

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**PŘÍRODNÍ ANTIOXIDANTY V ČAJI**

**Bc. Markéta Štědrová**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**2011**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
**DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY**

**NATURAL ANTIOXIDANTS IN TEA**

**Bc. Markéta Štědrová**

**DIPLOMA THESIS**

**2011**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2010/2011

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta ŠTĚDROVÁ**  
Osobní číslo: **C09789**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Přírodní antioxidanty v 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. V teoretické části se zaměřte typy čajů, přírodní antioxidanty vyskytující se v čajích a na přípravu vzorku před analýzou. Dále se zaměřte na stanovení antioxidantů metodou kapalinové chromatografie.
2. V experimentální části proveďte optimalizaci podmínek separace vybraných látek a optimalizujte extrakci těchto látek z čajových listů. Metodu použijte na stanovení fenolických látek v čajích.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a porovnejte s literaturou.


Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucí práce.**

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Blanka Beňová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Tomáš Hájek**  
Katedra analytické chemie  
Datum zadání diplomové práce: **1. února 2011**  
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2011**

  
prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.  
děkan

L.S.

  
prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 1. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 13. 5. 2011

.....  
Bc. Markéta Štědrová

Mé poděkování patří Ing. Blance Beňové, Ph.D. za veškerou pomoc v průběhu této diplomové práce. Také bych ráda poděkovala Ing. Tomáši Hájkovi, Ph.D. za odborné rady, trpělivost a pomoc při laboratorním měření.

Poděkování patří také mé rodině, která mě po celou dobu studia všestranně podporovala a mým přátelům, kteří mi pomáhali zvládnout studium.

## SOUHRN

Tato diplomová práce se zabývá přírodními antioxidanty vyskytujícími se v čaji. Teoretická část je věnována čaji a fenolovým antioxidantům vyskytující se v čaji. Dále se teoretická část zaměřuje na přípravu vzorku k analýze, především extrakci přírodních antioxidantů a jejich stanovení metodou kapalinové chromatografie.

Byly nalezeny optimální podmínky chromatografické separace vybraných antioxidantů a kofeinu v čaji. Na separaci byla použita kolona s povrchově-porézní C18 stacionární fází a gradientová eluce. Dále byla optimalizována extrakce v Soxhletově extraktoru pro získání co největšího množství antioxidantů. V práci je porovnané množství antioxidantů obsažených ve vodném výluhu čaje s extrakty čaje připravenými klasickou technikou Soxhletovy extrakce. Bylo zjištěno, že z nejvíce zastoupených antioxidantů v čaji, katechinů, se do vody vyluhuje 46 % jejich celkového množství stanoveného v extraktech.

Klíčová slova: Čaj  
Fenolové antioxidanty  
Soxhletova extrakce  
HPLC

## SUMMARY

The natural antioxidants in the tea was studied in this thesis. The theoretical part is attended to tea, fenol antioxidants in tea. Further the theoretical part is focused on the preparation of the samples before analysis, mainly extraction of natural antioxidants and their determination by liquid chromatography.

The conditions of chromatography separation of selected antioxidants and caffeine was optimized. The C18 column with the core-shell particles and the gradient elution were used. Further, the extraction of antioxidants using Soxhlet's extractor was optimized with the aim obtained the most volume of antioxidants. The quantity of antioxidants included in the liquid leach of tea with extracts of tea prepared by the classic technique of Soxhlet's extraction were compared. The catechins were most represented antioxidants leached out into the water 46 % theirs total quantity established in extracts. Only 46 % of the total catechins determined in the methanol extractions were founded in the water leaches.

Keywords:            Tea  
                          Phenolic antioxidants  
                          Soxhlet extraction  
                          HPLC

## OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>12</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>13</b>
2.1. Čaj .....	13
2.1.1. Rozdělení čajů .....	14
2.1.2. Výroba čaje .....	15
2.1.3. Příprava čaje .....	16
2.1.4. Vliv čaje na lidské zdraví .....	17
2.1.5. Složení čaje .....	17
2.2. Přírodní antioxidanty v čaji .....	18
2.2.1. Fenolové antioxidanty .....	19
2.2.1.1. Fenoly .....	19
2.2.1.2. Fenolové kyseliny a jejich deriváty .....	19
2.2.1.3. Flavonoidy .....	20
2.3. Příprava vzorku čaje k analýze .....	23
2.3.1. Extrakční techniky pro izolaci fenolických látek z čajů .....	24
2.3.1.1. Extrakce rozpouštědly .....	25
2.3.1.2. Extrakce čaje v Soxhletově extraktoru .....	25
2.3.1.3. Extrakce čajů nadkritickým oxidem uhličitým .....	27
2.3.1.4. Extrakce podpořená mikrovlnami .....	28
2.4. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	28
2.4.1. Instrumentace vysokoúčinné kapalinové chromatografie .....	29
2.4.1.1. Kolony používané pro HPLC .....	30
2.4.1.2. Detektory pro HPLC .....	31
2.4.1.3. Gradientová eluce .....	32
2.4.2. Stanovení přírodních antioxidantů v čaji metodou HPLC .....	33
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>35</b>
3.1. Přístroje a zařízení .....	35
3.1.1. Aparatura pro extrakci v Soxhletově extraktoru .....	35
3.1.2. Kapalinový chromatograf .....	35
3.1.3. Ostatní zařízení .....	36
3.2. Použité chemikálie a standardy .....	37
3.2.1. Standardy .....	37

3.2.2. Chemikálie .....	37
3.3. Analyzované vzorky čajů .....	38
3.4. Podmínky separace .....	38
3.5. Pracovní postupy .....	39
3.5.1. Příprava mobilní fáze .....	39
3.5.2. Příprava kalibračních roztoků standardních látek .....	39
3.5.3. Příprava vzorků .....	40
3.5.3.1. Příprava výluhu čaje .....	40
3.5.3.2. Příprava čajových extraktů .....	40
3.5.4. Experimentální zpracování dat .....	40
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>41</b>
4.1. Optimalizace pracovních podmínek .....	41
4.1.1. Optimalizace chromatografické separace .....	41
4.1.2. Podmínky detekce látek .....	42
4.1.3. Kalibrační závislosti, mez detekce a mez stanovitelnosti .....	43
4.1.4. Optimalizace extrakce v Soxhletově extraktoru .....	44
4.1.4.1. Optimalizace doby extrakce .....	44
4.2. Analýza extraktů a výluhů čajů .....	46
4.2.1. Katechiny .....	47
4.2.1.1. Epigallokatechin .....	47
4.2.1.2. Katechin .....	48
4.2.1.3. Epikatechin .....	50
4.2.1.4. Epigallokatechin gallát .....	51
4.2.1.5. Gallokatechin gallát .....	52
4.2.1.6. Epikatechin gallát .....	54
4.2.2. Fenolové kyseliny .....	55
4.2.2.1. Kyselina gallová .....	55
4.2.2.2. Kyselina kávová .....	56
4.2.3. Alkaloidy .....	58
4.2.3.1. Kofein .....	58
4.2.4. Flavonoly .....	59
4.2.4.1. Rutin .....	59
4.2.4.2. Kvercetin .....	60
4.2.4.3. Kemferol .....	60

4.2.5. Zastoupení látek v extraktech a ve výluzích .....	61
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>62</b>
<b>6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>64</b>
<b>7. PŘÍLOHY .....</b>	<b>67</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

C	katechin
CG	katechin gallát
DAD	detektor s diodovým polem
EC	epikatechin
ECG	epikatechin gallát
EGC	epigallokatechin
EGCG	epigallokatechin gallát
GC	gallokatechin
GCG	gallokatechin gallát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
UV	ultrafialová oblast

# 1. ÚVOD

Čaj je konzumován stovky let pro svoji chuť a povzbudivé účinky. Až nedávné studie prokázaly pozitivní účinky čaje na lidské zdraví. Tyto účinky jsou velmi cenné zvláště v dnešní době, kdy vyspělá část světa trpí civilizačními chorobami, které jsou zčásti způsobeny oxidačním stresem. V čaji je obsaženo značné množství antioxidantů, které působí proti oxidačnímu stresu.

Nejvíce zastoupenou skupinou antioxidantů v čaji jsou katechiny a flavonoly. Z čajů je nejbohatší na obsah těchto látek zelený, ale i ostatní druhy čaje jako jsou černé, bílé a oolong obsahují významné množství antioxidantů. V čajovém výluhu je obsah antioxidantů velmi ovlivněn jeho přípravou. V čajových listech se ale nachází větší množství antioxidantů, než které se vyluhuje do vody. Pro srovnání, jak velké množství antioxidantů nepřejde do výluhu, byla použita klasická metoda Soxhletovy extrakce. Vzorky čaje byly extrahovány methanolem a tento extrakt byl následně analyzován stejnou metodou jako výluh čaje. Naměřená data z analýzy extraktů a výluhů byla mezi sebou porovnána.

Antioxidanty se stanovují několika metodami, z nichž je běžně využívaná vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Pro separaci je vhodné použití systému s obrácenými fázemi. Pro detekci lze použít několik detektorů, pro rutinní analýzy je vhodný UV detektor. Tato metoda je účinná a spolehlivá pro stanovení antioxidantů v čajích.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Čaj

Čaj je výrobek získaný z výhonků, listů, pupenů nebo jemných částí zdřevnatělých stonků čajovníku *Camellia sinensis* (Obr. 1)<sup>1</sup>. Celosvětově je čaj po vodě druhý nejoblíbenější nápoj a je známo asi 3 000 druhů čaje<sup>2</sup>.



Obr. 1: Čajovník čínský

Čajovník je celoročně zelený strom nebo keř, který roste v tropických nebo subtropických oblastech<sup>3</sup>. Čajovník se dělí do tří skupin, tzv. džátů:

- čínská skupina – po období vegetačního klidu poskytuje z první sklizně čaj vysoké kvality. V porovnání s asámskou skupinou je chudší na extraktivní látky. Je pěstován hlavně v Číně a Japonsku
- asámská skupina – má odlišné morfologické vlastnosti i chemické složení. Je bohatší na extraktivní látky, které jsou důležité pro kvalitu čaje. Pěstován je hlavně v Indii, na Srí Lance a v Africe.
- indočínská (kampučijská) skupina – není příliš významná. Čaje mají vysokou barvitost v šálku, nálev je drsnější s charakteristickou čajovou vůní a chutí.

Dnes se většinou pěstují kříženci uvedených skupin, z důvodu vyšších výnosů, ale čaje většinou nedosahují jakosti (hlavně vůně) původních skupin<sup>1</sup>.

### **2.1.1. Rozdělení čajů**

Čaj se na trhu označuje podle země původu, způsobu zpracování a podle jakosti. Dovezené druhy čaje se prodávají jako jednodruhové nebo se připravují čajové směsi. Největšími světovými producenty čaje jsou Indie, Čína a Cejlon. V menší míře je čaj pěstován a vyráběn v Keni, Turecku, Indonésii, Japonsku a ve Vietnamu<sup>1</sup>.

Podle způsobu zpracování rozeznáváme základní skupiny čaje:

- fermentovaný – černý čaj
- nefermentovaný – zelený a bílý čaj
- částečně fermentovaný – oolong (žlutozelený čaj)

Na trhu jsou k dostání další druhy čajů, jako ovoněný, aromatizovaný, ochucený, instantní čaj a čajový extrakt. Ovoněný čaj se připravuje z kvalitních čajů zelených, které se ovoní různými intenzivně vonícími květy např. jasmínu, citroníku, oranžovníku a pod. Aromatizované čaje jsou připraveny z černého čaje, který je aromatizovaný silicemi a extrakty koření a syntetickými aromaty. Ochucené čaje jsou směsi pravého čaje s ochucujícími částmi rostlin, jejichž obsah nepřesahuje 50 % hmotnosti směsi. Čajový extrakt se vyrábí extrakcí černého nebo zeleného čaje horkou vodou. Získaný extrakt se může před sušením nebo po sušení mísit s různými přísadami. Instantní čaj se vyrábí odstraněním vody z čajového extraktu sušením nebo lyofilizací<sup>1</sup>.

### ***Hodnocení kvality čaje***

Při posuzování jakosti čaje se hodnotí výrobní druh, čímž se myslí čaj černý, zelený, polofermentovaný, listový, zlomkový, lisovaný. Hodnotí se vlastnosti čajů v suchém stavu, to je celkový vzhled, úprava listu, stejnorodost, barva, tvar listu velikost čajinek, tj. jednotlivých kousků čaje. U listových čajů se hodnotí přítomnost prachu a stupeň zaprášení listu, přítomnost vlastních i cizích příměsí a nečistot, přítomnost škůdců, vlastnosti spařeného listu a vlastnosti připraveného nápoje, jako barva a její intenzita, sytost, průzračnost nálevu, zákal, usazeniny, vůně a chuť. Stanovují se chemické a fyzikální hodnoty, obsah vody, vodného

extraktu, popele, písku, kofeinu, a také hygienické požadavky, jako je obsah chemických kontaminantů, mykotoxinů a mikroorganismů<sup>1</sup>.

### **2.1.2. Výroba čaje**

Z čajovníku je možné vyrobit různými technologickými postupy černý, zelený, polofermentovaný<sup>3</sup> a bílý<sup>1</sup> čaj. Vyrobit z jedné rostliny odlišné nápoje umožňují enzymy přítomné v listech čajovníku. V utrženém listě, je-li na vlhkém vzduchu, dochází po několika hodinách k fermentaci, při níž se látky přítomné v listě rozkládají a zároveň vznikají nové sloučeniny. Při výrobě černého čaje je tento proces podporován, na rozdíl od čaje zeleného, kdy se fermentaci zabraňuje<sup>3</sup>.

