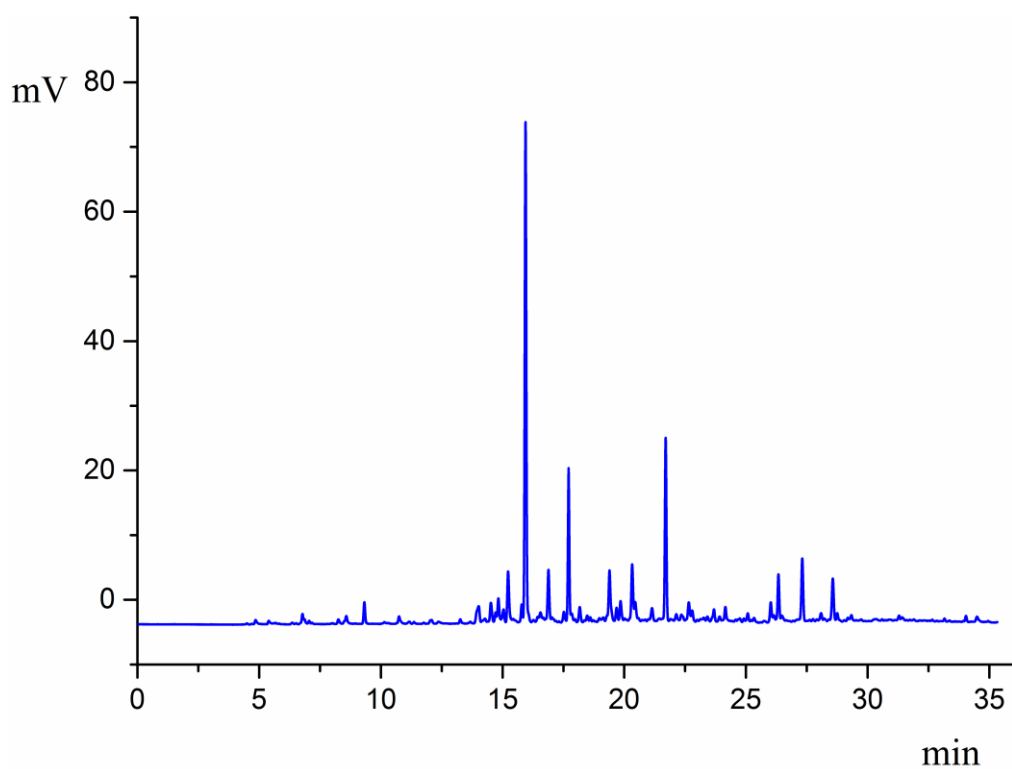
**Obr. P30** Chromatogram vzorku sypaného zeleného čaje *Joongjak* původem z Koreje.



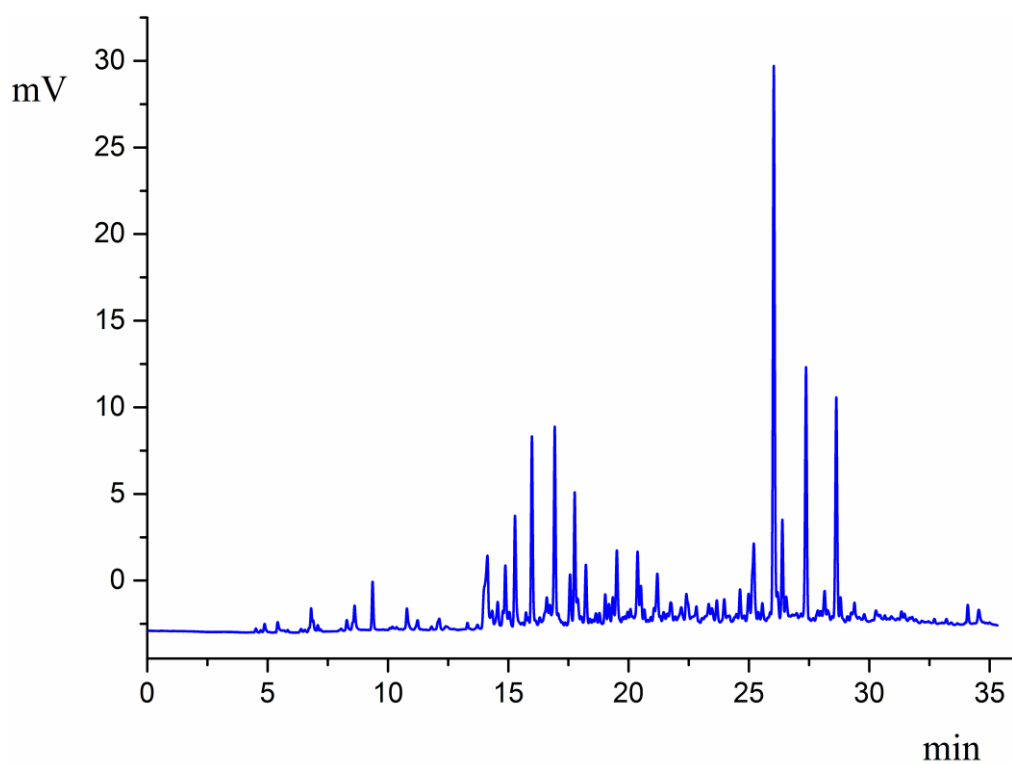
**Obr. P31** Chromatogram vzorku sypaného zeleného čaje *Sencha* původem z Číny.