#### **Černý čaj**

Čajové lístky se sklízí ručně nebo strojově. Ručně sklizené čaje jsou kvalitnější. Na plantážích jsou čajové listy shromažďovány v bednách a přepravovány do zpracovatelského závodu. Lístky se nesmí zapařit. V továrně se listy nechají na rámech 16 až 20 hodin ve stínu při teplotě 20-24 °C a relativní vlhkosti 75 % zavadnout. Lístky změkknou a dají se svinout buď ručně nebo na tzv. „rolleru“. V této fázi výroby dochází k rozkladu chlorofylu, začíná oxidace tříslovin a vytváří se čajové aroma. Při svinování se trhají buňky listu a uvolněná buněčná šťáva smáčí povrch listu a může dojít ke vzdušné oxidaci, která je velmi významná pro celý proces fermentace. Pro samotnou fermentaci se takto zpracované listy rozhrnou na dřevěné lístky umístěné v čistých místnostech s regulací teploty i vlhkosti. Nejúčinnější oxidace enzymů probíhá při teplotě 25 °C. Z čajových katechinů vznikají bisflavanoly, theaflaviny, thearubiginy a další oligomery<sup>4,5</sup>. Proces fermentace je ukončen sušením v sušících pecích. Usušené listy se vytřídí na sítích. Neprosáté listy se zpracují na lámaný čaj<sup>4</sup>.

#### **Zelený čaj**

Pro zachování přirozeně účinných látek obsažených v čajových listech se musí při výrobě zeleného čaje zabránit oxidaci a fermentaci. Toho se docílí vystavením čerstvě sesbíraných listů vodní páře po dobu 20 až 40 vteřin. U velmi kvalitních zelených čajů trvá napařování až 120 vteřin. Po napařování se listy suší a třídí<sup>3</sup>.

## **Oolong**

Oolong (žlutozelený čaj) je vyráběn podobně jako zelený čaj, ale navíc prodělává nedokonalou fermentaci<sup>1</sup>. Listy se sklízí v plné zralosti a ponechají se na slunci zavadnout. Následná krátká fermentace je přerušena sušením<sup>4</sup>.

## **Bílý čaj**

Bílý čaj se vyrábí z nerozvinutých ochmýřených listových pupenů. Nefermentované pupeny se suší na slunci nebo ohni<sup>1</sup>. Získaný nápoj nemá výraznou vůni a chuť a často se přidává k čajům černým<sup>4</sup>.

### **2.1.3. Příprava čaje**

Zásady pro přípravu černého a zeleného čaje jsou různé. Doporučený způsob přípravy černého i zeleného čaje spočívá především v použití kvalitní pitné vody a vhodného čaje<sup>3</sup>.

## **Černý čaj**

Černý čaj připravujeme spařením právě vroucí vodou. Převařená voda ztrácí kyslík, což negativně ovlivňuje vůni a chuť nápoje. Chladnější voda čaj nedostatečně vyluhuje. K vaření vody používáme nerezové nebo smaltované nádoby. Dávkování čaje závisí na zvyklostech. Většinou se dává ½ až 1 lžička čaje na 1 šálek. Délka spařování je různá a záleží na tom, jaký má být výsledný nápoj. Černý čaj spařujeme 3 až 5 minut. Příliš dlouhé louhování má za následek uvolnění tříslovin a nápoj má svíravou chuť<sup>4</sup>.

## **Zelený čaj**

Zelený čaj se připravuje obdobně jako černý čaj, ale při přípravě zeleného čaje je důležité, abychom nezalévali čaj vařící vodou. Vodu necháme projít varem a počkáme, až teplota vody poklesne na 60-90 °C, poté zalijeme čaj. Při zalití vroucí vodou se zničí aroma i chuť čaje. Spařené lístky zeleného čaje můžeme použít opakovaně k přípravě nápoje<sup>3,4</sup>.

#### 2.1.4. Vliv čaje na lidské zdraví

Za nejzdravější je považován zelený čaj, ale všechny druhy čaje prospívají našemu zdraví. Bylo vědecky zjištěno, že katechiny v čaji zabraňují mutaci buněk a deaktivují různé karcinogeny<sup>2</sup>. Epigallokatechin gallát izolovaný ze zeleného čaje je pravděpodobně velmi účinná protirakovinná látka. Pití především zeleného čaje snižuje hladinu cholesterolu v krvi, snižuje vysoký krevní tlak a je prevencí proti arterioskleróze. Přirozený obsah fluoru a antibakteriálních látek chrání zuby před zubním kazem<sup>3</sup>. Další pozitivní účinky jsou přisuzovány polysacharidům v čaji, především redukují hladinu cukru v krvi a zlepšují činnost imunitního systému<sup>6</sup>. Ze studií dále vyplývá, že pozitivních účinků na zdraví dosáhneme při každodenním pití alespoň 3 šálků zeleného čaje, ale je doporučováno až 7 šálků denně<sup>3</sup>.

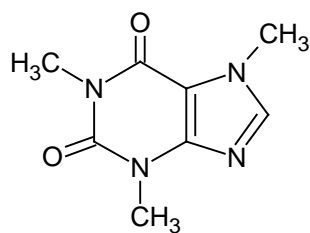
#### 2.1.5. Složení čaje

Listy čajovníku obsahují vodu, kofein, polyfenoly (nazývané také jako třísloviny a taniny)<sup>1</sup>, tuky, aminokyseliny<sup>7,8</sup>, bílkoviny, silice, sacharidy, vlákninu, pigmenty, enzymy, minerální látky, vitamíny (C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> aj.), karoteny aj. Výživový význam složek čaje je nevýznamný, z tohoto důvodu je řazen mezi pochutiny<sup>1</sup>. Množství těchto účinných látek v čajovém listě je dáno oblastí, kde se čaj pěstuje (nadmořskou výškou, klimatickým pásmem), a stářím lístku ve chvíli sběru. Nejvíce kofeinu se vykytuje v mladých lístcích a pupenech, ve straších listech je vyšší podíl tříslovin<sup>3</sup>.

#### Kofein

Kofein (Obr. 2) je nejrozšířenější purinový alkaloid a je doprovázen theobrominem a theofyllinem. Kofein je obsažen v semenech, listech a ovoci více než šedesáti druhů rostlin. Listy čajovníku *Camellia sinensis* obsahují asi 2 % kofeinu a méně než 0,2 % theobrominu v sušině. Směs alkaloidů v čaji se dříve nazývala tein.

Kofein stimuluje centrální nervový systém a působí močopudně. Vysoké dávky kofeinu ovlivňují nervový i hormonální systém. Kofein je stabilní sloučenina, která se během technologického procesu a skladování nemění. Výjimkou je výroba zeleného a především černého čaje, kdy při fermentaci vznikají dimethylxantiny a další puriny jako produkty katabolismu kofeinu<sup>5</sup>.



Obr. 2: Chemická struktura kofeinu

## Polysacharidy

Polysacharidy obsažené v čaji jsou strukturálně velmi různorodé a většina čajových polysacharidů není charakterizovaná. Některé bioaktivní účinky čaje, jako je redukce hladiny cukru v krvi a zlepšení činnosti imunitního systému, jsou přisuzovány obsaženým polysacharidům<sup>6</sup>.

## Minerální látky

Čajové listy jsou jedním z nejbohatších rostlinných zdrojů fluoru, také obsahují značné množství draslíku<sup>3</sup>. Čajové listy dále obsahují hořčík, vápník, železo, zinek, fosfor a sodík<sup>4</sup>.

## Vitamíny

Čerstvé čajové listy a zelený čaj obsahují vitamín C. V černém čaji je ho vlivem zpracování velmi málo. V čerstvých čajových listech je také vitamin B<sub>1</sub> (thiamin), B<sub>2</sub> (riboflavin), B<sub>6</sub> (pyridoxin), B<sub>9</sub> (kyselina listová) a vitamín H (biotin)<sup>3</sup>.

## 2.2. Přírodní antioxidanty v čaji

Po staletí se k prodloužení údržnosti potravin používají různé byliny a koření. Dnes je známo, že řada rostlinných potravinářských materiálů vykazuje antioxidační vlastnosti. Antioxidanty chrání potraviny i organismus před oxidací volnými radikály tím, že s nimi reagují za vzniku méně reaktivních nebo nereaktivních sloučenin. K tomu dochází jednak reakcí s volnými radikály, ale antioxidanty také vážou do komplexů katalyticky působící kovy a eliminují přítomný kyslík<sup>5,9</sup>. V potravinách dochází k oxidaci přítomných tuků a dalších, snadno se oxidujících látek<sup>5</sup>.

Volné radikály jsou látky, které mohou vyvolat nekontrolovatelnou oxidaci a tím poškozovat buňky. Tělo vytváří volné radikály při uvolňování energie jako nežádoucí vedlejší produkty metabolismu. Tvorbu radikálů stimulují i vnější podněty jako jsou stres, znečištění ovzduší, kouření a také stárnutí. S hromaděním volných radikálů v organismu stoupá riziko vzniku rakoviny a srdečních onemocnění<sup>10</sup>. Udržovat nízkou hladinu volných radikálů v organismu mají za úkol antioxidanty, které organismus produkuje sám jako enzymy superoxid dismutázu, katalázu a glutathion peroxidázu<sup>11</sup>. Antioxidanty také přijímáme v potravinách a doplňcích. Vysoký obsah antioxidantů je v hroznech, zeleném čaji, ovoci, zelenině a luštěninách<sup>10</sup>.

Podle struktury rozeznáváme antioxidanty fenolové, endioly a jiné látky. Fenolové antioxidanty a galláty se vyskytují v potravinách, koření a v čaji<sup>9</sup>.

### **2.2.1. Fenolové antioxidanty**

Fenolové antioxidanty jsou nejvíce rozšířené v rostlinné říši a tvoří základní část lidské výživy. Fenolové antioxidanty zahrnují fenoly, fenolové kyseliny a jejich deriváty a flavonoidy<sup>12-14</sup>.

#### **2.2.1.1. Fenoly**

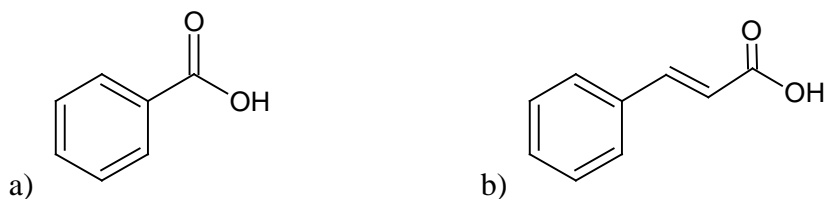
Fenoly se nacházejí prakticky ve všech potravinách. Jsou velice heterogenní skupinou sloučenin, z nichž se některé uplatňují jako chuťové a vonné látky a přírodní barviva. Některé mají výrazné biologické účinky, jsou přírodními antioxidanty nebo přirozené toxické složky potravin. V čaji bývá přítomen fenol a guajakol.

V potravinách je nejvýznamnější reakcí přirozených fenolů oxidace. U potravin rostlinného původu je významná enzymově katalyzovaná oxidace monofenolů na *o*-difenoly a jejich následná oxidace na *o*-chinony. Tyto a následné reakce se řadí do souboru reakcí enzymového hnědnutí<sup>5</sup>.

#### **2.2.1.2. Fenolové kyseliny a jejich deriváty**

Fenolové kyseliny převážně se strukturou C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (kyselina benzoová a její deriváty) a se strukturou C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (kyselina skořicová a deriváty) (Obr. 3) jsou běžnou součástí všech rostlinných materiálů. Fenolové kyseliny a jejich deriváty vykazují účinky primárních

antioxidantů. Jejich aktivita závisí na počtu hydroxylových skupin v molekule. Z fenolových kyselin vzniká činnost mikroorganismů nebo termickými procesy řada jednoduchých fenolů<sup>5</sup>.



Obr. 3: Chemická struktura a) kyseliny benzoové, b) kyseliny skořicové

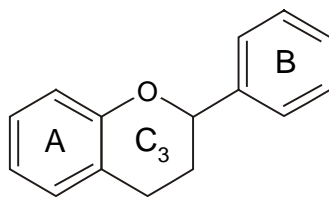
Nejběžnějšími deriváty kyseliny benzoové v potravinách jsou kyselina protokatechová a gallová. Kyselina protokatechová je účinným antioxidantem u ovoce. Kyselina gallová se jako volná kyselina v potravinách rostlinného původu vyskytuje v malém množství, je hlavně složkou hydrolyzovatelných tříslovin. Běžně se vyskytuje dimer kyseliny gallové, který se nazývá kyselina ellagová. Přítomná je řada dalších příbuzných sloučenin, které jsou jako kyselina gallová, součástí tříslovin<sup>5</sup>. Kyselina kávová je derivát kyseliny skořicové. Kyselina kávová se účastní biosyntézy komplexních fenolových sloučenin flavonoidů. Nejvíce rozšířený ester kyseliny kávové je kyselina chlorogenová<sup>15,16</sup>. Kyselina kávová a její estery se chovají jako efektivní antioxidanty v tukových systémech, např. LDL. Nové výzkumy ukazují, že kyselina kávová společně s vitaminy E a C brzdí poškozování buněk<sup>17</sup>. Z fenolových kyselin, vyskytujících se v čaji, jsou nejvíce zastoupeny kyseliny gallová, kávová a chinová<sup>18</sup>.

Fenolové sloučeniny se nacházejí jako součást potravin rostlinného původu. Vyskytují převážně ve vakuolách buněk a vykazují pestrou škálu biologických účinků. Obsah fenolových sloučenin závisí na genetických faktorech, stupni zralosti a vnějších faktorech. Jsou oceňovány zejména pro své antioxidační a antimikrobní vlastnosti. Některé fenolové sloučeniny jsou toxické. Závažná je zejména jejich fototoxicita a jejich estrogení a karcinogenní účinky. Fenolové sloučeniny vykazují široké spektrum dalších biologických účinků<sup>5</sup>.

### 2.2.1.3. Flavonoidy

Flavonoidy jsou velice rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů, jejich množství se dnes odhaduje na 5000 a stále se nacházejí nové. Ve své molekule obsahují dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkovým řetězcem (Obr. 4). Důležitý pro antioxidační aktivitu flavonoidů je počet hydroxylových skupin v molekule a jejich poloha. Podle stupně oxidace C<sub>3</sub> řetězce

a jeho substituce rozdělujeme základní struktury flavonoidů na katechiny (flavan-3-oly), leukoanthokyanidiny, flavonony, flavanonoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny<sup>5</sup>.



Obr. 4: Flavonoidový skelet

V přírodě bývají flavonoidy vázány na různé cukry (glukózu, rhamnózu) za tvorby flavonoidních glykosidů. Někdy je cukr dále acylován kyselinou benzoovou, malonovou, nebo gallovou. Galláty katechinů vytváří esterová vazba s kyselinou gallovou. V přírodě se tedy vyskytuje velké množství různě uspořádaných molekul flavonoidů<sup>19</sup>.

Flavonoidy se nacházejí v ovoci, v listech, stoncích a kořenech zeleniny<sup>18</sup>, v luštěninách, ale jedním z nejbohatších zdrojů flavonoidů je čaj. V zeleném čaji jsou hlavně katechiny a jejich galláty, které tvoří 80-90 % fenolových látek listů. Při fermentaci čajových listů jsou katechiny oxidovány oxidoreduktázami na příslušné *o*-chinony, které s dalšími katechiny tvoří pigmenty černého čaje. Oxidací katechinů se sníží jejich obsah asi o 85 %<sup>5</sup>. Tyto oxidativní změny se odrážejí v červenožlutých barvách čaje, dále ve snížení hořkosti a zvýšení svíravosti čaje a v dalších aromatických změnách. Dodatečná oxidace aminokyselin a lipidů má za výsledek vytváření četných vonných těkavých sloučenin<sup>20</sup>. Černý čaj obsahuje několik jedinečných tříd flavonoidů vyplývajících z fermentačního procesu, včetně theaflavinů, bisflavonolů, theaflavových kyselin, theaflagallinu a heterogenní skupiny flavonoidů nazývaných thearubigin<sup>20,21</sup>.

### ***Katechiny***

Katechiny jsou jedny z nejúčinnějších antioxidantů, které neutralizují volné radikály. Jsou monomerními jednotkami kondenzovaných taninů, ale postrádají vlastnosti tříslovin. Jejich struktura závisí na stereochemii výchozích jednotek katechinů, na počtu hydroxylových skupin a stereochemii vzájemné vazby jednotek tvořících oligomery a na stupni polymerace. Jsou meziprodukty biosyntézy dalších flavonoidů a vyskytují se ve všech druzích ovoce, zelenině a dalších rostlinných materiálech<sup>5</sup>. Nejbohatšími zdroji katechinů jsou zelený čaj, červené víno a jablka<sup>18</sup>. V zeleném čaji je nejvýznamnější katechin epigallokatechin gallát (EGCG). Dalšími významnými katechiny v čaji jsou epigallokatechin (EGC), epikatechin

gallát (ECG), epikatechin (EC), gallokatechin gallát (GCG), katechin (C)<sup>22,23</sup>, katechin gallát (CG) a gallokatechin (GC)<sup>23</sup>.

Během výroby černého čaje vznikají oxidací katechinů thearubiginy a theaflaviny, což jsou složité komplexy a identifikují se mnohem obtížněji než samotné katechiny<sup>18</sup>. Theaflaviny jsou dobře rozpustné dimerní flavonoidy, které mají zářivě oranžové až červené zbarvení<sup>9</sup> a udělují svíravost čajovým nápojům<sup>20</sup>. Thearubiginy tvoří velmi různorodou směs červeno-žlutých až oranžově-hnědých rozpustných až nerozpustných produktů oxidace. Kromě těchto dvou skupin pigmentů vznikají také bezbarvé bisflavonoly, červené epithiaflavinové kyseliny, žluté theacitriny a hnědé theafulviny. Na tmavé barvě černého čaje se podílejí také feofytiny vznikající z chlorofylů při fermentaci<sup>9</sup>.

Katechiny a jejich galláty mají v molekule dva chirální atomy uhlíku, proto se mohou vyskytovat ve čtyřech izomerech<sup>5</sup>.

### ***Flavonoly***

Flavonoly jsou důležitými žlutými barvivy. Kvercetin, kemferol a jejich glykosidy se nacházejí v čajových listech a významně přispívají k trpké chuti čajových nálevů<sup>5</sup>. V zelených čajových listech se také vyskytuje rutin<sup>18</sup> a myricetin<sup>23</sup>. Rutin (dříve vitamin P) má vliv na pružnost a permeabilitu krevních kapilár, v živočišných orgánech zvyšuje hladinu kyseliny askorbové tak, že ji buď chrání před oxidací nebo zvyšuje její využití v organismu<sup>9</sup>.

Kvercetin, kemferol, myricetin a jejich glykosidy jsou přítomny oproti katechinům ve velmi nízkých koncentracích, které jsou v černém, zeleném a oolong čaji srovnatelné. Flavonolové aglykony (necukerné složky sacharidů) se nacházejí v čajových lístcích, ale jsou pouze minoritní složkou čajových nápojů kvůli jejich nízké rozpustnosti ve vodě<sup>20,24</sup>.

### ***Anthokyanidiny***

Anthokyanidiny nazýváme kondenzované třísloviny nebo kondenzované taniny. Jsou to strukturně rozmanité oligomery a polymery flavonoidních látek se strukturou flavan-3-olu. Čaji udílejí adstringentní a hořkou chuť<sup>5</sup>. Jsou velmi účinnými antioxidanty, v organismu brání úbytku vitamínu C<sup>25</sup>.

## 2.3. Příprava vzorku čaje k analýze

Správně zpracovaný vzorek je základem analýzy. Při analýze potravin je příprava vzorku zásadní součástí vlastního stanovení. Potravinové matrici jsou velmi komplikovanými matricemi, jejichž komponenty mohou výrazně ovlivňovat stanovení. Proto je nutné matrici před vlastním stanovením upravit tak, aby bylo možné analyzovat určitou látku<sup>26</sup>.

Úprava vzorku je nejčastější nutností, protože i nejjednodušší vzorky jsou často nevhodné pro přímou analýzu, kvůli nízké koncentraci analyzované látky nebo neslučitelnosti s instrumentálními postupy. Z těchto důvodů je úprava vzorků největším problémem analytických metod, představuje hlavní zdroj chyby a je časově nejnáročnějším krokem<sup>27</sup>. Pevné vzorky jsou pro zpracování nejnáročnější a většina instrumentálních metod s nimi nemůže zacházet. Proto první operace v přípravě pevného vzorku je převedení analyzované látky do kapalné fáze.

Extrakce pevných vzorků rozpouštědly známá jako extrakce pevná látka – kapalina, která by se měla spíše nazývat vyluhování, protože tento pojem více odpovídá fyzikálně-chemickému základu, je jednou z nejstarších technik úpravy vzorků. Slouží nejen k odstranění a separaci sloučenin z podílu nerozpustných vysokomolekulárních látek, ale také k oddělení jiných sloučenin, které by mohly zasahovat do dalších kroků analýzy. Vyluhování je uskutečněno máčením ve vhodném rozpouštědle a je podpořeno přiměřenou teplotou a mícháním<sup>28</sup>.

Mnoho studií se zaměřilo na zkoumání vodného čajového nálevu a vlivu mnoha parametrů jako jsou:

- druh čaje – černý, zelený, velikost částic čaje,
- sáček – velikost, materiál a tvar čajového sáčku,
- příprava čaje – doba louhování, teplota vody, kvalita vody

Všechny tyto parametry mají vliv na přítomnost a množství bioaktivních sloučenin v čajovém nálevu<sup>29-35</sup>.

Obsah katechinů v čajovém nálevu je vyšší při zalití čaje vodou o teplotě 100 °C. Byl zkoumán i vliv pH na koncentraci katechinů v čaji. S přidáním 10 ml kyseliny citrónové do šálku čaje se zvýší koncentrace EGCG až o 20 %. To je patrně způsobeno tím, že se kyselina citrónová oxiduje přednostně a zároveň snížení pH podpoří přechod katechinů z čajového listu do vodní fáze<sup>36</sup>.

### 2.3.1. Extrakční techniky pro izolaci fenolických látek z čajů

Extrakce je separační metoda, při níž se jedna nebo více kapalných či pevných složek rozpouští v kapalině, která se s původní směsí nemísí, nebo se mísí omezeně<sup>37</sup>. Při extrakci dochází k přechodu složky směsi fázovým rozhraním z jedné fáze (plynné, kapalná, pevná) do druhé (kapalná, pevná)<sup>38</sup>. Přejed částice z jedné fáze do druhé způsobuje interakce molekul rozpouštědla s molekulami rozpouštěné látky. Volba vhodného rozpouštědla závisí na typu interakcí a má zásadní vliv pro extrakční dělení. Rozdělovací schopnost je dána selektivní rozpustností látek v rozpouštědlech. Po určité době kontaktu obou nemísitelných fází se ustaví distribuční rovnováha, kterou popisuje Nernstův rozdělovací zákon:

$$K_D = [A]_{\text{org}}/[A]_{\text{aq}} \quad (1)$$

$K_D$  ... rozdělovací konstanta

$[A]_{\text{org}}$  ... rovnovážná látková koncentrace látky A v organickém rozpouštědle

$[A]_{\text{aq}}$  ... rovnovážná látková koncentrace látky A ve vodě<sup>39</sup>

Rozdělovací konstanta je charakteristická pro danou látku v systému voda – organické rozpouštědlo při teplotě a tlaku. Hodnota rozdělovací konstanty pro extrahovanou látku by měla být výrazně větší než jedna<sup>38</sup>.

V extrakčních soustavách může přecházet látka:

- Z pevné fáze do kapaliny – z pevného vzorku se ve vhodném rozpouštědle rozpouští stanovované látky. Při zpracování pevných vzorků se často používá Soxhletův extraktor.
- Z kapaliny do kapaliny – v soustavě dvou nemísitelných kapalin přechází z větší části látka do rozpouštědla, ve kterém je lépe rozpustná.
- Z kapaliny nebo plynu na pevnou fázi – látka se selektivně zachytí na pevnou fázi<sup>38</sup>.

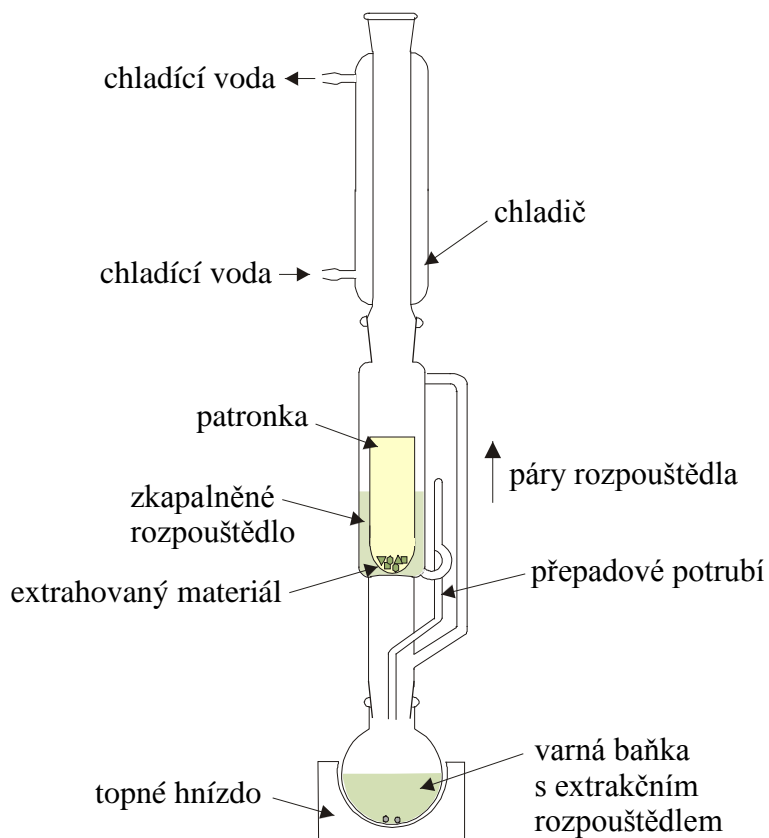
### 2.3.1.1. Extrakce rozpouštědly

Účinné složky čaje, především katechiny a kofein, jsou obvykle izolovány extrakcí buď vodnými nebo čistými organickými rozpouštědly<sup>23</sup> za optimalizovaných podmínek (druh čaje, vhodné rozpouštědlo, teplota a doba extrakce, pH a poměr rozpouštědla k materiálu). Tyto podmínky různě ovlivňují extrakční efektivitu a kvalitu extrakce<sup>40-42</sup>. Studie zabývající se extrakcí katechinů ukázala jejich tendenci k degradaci při vyšších extrakčních teplotách spolu s delší dobou extrakce. Proto je vhodné použít pro extrakci vyšší teplotu a kratší čas (95°C, 5-10 min<sup>23</sup>, 100 °C 15 min<sup>43</sup>) extrakce nebo nízkou teplotu a delší čas extrakce (60-80°C po dobu 20 min). To umožňuje získat extrakty vysoce obohacené o katechiny<sup>23</sup>. U extrakcí čaje horkou vodou se extrakty vytřepou s chloroformem, znečištěná chloroformová vrstva se odpustí a vodná vrstva se vytřepe s ethyl acetátem. Katechiny přejdou z vodného prostředí do ethyl acetátu, jsou zakoncentrovány a analyzovány<sup>43</sup>.

### 2.3.1.2. Extrakce čaje v Soxhletově ekstraktoru

Soxhletova extrakce je standardní technikou více než století a efektivita nových extrakčních metod je posuzována podle Soxhletovy extrakce<sup>44</sup>.