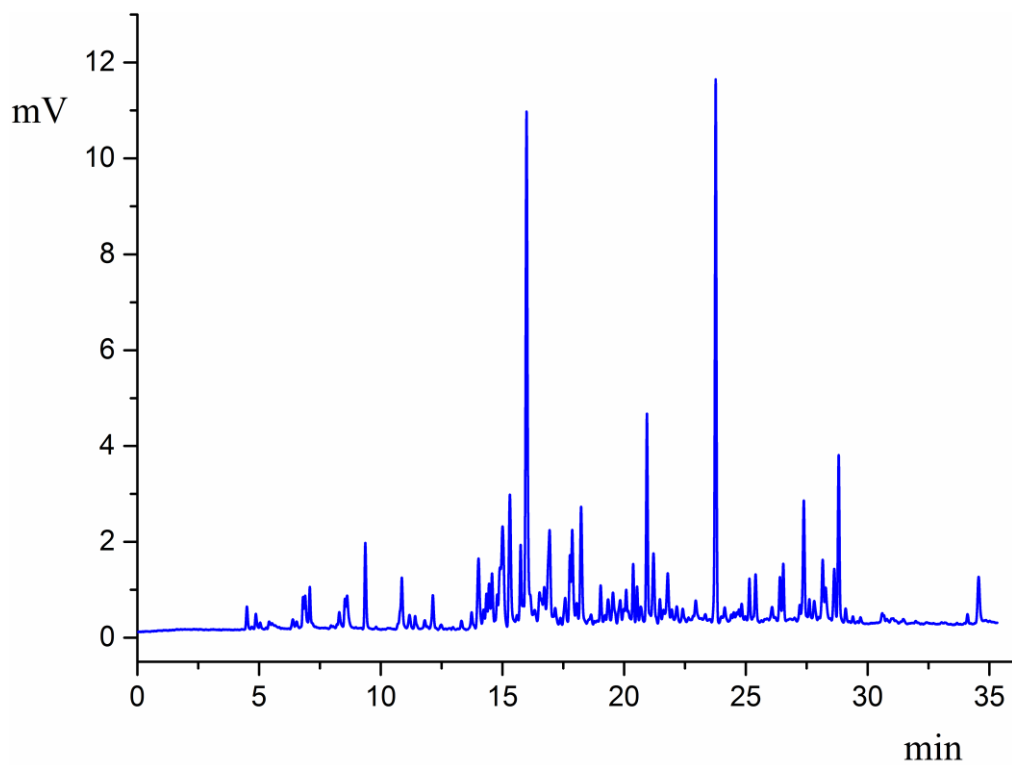
**Obr. P32** Chromatogram vzorku sypaného zeleného čaje *Zealong Green* původem z Nového Zélandu.



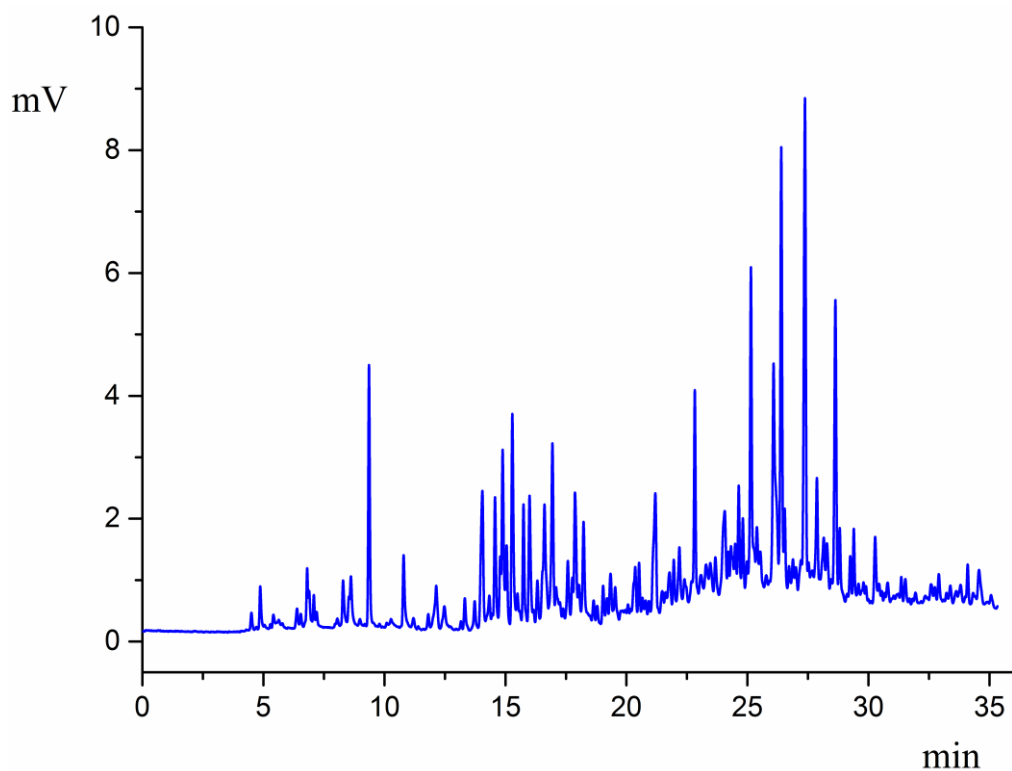