Soxhletův extraktor (Obr. 5) se skládá z varné baňky, Soxhletova nástavce a chladiče<sup>28</sup>. Vzorek je umístěn v patronce. Rozpouštědlo je ve varné baňce. Zahříváním baňky se rozpouštědlo odpařuje, páry rozpouštědla stoupají do chladiče, kde zkondenzují a ztékají na patronku se vzorkem umístěnou v Soxhletově nástavci. Tam se hromadí rozpouštědlo tak dlouho, než přeteče přepadovým potrubím zpět do varné baňky. Ve varné baňce se hromadí vyextrahované látky a vzorek v patronce je extrahován stále čistým rozpouštědlem<sup>45</sup>.



Obr. 5: Soxhletův extraktor

### Výhody

Výhodou Soxhletovy extrakce je, že vzorek přichází opakovaně do kontaktu s čistým rozpouštědlem, což usnadňuje posunutí rovnováhy a není nutná filtrace po extrakci<sup>46</sup>. Soxhletova extrakce je jednoduchá a poměrně levná metoda, nenáročná na obsluhu<sup>47</sup>.

### Nevýhody

Nevýhodami Soxhletovy extrakce v porovnání s jinými technikami pro úpravu pevných vzorků jsou dlouhá doba extrakce a větší množství spotřebovaného rozpouštědla. Vzorky jsou obvykle extrahované za teploty varu rozpouštědla dlouhou dobu, což může mít za následek tepelný rozklad a termolabilitu cílových látek. Soxhletovo zařízení nemá žádné míchání, které by urychlovalo proces. Navíc jsou vyextrahované látky rozpuštěné ve velkém množství rozpouštědla, takže je po extrakci potřeba nadbytek rozpouštědla oddestilovat a extrahované látky zakoncentrovat. Soxhletova technika je obtížně automatizovatelná<sup>44</sup>.

## **Optimalizace extrakce**

### ***Volba rozpouštědla***

Musí být vybráno takové rozpouštědlo, které vyextrahuje ze vzorku co největší množství analyzované látky<sup>48</sup>. Pro extrakci katechinů z čaje se používají čistá organická rozpouštědla nebo ve směsi s vodou, aby se zvýšila jejich polarita. Borse a kol. porovnávali výnos extrakce zeleného čaje za použití organických rozpouštědel ethyl acetátu, acetonu, methanolu a ethanolu. Z těchto čistých rozpouštědel měl methanol největší výnos. Zvýšením polarity rozpouštědel přidáním vody se vyextrahuje více antioxidantů než při použití čistých rozpouštědel<sup>49</sup>.

### ***Charakter matrice***

Soxhletova extrakce silně závisí na charakteristických rysech matrice jako je velikost částic, protože vnitřní difúze může být během extrakce omezena. Proto je doporučeno vzorek před extrakcí rozdrtit nebo rozemlít<sup>50</sup>.

### ***Doba extrakce***

Extrakční efektivita je velmi ovlivněna dobou extrakce. Je nutné zvolit takovou dobu extrakce, aby byl výtěžek co největší. Při delší době extrakce je výtěžek vyšší<sup>51</sup>, ale při příliš dlouhé extrakci podléhají katechiny degradaci<sup>52</sup>.

### **2.3.1.3. Extrakce čajů nadkritickým oxidem uhličitým**

Nadkritický stav látky je stav, kdy jsou teplota a tlak nad kritickým bodem. Nadkritická tekutina má charakteristické rysy jak plynů tak kapalin. Hustota je blízká kapalinám, viskozita plynům. Ve srovnání s kapalnými rozpouštědly má nadkritická tekutina několik výhod:

- hustotu nadkritické tekutiny lze ovlivnit tlakem a teplotou
- nadkritická tekutina má vyšší koeficient difúze a nižší viskozitu a povrchové napětí než kapalná rozpouštědla. Může difundovat skrz pevné látky jako plyn a zároveň rozpouští látky jako kapalina<sup>53</sup>.

Pro extrakci nadkritickým oxidem uhličitým je nutné optimalizovat podmínky extrakce: teplotu, tlak, modifikátor a velikost částic vzorku. K extrakci kofeinu a katechinů ze

zeleného čaje se k polárnímu nadkritickému oxidu uhličitému přidává modifikátor (acetaldehyd), aby se podpořila extrakce katechinů. Výnos extrakce kofeinu a katechinů se podpoří zvýšením tlaku až do 300 barů a teploty 80 °C. Extrakční výnos se také zvýší rozdrčením nebo rozemletím vzorku.

Extrakce není příliš selektivní. Při odkofeinování čaje dochází k nežádoucí extrakci katechinů, což vyžaduje zlepšení procesu extrakce, především zvýšení selektivity<sup>54</sup>.

#### **2.3.1.4. Extrakce podpořená mikrovlnami**

Mikrovlny pronikají biologickým materiálem a působí na polární molekuly – vodu. Působením mikrovln se molekuly vody rozkmitávají a celý materiál se zahřívá. Při extrakci podpořené mikrovlnami (MAE) se do celkového objemu rozpouštědla s matricí dostane rychle, efektivně a stejnoměrně velké množství energie. Ve vnitrobuněčném prostoru rostlinného vzorku se nachází voda absorbující mikrovlny, dochází zde k vnitřnímu přehřátí, buňka se poškodí a usnadní se vyplavení extrahovaných látek<sup>55</sup>.

Čajové listy se zalijí vhodným rozpouštědlem a suspenze se umístí do domácí mikrovlnné trouby. V té se zahřívá na požadovanou teplotu 85-90 °C po experimentálně stanovenou dobu 4 minuty.

MAE je účinná extrakční metoda pro izolaci kofeinu a polyfenolů z čajových lístků. V porovnání s konvenčními extrakčními metodami (Soxhlet, ultrazvuková extrakce) je MAE rychlá a jednoduchá metoda poskytující vysokou extrakční selektivitu<sup>56</sup>.

## **2.4. Vysokoučinná kapalinová chromatografie**

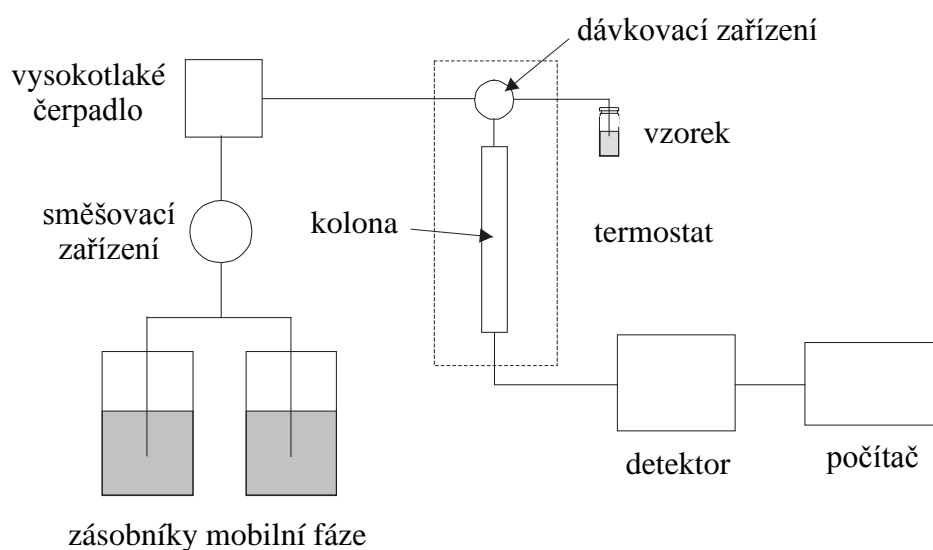
Kapalinová chromatografie je jednou z nejpoužívanějších technik pro rozdělení, identifikaci a stanovení katechinů a kofeinu v čaji<sup>57</sup>.

Chromatografie je separační technika, jejíž podstatou je distribuce složek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Při dělení dochází k opakovanému transportu molekul složek vzorku do stacionární fáze a zpět do mobilní. Pro všechny metody kapalinové chromatografie platí, že mobilní fáze je kapalina. Stacionární fáze může mít různou formu např. částičky tuhé fáze, film kapaliny na pevných částicích<sup>58</sup>.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) dosahuje vysoké účinnosti a rychlosti separace použitím náplňových kolon s velmi jemnými částicemi a velkými průtoky mobilní fáze. Aby mobilní fáze dosáhla požadovaného průtoku je potřeba vysokotlakých čerpadel a konstrukce celého přístroje musí odolávat tlaku do 60 MPa<sup>59</sup>.

### 2.4.1. Instrumentace vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Kapalinový chromatograf se skládá z částí zajišťující transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci a detekci. Schéma kapalinového chromatografu je zobrazeno na Obr. 6.



Obr. 6: Základní schéma HPLC

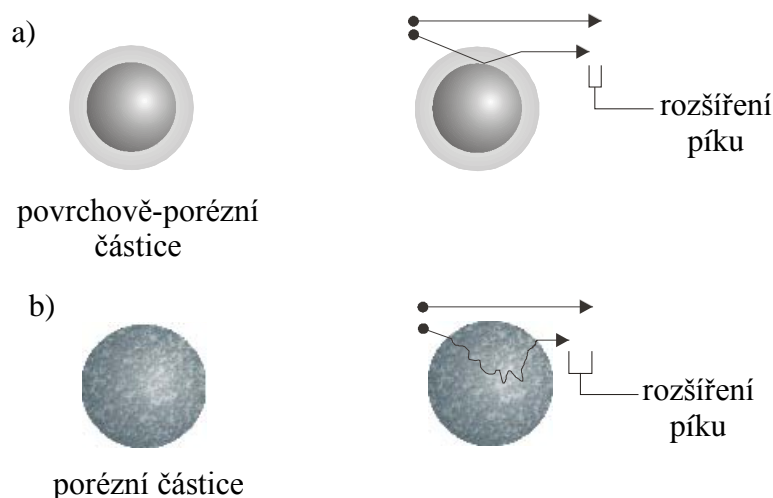
Mobilní fáze je ze zásobníku dávkována vysokotlakým čerpadlem, které je vybaveno čidlem pro měření tlaku, filtrem tuhých částic a tlumičem pulsů. Ve směšovací zařízení je mobilní fáze namíchána do požadovaného složení, často se využívá gradientu mobilní fáze (časově programované složení mobilní fáze). V dávkovacím zařízení je nadávkován vzorek, který je unášen tokem mobilní fáze do kolony, kde dojde k separaci složek vzorku. Z kolony jsou jednotlivé složky vzorku vyplaveny mobilní fází do detektoru. Signál z detektoru zpracovává počítač.

### 2.4.1.1. Kolony používané pro HPLC

Kolony pro vysoko účinnou kapalinovou chromatografii jsou rovné trubice s hladkým vnitřním povrchem, musí odolávat vysokým tlakům i chemickému působení mobilní fáze a separovaných látek. Jsou vyrobeny z kvalitní antikorozi oceli s leštěným vnitřním povrchem nebo z tlustostěnných trubic z borosilikátového skla.

Rozměry kolon závisejí jednak na účelu, ke kterému jsou použity, jednak na velikosti částic náplně. V dnešní době se používají kolony dlouhé 5 až 30 cm, o vnitřním průměru 2 až 4 mm, plněné pórovitými náplněmi s velikostí částic od 3 do 10  $\mu\text{m}$ . Typ náplně a způsob plnění kolony mají zásadní vliv na účinnost kolony. Zvýšení účinnosti kolony lze dosáhnout zmenšením částic náplně, nebo použitím povrchově-porézní náplně.

U povrchově-porézních náplní je stacionární fáze nanášena na nepropustném jádru, většinou na skleněné kuličce<sup>59</sup>. Výhodou povrchově-porézních náplní je to, že při stejné instrumentaci je tlak na koloně nižší v porovnání s plně porézními náplněmi. Díky tomu lze zvýšit průtok mobilní fáze a urychlit tak separaci. Další výhodou povrchově-porézních částic jsou užší píky, neboť molekuly nepronikají až do jádra částice<sup>60</sup> viz Obr. 7.



Obr. 7: Částičky stacionární fáze a) povrchově-porézní částice, b) porézní částice a průchod molekuly částicemi

Podle polarit náplně kolony probíhá chromatografická separace ve dvou systémech, buď v systému normálními nebo obrácenými fázemi. V systému s normálními fázemi je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní. Sorpce látek roste s rostoucí polaritou stacionární fáze a s klesající polaritou mobilní fáze. Tento systém je vhodný pro separaci isomerů, není vhodný k separaci látek lišících se velikostí uhlovodíkového zbytku<sup>61</sup>.

System s obrácenými fázemi je využíván více než systém s normálními fázemi<sup>59</sup>. Stacionární fáze je nepolární, většinou chemicky vázané uhlovodíkové řetězce (C18, C8) na silikagelu. Mobilní fáze je polárnější než stacionární fáze, většinou vodná rozpouštědla nebo polární rozpouštědla (nižší alkoholy, acetonitril). Látky se eluují v pořadí klesajících polarit nebo rostoucích molekulových hmotností<sup>61</sup>.

#### **2.4.1.2. Detektory pro HPLC**

Ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení látek procházejících kolonou je zapotřebí detektoru. Detektory zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze s eluovanou složkou. Mobilní fáze se může skládat z několika složek a zóna eluující z kolony může být směsí několika nerozdělených látek. Detektor zaznamenává celkovou změnu vlastností eluátu.

Pro kapalinovou chromatografii je významné rozdělení detektorů na univerzální a selektivní. Univerzální detektory poskytují signál pro všechny látky. Selektivní detektory reagují na určitou vlastnost látek např. na fluorescenci<sup>59</sup>.

Požadavky kladené na detektory jsou velmi náročné. Detektor by měl být univerzální s okamžitou lineární odezvou v širokém koncentračním rozmezí, vysoce citlivý s nízkou úrovní šumu, měl by mít minimální příspěvek k rozšiřování elučních zón a neměl by být citlivý na změny tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty, měl by umožňovat gradientovou eluci. Takový ideální detektor v praxi neexistuje. Nejčastěji používané detektory se k těmto požadavkům víceméně přibližují<sup>62</sup>.

Nejrozšířenějšími detektory v kapalinové chromatografii jsou spektrofotometrické, které jsou použity až v 80 % aplikací. Dále se používají fluorescenční, refraktometrické, elektrochemické, vodivostní<sup>59</sup>. K určení struktury látek lze použít hmotnostní detektor<sup>63</sup>.

#### ***Spektrofotometrické detektory***

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm<sup>62</sup>. Stanovované látky musí absorbovat záření zvolené vlnové délky<sup>59</sup>. Starší detektory měřily při jedné fixní vlnové délce, dnes jsou používány detektory s měnitelnou vlnovou délkou (vlnové délky musí být předem zadány), programovanou vlnovou délkou (vlnová délka lze nastavovat v určitém rozmezí i během

analýzy) a nejvýhodnější je použití detektorů snímající celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace, z nichž je nejpoužívanější detektor s diodovým polem<sup>62</sup>.

### ***Detektor s diodovým polem***

Detektory s diodovým polem pracují s více než 200 plošných fotodiod umístěných na destičce o délce 1 cm. Záření z deuteriové výbojky prochází měrnou průtokovou celou a spektrálně se rozkládá holografickou mřížkou. Zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru dopadá na každou fotodiodu. Každá fotodioda je spojená s kondenzátorem, který je předem nabitý na určitou hodnotu. Dopad záření na fotodiodu vybijí kondenzátor úměrně velikosti intenzity dopadajícího zářivého toku. V zápětí se kondenzátor dobije a měří se proud spotřebovaný na dobití kondenzátoru pro každou fotodiodu. K ozáření a dobíjení kondenzátorů dochází velmi rychle, proto jsou v každém okamžiku k dispozici absorbance při každé vlnové délce registrované fotodiodami. Tyto detektory umožňují detekci při několika vlnových délkách a zároveň lze dosáhnout zvýšení citlivosti detekce sčítáním signálu při různých vlnových délkách<sup>59</sup>. Výhodou těchto detektorů je, že pro libovolný pík lze zrekonstruovat spektrum, pro libovolnou vlnovou délku lze zrekonstruovat chromatogram, lze porovnávat spektra látek se spektry standardů a lze kontrolovat čistotu píků<sup>61</sup>.

### **2.4.1.3. Gradientová eluce**

Při izokratické eluci se složení mobilní fáze v průběhu analýzy nemění. To je výhodné pro látky, jejichž retence se liší velmi málo. U komplexnějších vzorků je při konstantním složení mobilní fáze horší separace málo zadržovaných látek a silně zadržované látky se neeluují vůbec. K urychlení a zlepšení separace složitých směsí s velkými rozdíly retence složek se používá gradientová eluce.

Při gradientové eluci se s časem mění složení mobilní fáze. Zvyšuje se koncentrace jedné nebo více složek mobilní fáze. S vyšší eluční silou retence látek na koloně postupně klesá, separace se urychlí<sup>61</sup>.

## 2.4.2. Stanovení přírodních antioxidantů v čaji metodou HPLC

HPLC je pro stanovení antioxidantů v čaji velmi často používanou metodou. Běžně se HPLC využívá ve spojení s UV detekcí. Pro dosažení citlivější detekce než je UV jsou používané detektory elektrochemické, fluorescenční, chemiluminiscenční a hmotnostní<sup>57</sup>.

Pro stanovení katechinů a alkaloidů byla vyzkoušena i izokratická eluce<sup>64</sup>, ale nejběžnější a výhodnější je použití gradientové eluce, která separaci urychlí<sup>65-67</sup>. Také kontrola teploty separace je důležitá pro adekvátní rozlišení v krátkém čase analýzy, protože při vyšší teplotě je doba separace kratší. Pro rozdělení katechinů se nejvíce používají systémy s obrácenými fázemi, stacionární fází je oktadecyl chemicky vázaný na silikagelu (C18) a mobilní fází je často okyselená voda a acetonitril nebo methanol<sup>57</sup>.

Fernández a kol. stanovili EGC, C, kofein, EC, EGCG a ECG technikou HPLC s UV detekcí při 275 nm. Použili kolonu C18, 250x4,6 mm s velikostí částic 5 $\mu$ m. Mobilní fáze byla voda s acetonitrilem upravená kyselinou mravenčí. Separace byla provedena s použitím gradientové eluce. Podle Fernández a kol. je metoda vhodná pro stanovení EGC, C, kofeinu, EC, EGCG a ECG v černých, zelených a instantních čajích. Ze studie vyplývá, že v zelených čajích je z katechinů nejvíce zastoupen EGCG a EGC. V černých čajích má z katechinů nejvyšší koncentraci EGC, ale ta je nižší než v zelených čajích. V instantních čajích je více kofeinu než v čajích sáčkových a sypaných<sup>22</sup>.

Sharma a kol. stanovili kyselinu gallovou, theobromin, theofylin, EGC, C, kofein, EC, EGCG a ECG v zelených čajích. Ke stanovení těchto látek použili techniku HPLC s DAD, s kolonou C18 250x4 mm s velikostí částic 5 $\mu$ m. Jako mobilní fázi A zvolili vodu s 0,1 % kyseliny fosforečné a mobilní fázi B acetonitril, gradientová eluce s průtokem mobilní fáze 1 ml.min<sup>-1</sup>. Zjistili, že v zeleném čaji se v nejvyšší koncentraci nachází EGCG, dále kofein a EGC. V některých zelených čajích stanovili theobromin a theofilin<sup>68</sup>.

Hompesch a kol. stanovili technikou HPLC s UV detekcí při 280 nm C, EGCG, EC a ECG. Separaci provedli na koloně c18 150x4,6 mm s velikostí částic 5 $\mu$ m. Mobilní fáze A byla voda s 2 % kyseliny octové a 8 % methanolu. Mobilní fáze B byla methanol s 10 % vody a 2 % kyseliny octové. Na separaci byla použita gradientová eluce s průtokem mobilní fáze 1 ml.min<sup>-1</sup>. Hompesch a kol. použili zvolenou metodu jako standardní techniku pro srovnání s jinou zkoušenou metodou stanovení katechinů v čaji<sup>69</sup>.

Sano a kol. stanovili GC, EGC, C, EC, EGCG, GCG, ECG, CG s využitím techniky HPLC s elektrochemickým detektorem. Podmínky detekce byly 600 mV proti Ag/AgCl. Byla

použita kolona C18 250x4,6 mm, mobilní fáze A 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> s 0,1 mM EDTA, mobilní fáze B byla acetonitril, separace byla provedena s použitím gradientové eluce. Ze studie vyplývá, že v zelených čajích je nejvíce zastoupen EGCG, dále EGC a ECG. V oolong čajích je koncentrace EGCG i dvakrát nižší než v zelených čajích. Navrhovaná HPLC metoda s elektrochemickou detekcí by mohla být vhodná ke studiu epimerace nebo metabolické přeměny čajových katechinů<sup>70</sup>.

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1. Přístroje a zařízení

#### 3.1.1. Aparatura pro extrakci v Soxhletově extraktoru

Pro extrakci antioxidantů z čaje byl použit Soxhletův extrakční nástavec o objemu 70 ml. Do nástavce byla umístěna celulózová patronka se vzorkem čaje. Extrakční aparatura byla sestavena umístěním Soxhletova extrakčního nástavce na destilační baňku v topném hnízdě a na nástavec byl nasazen chladič (Obr. 8).



*Obr. 8: Aparatura pro Soxhletovu extrakci*

#### 3.1.2. Kapalinový chromatograf

Pro stanovení fenolických látek v čajových extraktech byl použit kapalinový chromatograf firmy Hewlett-Packard, typ HP 1090M, vybavený UV detektorem s diodovým polem (diod array detector), termostatem a autosamplerem (Obr. 9).

Na separaci látek v extraktech byla použita kolona Ascentis Express C18,  $\mu$ m (150  $\times$  3 mm) (Sigma-Aldrich, ČR).



*Obr. 9: Kapalinový chromatograf HP 1090 s DAD*

### **3.1.3. Ostatní zařízení**

Digitální pH metr Schott, model CG 842 (Schott Glas, Mainz, Německo)

Laboratorní analytické váhy HR-120 (Helago, ČR)

Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex, typ TK 52 (Bandelin Electronic GmbH, Německo)

Mikropipeta Biohit Proline<sup>®</sup>, objem 100-1000  $\mu\text{l}$  (Biohit, Finsko)

Topné hnízdo THS 500 (Drutěva, Brno, ČR)

Filtry mobilní fáze 0,45  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

Celulózová patronka (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Křemenná vata (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Filtr stříkačkový PTFE 0,45  $\mu\text{m}$  (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

## 3.2. Použité chemikálie a standardy

### 3.2.1. Standardy

Pro stanovení kofeinu a vybraných antioxidantů v čajovém extraktu a výluhu byly použity standardy uvedené v Tab. 1. Všechny standardy byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, ČR.

Tab. 1: Standardy látek

Číslo	Název	Mr (g.mol <sup>-1</sup> )
1	Kyselina gallová	170,12
2	Kyselina protokatechová	154,12
3	(-)-Epigallokatechin (EGC)	306,26
4	(+)-Katechin (C)	290,26
5	Eskuletin	178,15
6	Kyselina kávová	180,16
7	Kofein	194,19
8	Kyselina syringová	198,17
9	Epikatechin (EC)	290,28
10	(-)-Epigallokatechin gallát (EGCG)	458,37
11	Umbelliferon	162,15
12	(-)- Gallokatechin gallát (GCG)	458,37
13	Scopoletin	192,17
14	Kyselina ferulová	194,18
15	(-)-Epikatechin gallát (ECG)	442,37
16	Rutin	610,52
17	Kvercetin	338,27
18	Kemferol	286,24

### 3.2.2. Chemikálie

Methanol (Penta, Praha, ČR)

Acetonitril CHROMASOLV (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

Redestilovaná voda upravená zařízením pro úpravu vody SG Ultra Clear UV (SG, Hamburg, Německo)

Kyselina fosforečná, čistota > 85 % (Chemapol, ČR)

Kyselina mravenčí, 98-100 % (Merck KgaA, Německo)

Octan amonný, čistota > 99,995 % (Fluka, Švýcarsko)

### 3.3. Analyzované vzorky čajů

Vybrané čaje pro stanovení sledovaných antioxidantů jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Analyzované vzorky čajů

Číslo čaje	Název čaje	Druh čaje
1	Himalayan	zelený čaj, sypaný
2	New Top Mist	zelený čaj, sypaný
3	Turecký	zelený čaj, sypaný
4	Pai Mu Tan	bílý čaj, sypaný
5	Lipton Yellow Label Tea	černý odkofeinovaný čaj, sáčekový
6	Twinings Earl Grey Tea	černý odkofeinovaný čaj, sáčekový
7	Jemča	zelený čaj, sáčekový
8	Pickwick	zelený čaj, sáčekový
9	Ceylon Tea	černý čaj, sypaný
10	Nepal GFOP Kanyam	oolong, sypaný
11	Nepal Himalayan Shangrilla	oolong, sypaný
12	E´ Mei Ruizi	zelený čaj, sypaný
13	Kanchaam Valley	zelený čaj, sypaný
14	Shree Antu Nepál	zelený čaj, sypaný
15	Loyd Tea	zelený čaj, sáčekový

### 3.4. Podmínky separace

Mobilní fáze A: Redestilovaná voda s 0,05 % kyseliny fosforečné

Mobilní fáze B: Acetonitril

Gradient mobilní fáze: uveden v Tab. 3.

Chromatografická kolona: Ascentis Express C18, 2,7  $\mu\text{m}$  (150  $\times$  3 mm)

Průtok mobilní fáze: 0,4 ml.min<sup>-1</sup>

Teplota kolony: 40 °C

Dávkovaný objem: 5  $\mu\text{l}$

Vlnové délky snímaných spekter: 210, 280 a 306 nm

Tab. 3: Gradient mobilní fáze

<b>Čas [min]</b>	0	12	20	30	40	50	55
<b>Obsah MF – B [%]</b>	2,5	6	6	10	14	45	50

## 3.5. Pracovní postupy

### 3.5.1. Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze A byla připravována čerstvá z redestilované vody a s přidavkem 0,05 % kyseliny fosforečné, pH mobilní fáze A bylo 2,3. Připravená mobilní fáze byla přefiltrována přes membránový filtr o velikosti porů 0,45  $\mu\text{m}$ . Mobilní fáze B byl čistý acetonitril. Rozpuštěný vzduch byl z mobilních fází odstraněn pomocí ultrazvukové lázně.

### 3.5.2. Příprava kalibračních roztoků standardních látek

Ze standardních látek byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 1  $\text{g.l}^{-1}$ . Zásobní roztoky kyselin byly připraveny rozpuštěním v 50% methanolu, ostatní standardy byly rozpuštěny ve 100% methanolu. Zásobní roztoky byly uchovány v chladničce.

Ředěním zásobních roztoků mobilní fází A byla připravena kalibrační řada s rozsahem přes 3 řády a pro kofein, EGC, EGCG a ECG s rozsahem přes 4 řády. Pro všechny látky byly zvoleny koncentrace 0,5, 1, 5, 10, 25 a 50  $\text{mg.l}^{-1}$ . Pro kofein, EGCG byly navíc připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 100, 200 a 400  $\text{mg.l}^{-1}$ . Pro ECG a EGC byly připraveny roztoky o koncentraci 100 a 200  $\text{mg.l}^{-1}$ . Před vlastním měřením byly kalibrační roztoky zfiltrány přes membránový filtr (PTFE 0,45  $\mu\text{m}$ ).