**Obr. P33** Chromatogram vzorku sypaného zeleného čaje *Tesco green Leaf Tea* původem z Číny.



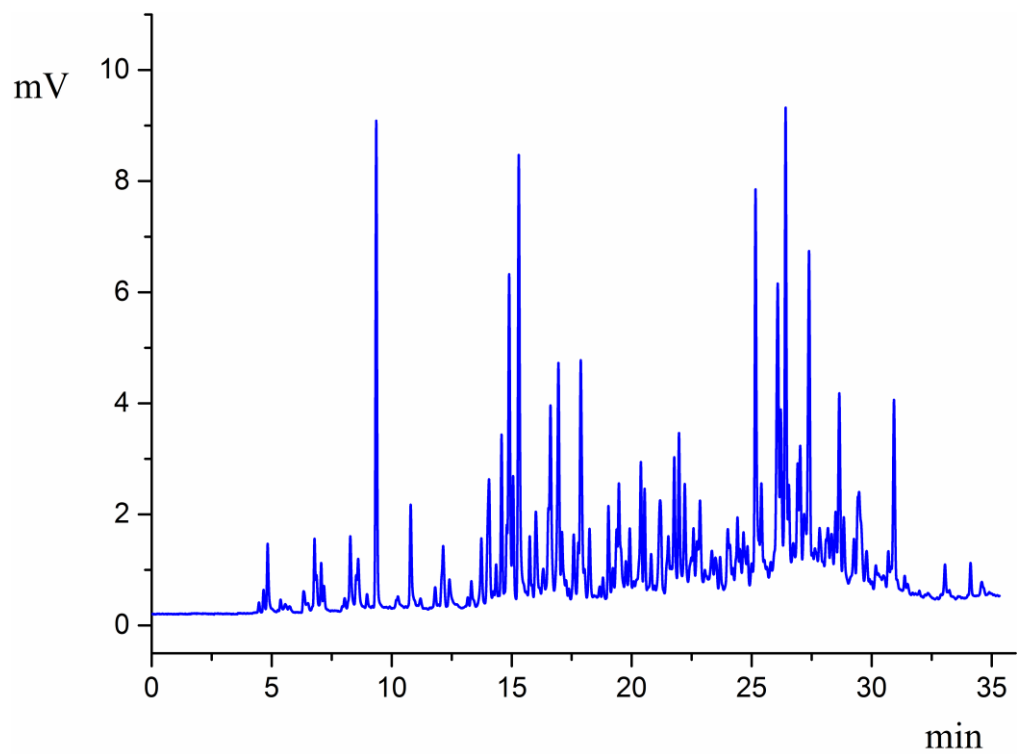
**Obr. P35** Chromatogram vzorku sypaného zeleného čaje *Chun Mee* původem z Číny.



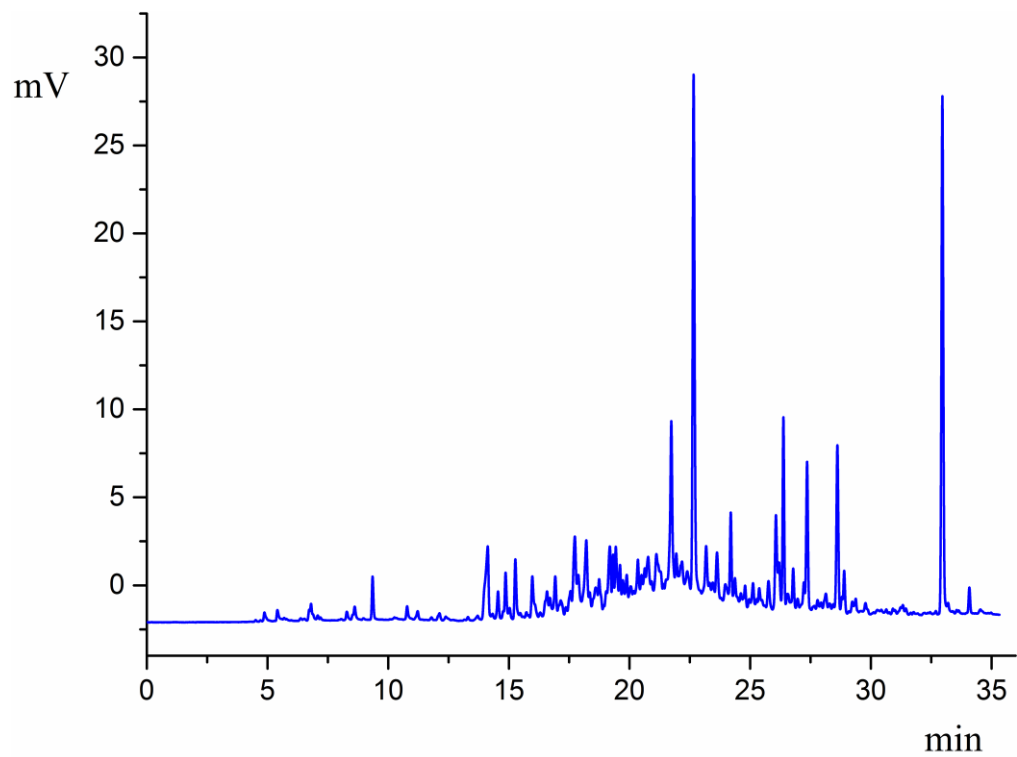
**Obr. P36** Chromatogram vzorku sypaného zeleného čaje *Bancha-Arashiyana* původem z Japonska.



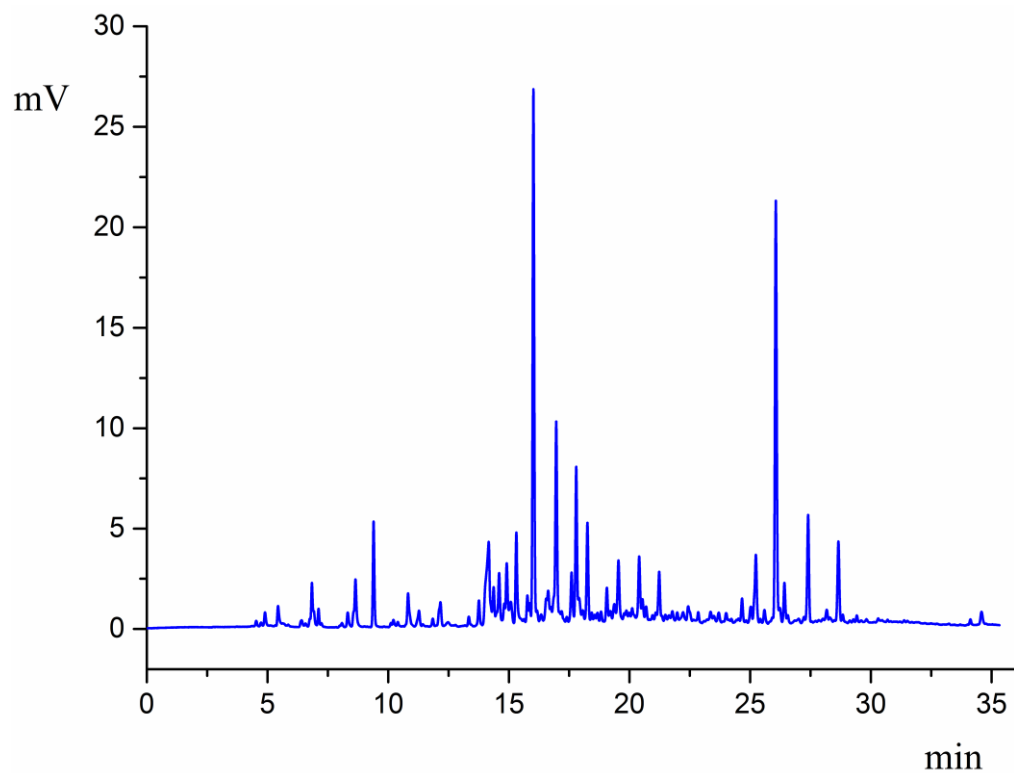
**Obr. P37** Chromatogram vzorku porcovaného zeleného čaje *Jemča Zelený Čaj* bez určené země původu.