Z naměřených dat byly sestaveny kalibrační křivky jako závislost plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační křivky standardních látek jsou uvedeny v Příloze 1, chromatogram kalibrační křivky je uveden v Příloze 2.

### **3.5.3. Příprava vzorků**

#### **3.5.3.1. Příprava výluhu čaje**

Do kádinky byl navážen 1 g čaje s přesností na 0,0001 g, který nebyl nijak mechanicky upravován. Čaj byl zalit 200 ml 100 °C vody a byl louhován 3 minuty. Po této době byla vodní část odebrána k analýze. Před analýzou byl výluh ochlazen, zfiltrován přes membránový filtr (PTFE 0,45 μm) a analyzován.

#### **3.5.3.2. Příprava čajových extraktů**

Vzorky sypaných čajů byly nejprve rozdrobeny ve třecí misce. Do celulózové patronky byl navážen 1 g vzorku čaje s přesností na 0,0001 g. Patronka byla utěsněna křemennou vatou a byla umístěna do nástavce Soxhletova extraktoru. Tento nástavec byl umístěn na destilační baňku s varnými kamínky posazenou v topném hnízdě. Do nástavce byl nalit methanol v 2,5 násobném množství objemu nástavce (asi 175 ml). Na nástavec byl umístěn chladič a zahříváním byla zahájena extrakce. Po uplynutí 2 hodin byla extrakce ukončena. Extrakt ve varné baňce byl zakoncentrován asi na 25 ml, kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byl extrakt doplněn po rysku methanolem. Takto připravený extrakt byl uskladněn v chladničce. Před analýzou byl zfiltrován přes membránový filtr (PTFE 0,45 μm) a zředěn mobilní fází A v poměru 1 : 2.

### **3.5.4. Experimentální zpracování dat**

Všechna data byla získána s pomocí počítače s programem ChemStation. Text diplomové práce byl napsán v textovém editoru Microsoft Word 2000, grafy byly vypracovány v tabulkovém editoru Microsoft Excel 2000. Chemické vzorce byly vytvořeny s pomocí programu ChemSketch, verze 10.00. Některé obrázky byly vytvořeny v programu CorelDRAW 8.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1. Optimalizace pracovních podmínek

#### 4.1.1. Optimalizace chromatografické separace

Na separaci sledovaných látek byl použit chromatografický systém s obrácenými fázemi. Pro stanovení fenolových látek v extraktech a vyluzích z čaje byly podmínky separace optimalizovány proměřením standardů za různých podmínek.

Na separaci látek byla zvolena kolona Ascentis Express C18, 2,  $\mu\text{m}$  (150  $\times$  3 mm). Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml.min<sup>-1</sup>, teplota kolony byla 40 °C. Mobilní fázi A tvořil vodný roztok pufru a mobilní fáze B byl acetonitril (ACN). Byly vyzkoušeny různé typy pufrů. Nejprve byl zkoušen 5 mM octan amonný upravený kyselinou mravenčí na pH = 3,2. Byly testovány různé gradienty, nicméně nebylo dosaženo dostatečného rozdělení eskuletinu a kofeinu, EC a EGCG, skopoletinu a umbelliferonu. Z tohoto důvodu byla vyzkoušena jiná mobilní fáze A.

Pro separaci na této koloně byla dále použita redestilovaná voda s 0,1 % kyseliny fosforečné o pH = 2,1. Bylo testováno několik gradientů. Problémem bylo dostatečně oddělit píky kyseliny kávové a kofeinu a píky EC a EGCG. Zkoušené gradienty měly na oddělení těchto píků nepatrný vliv. Proto byly vyzkoušeny mobilní fáze A s nižším procentem kyseliny fosforečné. Snížením koncentrace kyseliny fosforečné na 0,05 % o pH = 2,3 mělo za následek jen malé zlepšení separace píků kyseliny kávové a kofeinu. Další snížení koncentrace kyseliny fosforečné na 0,025 % o pH = 2,5 nemělo vliv na oddělení píků kyseliny kávové a kofeinu. Pouze se zvýšil retenční čas látek, které se eluovaly ke konci separace.

Další gradienty byly zkoušené s mobilní fází A, kterou byla zvolena voda s 0,05 % kyseliny fosforečné o pH = 2,3. Pro lepší rozdělení píků kyseliny kávové a kofeinu byl zvolen gradient s izokratickým krokem mezi 12 a 20 minutou a byl ještě snížen podíl ACN na počátku separace. Tím se píky kyseliny kávové a kofeinu rozdělily lépe, ale ne zcela dostatečně. Zařazení izokratického kroku mělo pomoci i k rozdělení píků EC a EGCG, zlepšení bylo nepatrné. Prodloužení izokratického kroku nevedlo k lepšímu oddělení píků kyseliny kávové a kofeinu, celá analýza se prodloužila. Snížením podílu ACN v izokratickém

roku došlo k oddělení píků kyseliny kávové a kofeinu a píky EC a ECGC se rozdělily zatím nejlépe.

Pro ověření dělení látek v extraktech čajů byl při tomto gradientu proměřen methanolvý extrakt zeleného čaje. V extraktu se nedělily píky EC a EGCG a navíc píky ECG a rutinu od jiných vyextrahovaných látek. Další úpravy gradientu směřovaly k lepšímu oddělení píků EC a EGCG od sebe, a také píků ECG a rutinu od ostatních vyextrahovaných látek. Nejlépe se osvědčil gradient uvedený v Tab. 4.

Tab. 4: Gradient mobilní fáze

<b>Čas [min]</b>	0	12	20	30	40	50	55
<b>Obsah ACN [%]</b>	2,5	6	6	10	14	45	50

Gradient uvedený v Tab. 4 byl použit pro následné analýzy sledovaných fenolových látek v extraktech a vyluzích z čajů. Při tomto gradientu byly naměřeny kalibrační řady standardů. Retenční časy standardů v tomto gradientu jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Retenční časy standardních látek

<b>Látka</b>	<b>Retenční čas [min]</b>	<b>Látka</b>	<b>Retenční čas [min]</b>
Kyselina gallová	3,17	EGCG	25,41
Kyselina protokatechová	6,07	Umbelliferon	26,84
EGC	12,90	GCG	30,31
Katechin	13,82	Skopoletin	31,42
Eskuletin	14,63	Kyselina ferulová	32,17
Kyselina kávová	15,11	ECG	38,89
Kofein	16,48	Rutin	41,37
Kyselina syringová	18,68	Kvercetin	47,89
EC	24,80	Kemferol	49,70

#### 4.1.2. Podmínky detekce látek

Pro detekci látek byl použit UV detektor s diodovým polem. Snímané vlnové délky byly 210, 280 a 306 nm. Na základě absorpčních spekter sledovaných látek byla zvolena vlnová délka 280 nm. Všechny standardy až na EGC dostatečně absorbovaly při 280 nm, pro EGC byla zvolena vlnová délka 210 nm.

Fenolické látky ve vzorcích byly identifikovány podle retenčních časů a spekter látek. Pro potvrzení přítomnosti látek ve vzorcích byla použita metoda standardního přídávku. Retenční časy standardních látek jsou uvedeny v Tab. 7.

#### **4.1.3. Kalibrační závislosti, mez detekce a mez stanovitelnosti**

Pro kvantitativní analýzu hledaných látek byly sestaveny kalibrační křivky jako závislost plochy píku na koncentraci látky. Kalibrační roztoky byly připraveny ze zásobních roztoků standardních látek postupných ředěním mobilní fázi A. Pro každou látku byla připravena šesti bodová kalibrace. Pro kofein, EGCG, EGC a ECG byly připraveny další koncentrovanější kalibrační roztoky, z důvodu vyššího obsahu těchto látek ve vzorcích. Rozsah linearit kalibračních závislostí byl přes 3 až 4 řády. Korelační koeficienty kalibračních závislostí byly větší než 0,998. Kalibrační křivky standardů jsou uvedeny v Příloze 1.

Mez detekce (Limit of detection – LOD) je nejmenší analytický signál, který lze odlišit od šumu nebo jiných rušivých elementů. Mez detekce se vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie v okolí píku.

Mez stanovitelnosti (Limit of quantification – LOQ) je nejmenší analytický výsledek, jehož přesnost a správnost dostačují ke kvantitativnímu odhadu skutečné hodnoty. Mez stanovitelnosti se vyjadřuje jako desetinásobek šumu základní linie v okolí píku.

Pro určení LOD a LOQ byly odečteny výšky píků standardních látek, ze kterých byly sestaveny kalibrační křivky. Pro určení LOD byla do rovnice kalibrace dosazena trojnásobná hodnota šumu odečteného v okolí příslušného píku. Hodnota LOQ byla určena dosazením desetinásobku hodnoty šumu odečteného v okolí píku. Vypočtené hodnoty LOD, LOQ a rovnice kalibrace jsou uvedeny v Tab. 6.

Nejnižší mez detekce a mez stanovitelnosti separační metody byla zjištěna pro kyselinu syringovou, kofein, kyselinu gallovou, kávovou a protokatechovou, a to řádově v desítkách  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . Nejvyšší mez detekce a mez stanovitelnosti měla metoda pro kvercetin, EGCG, GCG a EC. Koncentrace těchto látek byly řádově stovky  $\mu\text{g.l}^{-1}$ .

Tab. 6: Meze detekce a meze stanovitelnosti

Č.	Látka	LOD [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	Rovnice kalibrace	R <sup>2</sup>
1	Kyselina gallová	45,0	149,9	$y = 3,7781x + 0,2801$	0,9999
2	Kyselina protokatechová	78,6	262,0	$y = 1,6467x + 0,1406$	0,9997
3	EGC	91,3	304,0	$y = 12,697x - 0,5592$	0,9999
4	Katechin	108,2	361,0	$y = 0,5666x + 0,0887$	0,9999
5	Eskuletin	107,4	357,9	$y = 1,0486x + 0,0374$	0,9999
6	Kyselina kávová	75,1	250,3	$y = 2,2534x - 0,0192$	0,9999
7	Kofein	39,0	129,9	$y = 1,8042x + 0,0797$	0,9999
8	Kyselina syringová	35,1	116,8	$y = 1,7834x + 0,0875$	0,9995
9	EC	246,9	822,9	$y = 0,3435x + 0,0652$	0,9999
10	EGCG	301,7	1005,7	$y = 0,6914x - 0,0586$	0,9986
11	Umbelliferon	126,5	421,5	$y = 0,7766x + 0,0518$	0,9999
12	GCG	280,4	934,5	$y = 0,9659x - 0,1208$	0,9994
13	Skopoletin	163,6	545,2	$y = 0,6077x + 0,0506$	0,9993
14	Kyselina ferulová	121,3	404,4	$y = 1,6179x - 0,0163$	0,9999
15	ECG	176,6	588,5	$y = 1,2721x - 0,0146$	0,9996
16	Rutin	197,7	659,1	$y = 0,6878x + 0,104$	0,9980
17	Kvercetin	347,1	1156,9	$y = 1,8258x - 0,3337$	0,9965
18	Kemferol	119,9	399,9	$y = 2,1883x + 0,0375$	0,9993

#### 4.1.4. Optimalizace extrakce v Soxhletově extraktoru

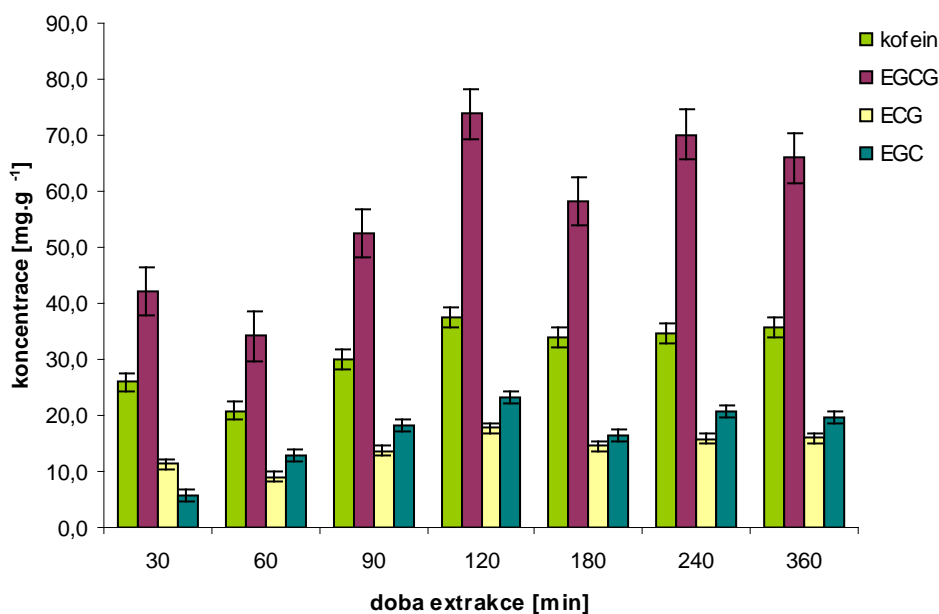
Pro izolaci sledovaných látek z čajů bylo potřeba najít vhodné podmínky extrakce v Soxhletově extraktoru. Jako extrakční činidlo byl zvolen methanol<sup>49</sup>. Optimalizována byla doba extrakce, aby bylo z čaje získáno co největší množství sledovaných antioxidantů a kofeinu. Antioxidanty jsou citlivé na teplotu a dobu extrakce. Při dlouhé době extrakce dochází k degradaci katechinů, při krátké době extrakce se stanovované látky nevyextrahují dostatečně. Proto je potřeba nalézt vhodný čas extrakce.