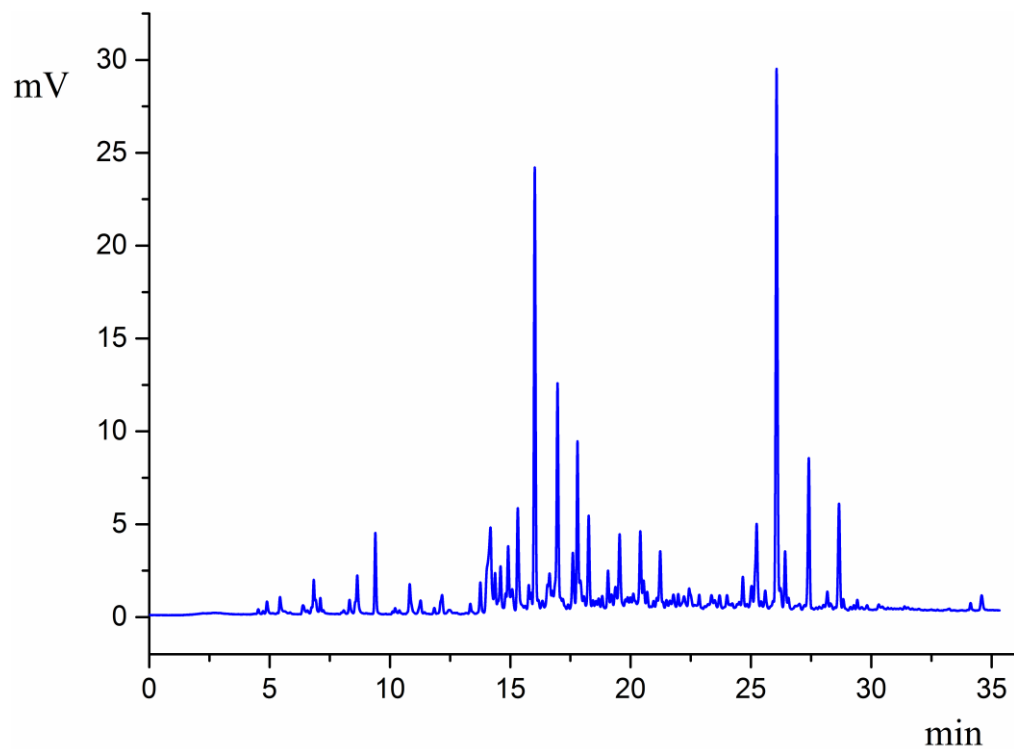
**Obr. P38** Chromatogram vzorku porcovaného zeleného čaje *Sir Winston Tea* bez určené země původu.



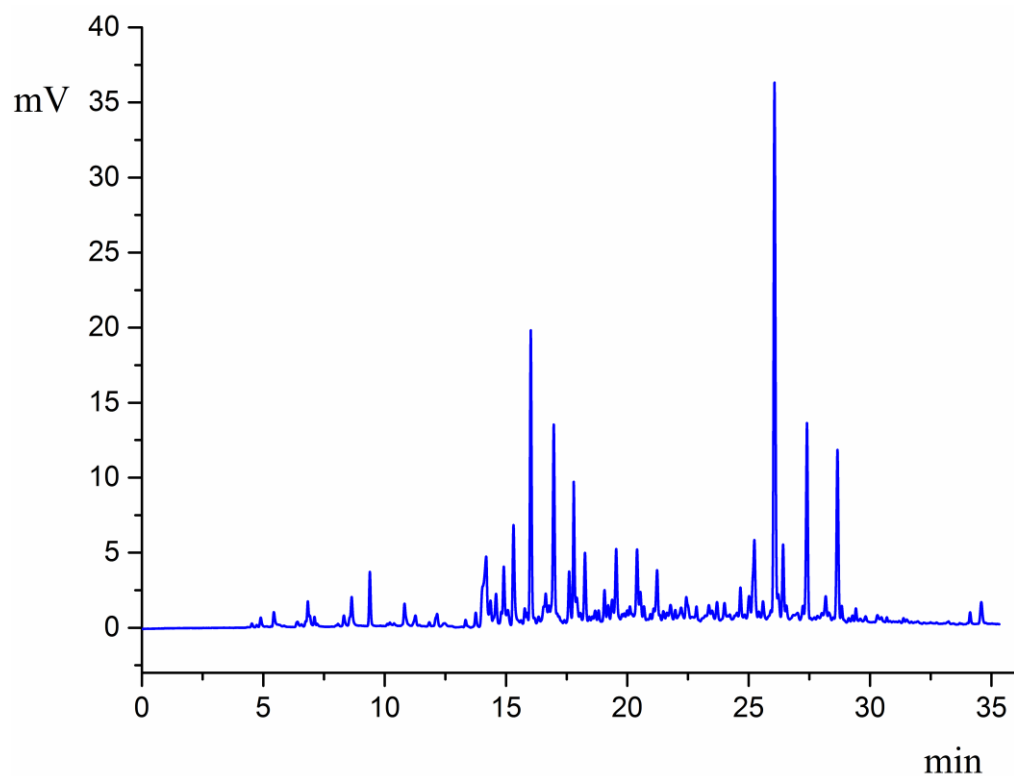
**Obr. P39** Chromatogram vzorku porcovaného zeleného čaje *Sonnenor* původem z Číny.



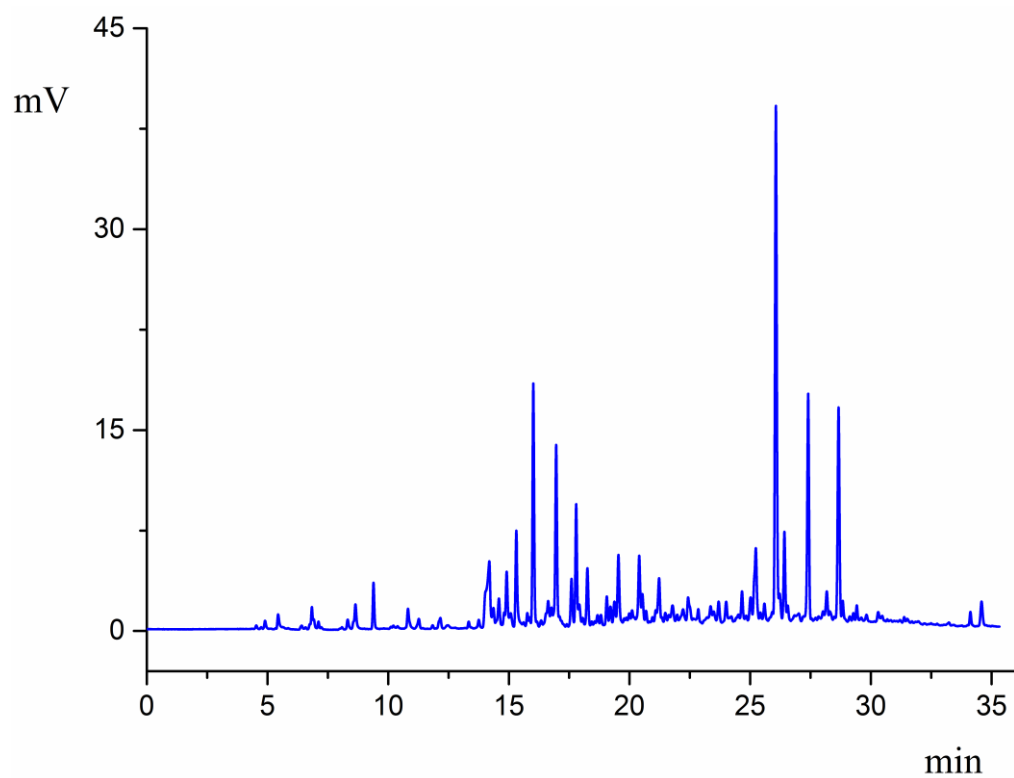
**Obr. P40** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci celkového času HS-SPME 80°C/10 min.