##### 4.1.4.1. Optimalizace doby extrakce

Pro optimalizaci extrakční doby byl vybrán zelený čaj New Top Mist. Do patronky byl navážen 1 g (s přesností 0,0001 g) rozdrcených čajových lístků. Rozdrcené čajové lístky mají celkově větší povrch než celé čajové lístky, což usnadní difúzi látek do rozpouštědla. Patronka s rozdrcenými lístky byla utěsněna křemennou vatou a vložena do nástavce

Soxhletova extraktor, který byl umístěn na destilační baňku v topném hníždě. Do nástavce byl nalit methanol v 2,5 násobném množství objemu nástavce (175 ml methanolu). Po nasazení chladiče byla zahájena extrakce. Byly zkoušeny doby extrakce 30, 60, 90, 120, 240 a 360 minut. Koncentrace látek byla zjištěna odečtením plochy píku a dosazením této hodnoty do příslušné rovnice kalibrace. Pro určení vhodné extrakční doby byla sledována koncentrace nejvýznamnějších antioxidantů epigallokatechin gallátu, epicatechin gallátu, epigallokatechinu a kofeinu, v jednotlivých extraktech. Na Obr. 10 je graficky znázorněna závislost koncentrace sledovaných látek na době extrakce. Je patrné, že při době extrakce 30, 60 a 90 minut se vyextrahovalo menší množství sledovaných látek, než při delších dobách extrakce. Od 60 do 120 minuty extrakce stoupá množství vyextrahovaných látek, ale při delší době extrakce již dochází k poklesu množství sledovaných látek v extraktu.

Zvolená doba extrakce byla 120 minut. Při této době se vyextrahovalo největší množství sledovaných látek. Zvolená doba extrakce byla použita pro extrakci všech vzorků čaje.



Obr. 10: Závislost koncentrace látek na době extrakce v Soxhletově extraktoru

## 4.2. Analýza extraktů a výluhů čajů

Fenolové látky v čajových extraktech a ve výluzích byly stanoveny za optimalizovaných podmínek extrakce v Soxhletově extraktoru, separace a detekce. K analýze bylo vybráno 15 různých čajů – 6 zelených sypaných, 3 zelené sáčkové, bílý sypaný, černý sypaný, 2 oolong sypané, 2 černé odkofeinované sáčkové.

Pro extrakci byl navážen 1 g čaje rozdrčeného ve třecí misce. Extrakce byla provedena v Soxhletově extraktoru, jako extrakční činidlo byl použit methanol. Doba extrakce byla 120 minut. Po uplynutí extrakční doby byl extrakt zakoncentrován, převeden do 50 ml odměrné baňky, doplněn po rysku a uchován v chladničce. Před vlastní analýzou byl extrakt zfiltrován pomocí stříkačky přes membránový filtr (PTFE 0,45  $\mu\text{m}$ ) a žeděn mobilní fází A v poměru 1 : 2. Extrakt byl naředěn z důvodu značné eluční síly methanolu. Každý vzorek čaje byl extrahován dvakrát a každý extrakt byl dvakrát proměřen. V Příloze 3 a 4 jsou uvedeny ukázky chromatogramů vybraných extraktů čajů.

Pro přípravu všech výluhů čajů byl navážen do kádinky 1 g čaje, zalit 200 ml 100 °C vody a ponechán louhovat 3 minuty. Poté byl slit, ochlazen, filtrován pomocí stříkačky přes membránový filtr (PTFE 0,45  $\mu\text{m}$ ) a ihned analyzován. Každý čaj byl proměřen dvakrát, pro každé měření byl připraven čerstvý výluh čaje. V Příloze 5 a 6 jsou uvedeny ukázky chromatogramů vybraných výluhů čajů.

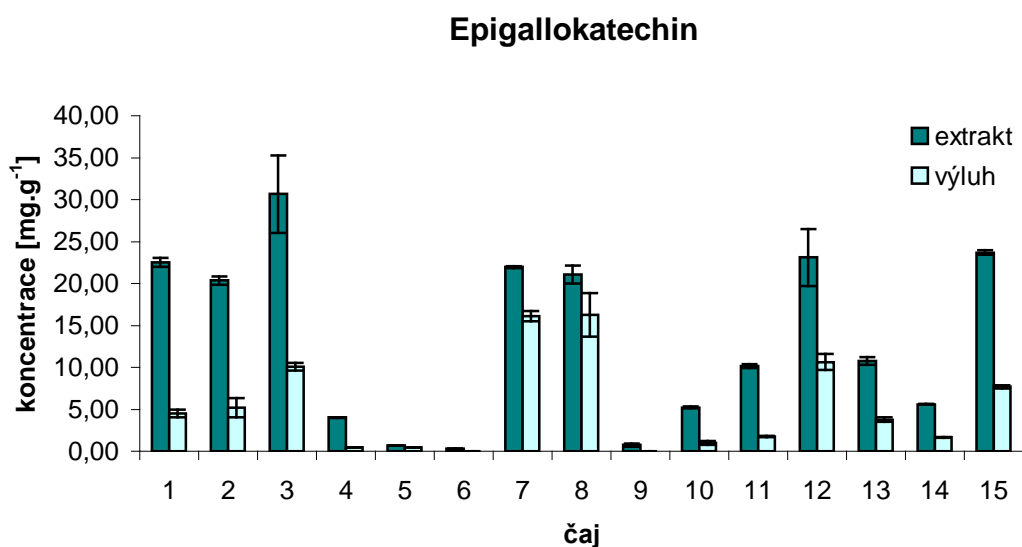
V extraktech i ve výluzích čajů byly fenolické látky identifikovány podle retenčních časů, porovnáním spekter píků se spektry píků standardních látek. K potvrzení přítomnosti látek byla použita metoda standardního přídávku. Po identifikaci jednotlivých látek byla odečtena plocha příslušných píků a podle kalibračních závislostí standardů byla vypočtena koncentrace fenolových látek v extraktech a výluzích, jako množství látky vztažené na 1 g čaje. V extraktech i ve výluzích byly identifikovány kyselina gallová, epigallokatechin, katechin, kyselina kávová, kofein, epikatechin, epigallokatechin gallát, gallokatechin gallát, epikatechin gallát a rutin. Pouze v některých čajových extraktech byl nalezen kvercetin a kemferol. Koncentrace všech stanovených látek v extraktech a výluzích jsou uvedeny v tabulkách Příloze 7 a 8. Uvedené směrodatné odchylky byly vypočteny programem Excel ze čtyř hodnot pro extrakty a ze dvou hodnot pro výluhy. Byly porovnány koncentrace identifikovaných látek v extraktech a koncentrace identifikovaných látek ve výluzích čajů a vyjádřeny jako procentický obsah látek ve výluhu, kde koncentrace látek v extraktu byla brána jako 100 %. Toto srovnání bylo provedeno s cílem zjistit, jaká koncentrace látek se

vyextrahuje do methanolu a jaká koncentrace látek se vyluhuje do vody. Průměr procentického zastoupení ve vyluzích je pro každou látku počítán z hodnot nepřesahujících 100 %. Procentické srovnání extraktů a vyluhů je uvedeno v tabulce v Příloze 9.

## 4.2.1. Katechiny

### 4.2.1.1. Epigallokatechin

Epigallokatechin byl stanoven ve všech extraktech a v téměř všech vyluzích. Výjimkou jsou vyluky z čajů černého odkofeinovaného (6) a černého sypaného (9), ve kterých nebyl epigallokatechin stanoven (viz Obr. 11).



Obr. 11: Koncentrace epigallokatechinu v extraktu a vyluhu ze vzorků čajů

Nejvyšší koncentrace epigallokatechinu byla stanovena v extraktech z čaje zeleného sypaného (3) a (12) a zeleného čaje sáčkového (15). Nejnižší koncentrace epigallokatechinu byla v extraktech z čajů černých odkofeinovaných (5) a (6) a z čaje černého sypaného (9). Průměrná koncentrace epigallokatechinu v extraktech ze zelených čajů byla 19,97 mg.g<sup>-1</sup>, z černých čajů 0,58 mg.g<sup>-1</sup> a oolong čajů 7,68 mg.g<sup>-1</sup>.

Nejvyšší koncentrace epigallokatechinu byla ve vyluzích připravených z čajů zelených sáčkových (7), (8) a (15) a z čaje zeleného sypaného (12). Epigallokatechin nebyl stanoven ve vyluzích z čajů černého odkofeinovaného (6) a černého sypaného (9). Nízká koncentrace epigallokatechinu byla ve vyluzích z čajů černého odkofeinovaného (5) a bílého sypaného (4).

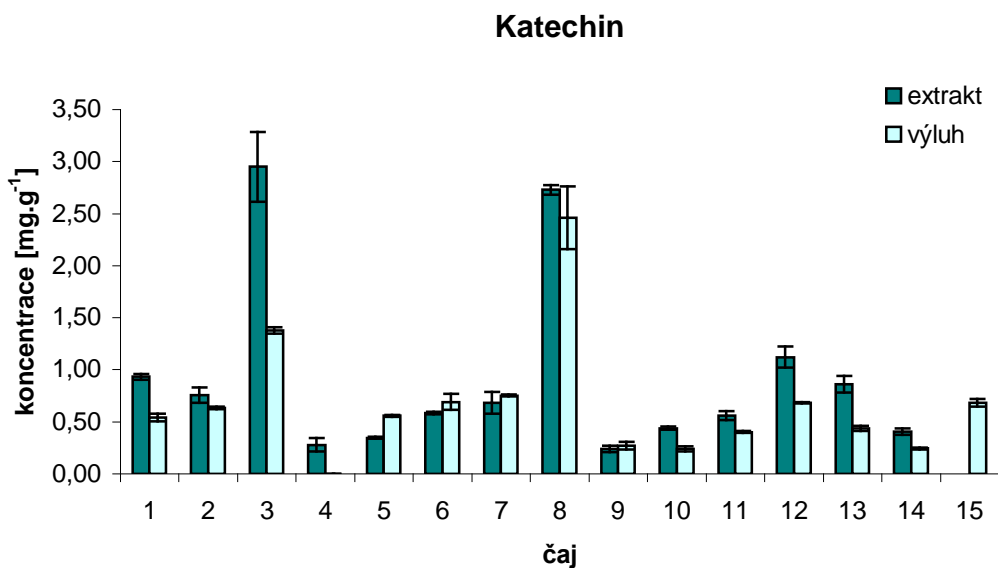
Průměrná koncentrace epigallokatechinu ve výluzích ze zelených čajů byla  $8,42 \text{ mg.g}^{-1}$ , z černých čajů  $0,2 \text{ mg.g}^{-1}$  a oolong čajů  $1,37 \text{ mg.g}^{-1}$ . Koncentrace epigallokatechinu se fermentací snižuje. Při fermentaci vznikají z katechinů theaflaviny a thearubiginy.

V připravených výluzích bylo nalezeno průměrně 37 % epigallokatechinu stanoveného v extraktech. Nejvyšší množství epigallokatechinu přešlo do výluhu z čaje zeleného sáčkového (8), který obsahoval 77 % epigallokatechinu stanoveného v extraktu. Nejnižší množství epigallokatechinu přešlo do výluhu z čaje bílého sypaného, ve kterém bylo stanoveno 11 % epigallokatechinu obsaženého v extraktu.

Zelené čaje obsahovaly až devětkrát vyšší koncentrace epigallokatechinu než čaje černé, bílé a oolong. U sáčkových čajů je koncentrace epigallokatechinu ve výluhu vyšší než u sypaných, což může být způsobeno tím, že čaj obsažený v sáčku je rozemletý a je snazší difúze látek.

#### **4.2.1.2. Katechin**

Katechin se vyskytoval téměř ve všech extraktech, výjimku tvořil extrakt čaje zeleného sáčkového (15). Také ve všech výluzích, s výjimkou výluhu z bílého sypaného čaje (4), byl katechin stanoven. Ve většině extraktů byl katechin ve vyšší koncentraci než ve výluzích. Výjimkou jsou výluhy připravené z čajů černých odkofeinovaných (5) a (6), ze zeleného čaje sáčkového (7) a z černého čaje sypaného (9), u kterých byla stanovena vyšší koncentrace katechinu ve výluzích než v extraktech. Na Obr. 12 jsou graficky znázorněny koncentrace katechinu v extraktech a výluzích.



*Obr. 12: Koncentrace katechinu v extraktu a výluhu ze vzorků čajů*

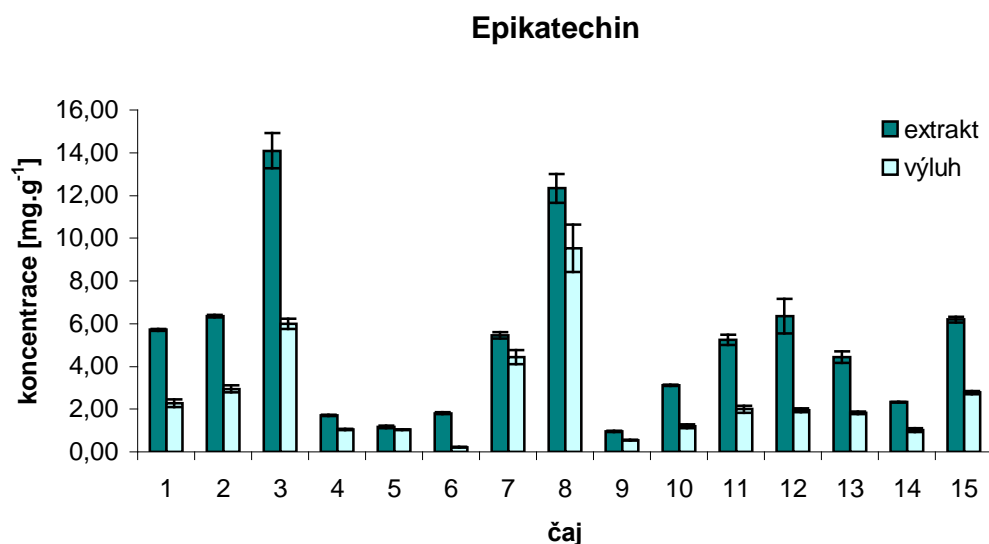
Nejvyšší koncentrace katechinu byla v extraktech z čajů zelených sypaných (3) a z čaje zeleného sáčkového (8). Katechin nebyl stanoven v extraktu z čaje zeleného sáčkového (15). Nejnižší koncentrace katechinu byly v extraktech z čaje černého sypaného (9), bílého sypaného (4) a černého odkofeinovaného (5). V extraktech ze zelených čajů byla stanovena průměrná koncentrace katechinu  $1,16 \text{ mg.g}^{-1}$ , v extraktech z černých čajů  $0,34 \text{ mg.g}^{-1}$  a v extraktech z oolong čajů  $0,5 \text{ mg.g}^{-1}$ .