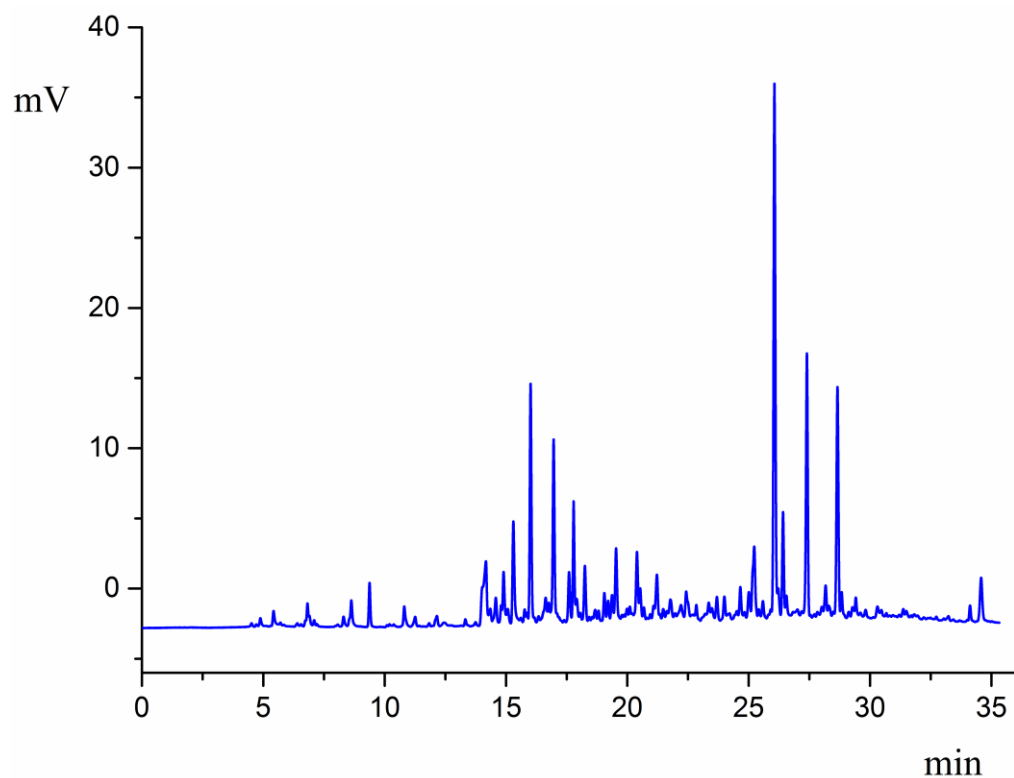
**Obr. P41** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci celkového času HS-SPME 80°C/20 min.



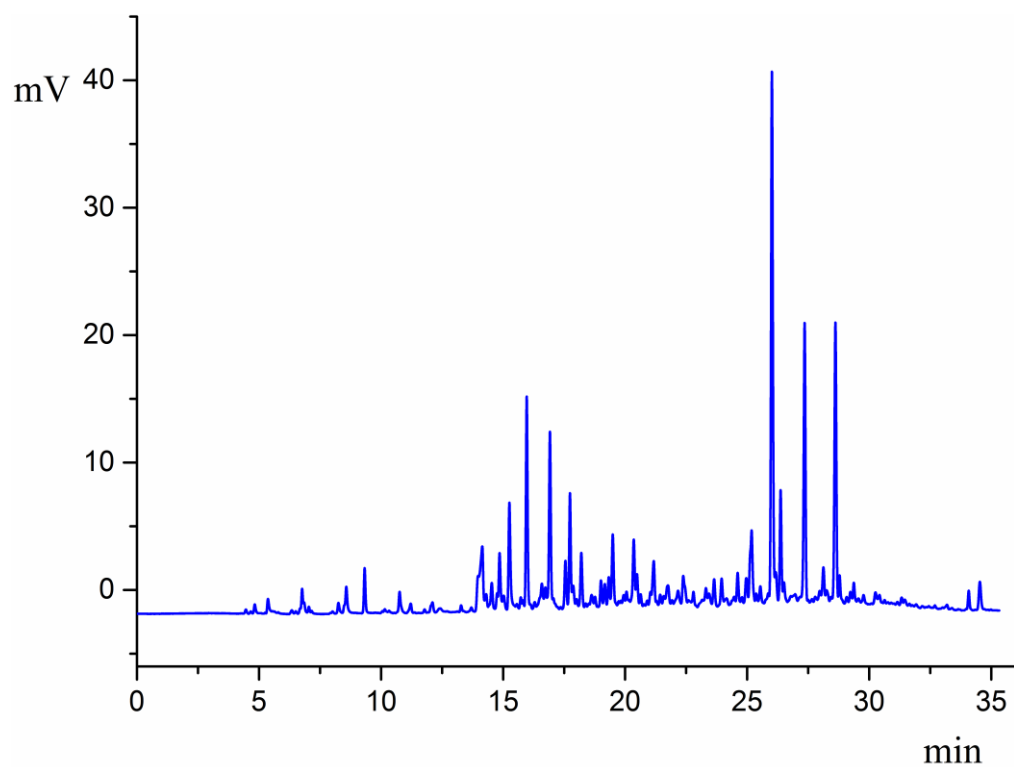
**Obr. P42** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci celkového času HS-SPME 80°C/30 min.



**Obr. P43** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci celkového času HS-SPME 80°C/40 min.



**Obr. P44** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci celkového času HS-SPME 80°C/50 min.



**Obr. P45** Chromatogram vzorku *Chun Mee* pro optimalizaci celkového času HS-SPME 80°C/60 min.