Nejvyšší koncentrace katechinu byla ve výluzích z čajů zelených sáčkových (8) a (7), dále z čaje zeleného sypaného (3) a z černého odkofeinovaného čaje (6). Katechin byl pod mezí detekce ve výluhu z čaje bílého sypaného (4). Nejnižší koncentrace katechinu byla ve výluhu z čaje oolong sypaného (10), zeleného sypaného (14) a černého sypaného čaje (9). Průměrná koncentrace katechinu ve výluzích ze zelených čajů byla  $0,87 \text{ mg.g}^{-1}$ , z černých čajů  $0,51 \text{ mg.g}^{-1}$  a oolong čajů  $0,32 \text{ mg.g}^{-1}$ .

Do připravených výluhů přešlo průměrně 64 % katechinů stanovených v extraktech. Nejvíce katechinu přešlo do výluhu z čaje zeleného sáčkového (8), a to 90 %. Naopak nejméně katechinu přešlo do výluhu z čaje bílého sypaného, kde nebyl nalezen.

### 4.2.1.3. Epikatechin

Epikatechin byl stanoven v extraktech i ve vyluzích všech čajů. Na Obr. 13 je graficky znázorněna koncentrace epikatechinu v extraktu a vyluhu všech vzorků čajů.



Obr. 13: Koncentrace epikatechinu v extraktu a vyluhu ze vzorků čajů

Nejvyšší koncentrace epikatechinu byla stanovena v extraktu z čaje zeleného sypaného (3), dále zeleného sáčkového čaje (8) a ze zelených sypaných čajů (12) a (2). Nejnižší koncentrace epikatechinu byla v extraktech z čaje černého sypaného (9), z čajů černých odkofeinovaných sáčkových (6) a (5) a bílého sypaného čaje (4). Průměrná koncentrace epikatechinu v extraktech ze zelených čajů byla  $7,03 \text{ mg.g}^{-1}$ , z černých čajů  $1,31 \text{ mg.g}^{-1}$  a oolong čajů  $4,18 \text{ mg.g}^{-1}$ .

Nejvyšší koncentrace epikatechinu byla stanovena ve vyluzích z čajů zelených sáčkových (8) a (7) a ve vyluhu z čaje zeleného sypaného (3). Nejnižší koncentrace epikatechinu byla ve vyluhu z čaje černého odkofeinovaného (6), dále z černého sypaného čaje (9) a zeleného sypaného čaje (14). Průměrná koncentrace epikatechinu ve vyluzích ze zelených čajů byla  $3,64 \text{ mg.g}^{-1}$ , z černých čajů  $0,60 \text{ mg.g}^{-1}$  a oolong čajů  $1,60 \text{ mg.g}^{-1}$ . Fermentace snižuje koncentraci epikatechinu v čaji.

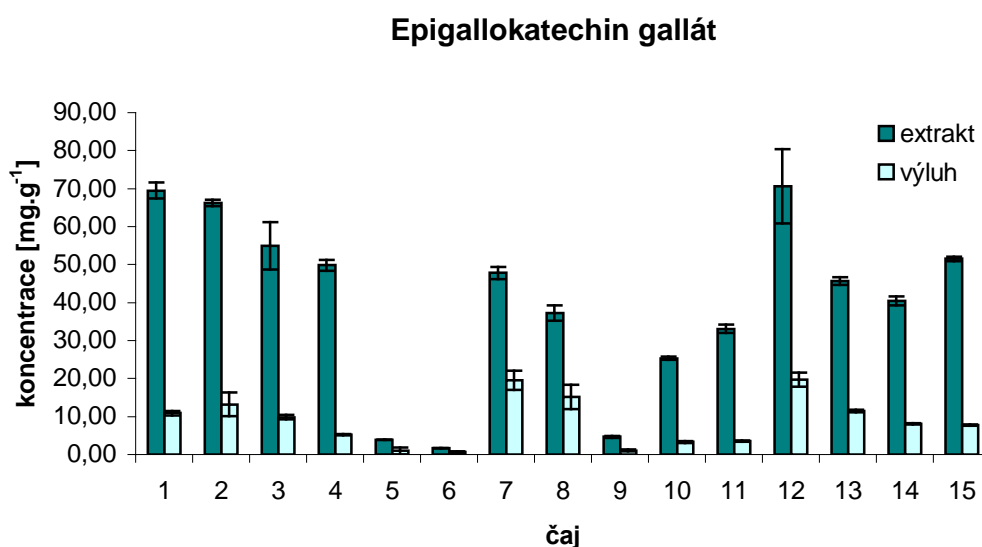
V extraktech byla koncentrace epikatechinu vyšší než ve vyluzích, do kterých se vyluhovalo průměrně 50 % epikatechinu stanoveného v extraktu. Tento rozdíl v koncentracích byl nejvýraznější u čaje zeleného sypaného (3), u kterého do vyluhu přešlo 43 % epikatechinu. Naopak nejmenší rozdíl koncentrací epikatechinu v extraktu a vyluhu byl

u čaje černého odkofeinovaného (5), u kterého přešlo do výluhu 88 % epikatechinu stanoveného v extraktu.

Sáčkové čaje obsahovaly ve výluhu o 2,5 mg.g<sup>-1</sup> více epikatechinu než čaje sypané, což je způsobené velikostí částic čaje v sáčku, které jsou na rozdíl od sypaných čajů velmi malé. Tím se usnadní difúze látek do výluhu.

#### 4.2.1.4. Epigallokatechin gallát

Epigallokatechin gallát byl stanoven ve všech extraktech i výluzích. V extraktech byla koncentrace epigallokatechin gallátu v některých případech až šestkrát vyšší než ve výluzích. Na Obr. 14 je graficky znázorněna koncentrace epigallokatechin gallátu v extraktu a ve výluhu všech vzorků čajů.



Obr. 14: Koncentrace epigallokatechin gallátu v extraktu a výluhu ze vzorků čajů

Nejvyšší koncentrace epigallokatechin gallátu byla v extraktech z čajů zelených sypaných (12), (1), (2) a (3). Nejnižší koncentrace epigallokatechin gallátu byla v extraktech připravených z černých odkofeinovaných čajů (6) a (5) a dále z čaje černého sypaného (9). Extrakty ze zelených čajů obsahovaly průměrně 53,76 mg.g<sup>-1</sup> epigallokatechin gallátu, extrakty z černých čajů 5,15 mg.g<sup>-1</sup> a extrakty z oolong čajů 29,21 mg.g<sup>-1</sup>.

Nejvyšší koncentrace epigallokatechin gallátu měly výluhy připravené z čaje zeleného sypaného (12) a z čajů zelených sáčkových (7) a (8). Nejnižší koncentrace epigallokatechin gallátu byly ve výluzích z černých odkofeinovaných čajů (6) a (5). Velmi nízká koncentrace

epigallokatechin gallátu byla ve výluhu připraveného z černého sypaného čaje (9). Průměrná koncentrace epigallokatechin gallátu ve vyluzích ze zelených čajů byla  $12,86 \text{ mg.g}^{-1}$ , z černých čajů  $0,89 \text{ mg.g}^{-1}$  a oolong čajů  $3,42 \text{ mg.g}^{-1}$ . Fermentované čaje mají nižší koncentraci epigallokatechin gallátu než zelený čaj, který není fermentovaný.

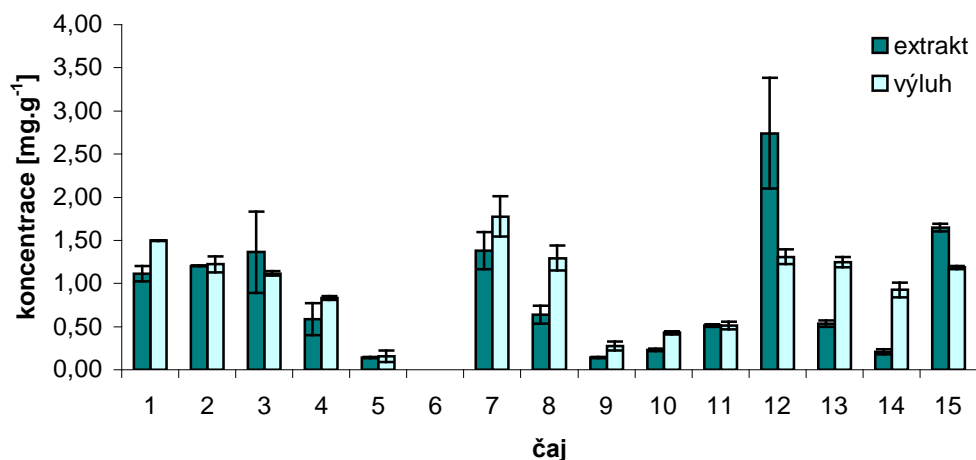
Do čajových výluhů průměrně přešlo 23 % epigallokatechin gallátu. Nejmenší rozdíly v koncentracích epigallokatechin gallátu v extraktech a vyluzích byly u černého odkofeinovaného sáčkového čaje (6) a u zelených sáčkových čajů (7) a (8). U těchto čajů se vyluhovalo 41 % epigallokatechin gallátu stanoveného v extraktech, což je způsobeno velikostí částí čajových lístků v sáčku. Nejméně epigallokatechin gallátu se vyluhovalo u čaje bílého sypaného (4) 10 % a oolong čajů (10), (11) 12 % epigallokatechin gallátu stanoveného v extraktech.

Zelené čaje obsahovaly i čtyřikrát větší množství epigallokatechin gallátu než čaje černé, bílé a oolong. Z čajů sáčkových se do nápoje vyluhuje větší množství epigallokatechin gallátu, což je způsobeno velikostí částíček čajového listu. Sypané čaje obsahovaly srovnatelné nebo i vyšší množství epigallokatechin gallátu, jelikož sypané čaje obsahují celé svinuté lístky, tak se do nápoje vyluhuje menší množství epigallokatechin gallátu.

#### **4.2.1.5. Gallokatechin gallát**

Gallokatechin gallát byl stanoven ve všech extraktech i vyluzích, výjimku tvoří čaj černý odkofeinovaný (6), u kterého byl gallokatechin gallát pod mezí detekce v extraktu i ve výluhu (viz Obr. 15). U čajů zelených sypaných čajů (3) a (12) a u zeleného sáčkového čaje (15) byl gallokatechin gallát ve vyšší koncentraci v extraktu než ve výluhu.

## Gallokatechin gallát



Obr. 15: Koncentrace gallokatechin gallátu v extraktu a výluhu ze vzorků čajů

Nejvyšší koncentrace gallokatechin gallátu byla v extraktu z čaje zeleného sypaného (12) a z čajů zelených sáčkových (15) a (7). Gallokatechin gallát nebyl stanoven v extraktu z černého odkofeinovaného čaje (6). Nejnižší koncentrace gallokatechin gallátu byla stanovena v extraktu z čaje černého odkofeinovaného (5), černého sypaného (9) a zeleného sypaného čaje (14). Extrakty ze zelených čajů obsahovaly průměrně  $1,20 \text{ mg.g}^{-1}$  gallokatechin gallátu, extrakty z černých čajů  $0,14 \text{ mg.g}^{-1}$  a extrakty z oolong čajů  $0,37 \text{ mg.g}^{-1}$ .

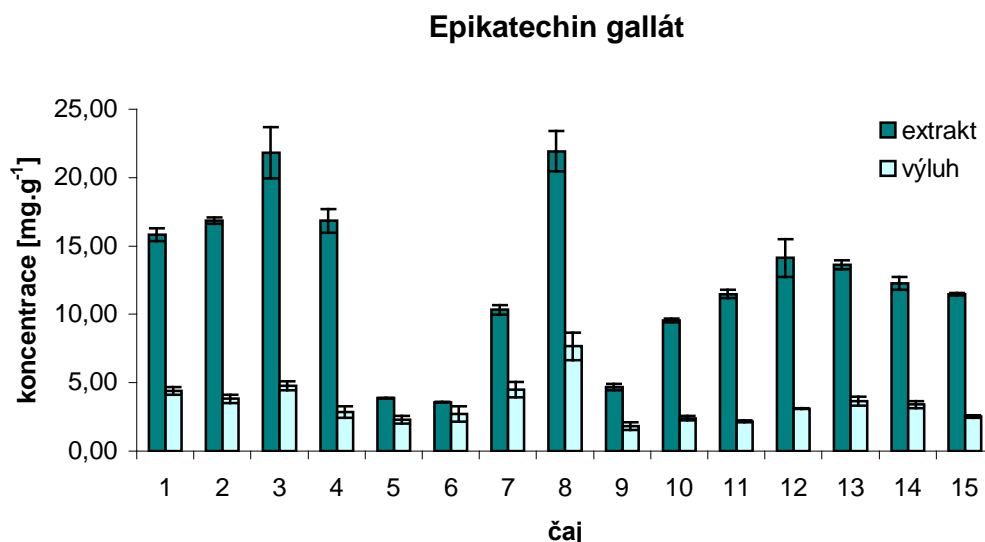
Nejvyšší koncentrace gallokatechin gallátu byla ve výluhu připraveného z čaje zeleného sáčkového (7), dále ze zeleného sypaného čaje (1), (12) a (2). Gallokatechin gallát nebyl stanoven ve výluhu z čaje černého odkofeinovaného (6). Nejnižší koncentrace gallokatechin gallátu byla ve výluhu z čaje černého odkofeinovaného (5), černého sypaného (9) a oolong sypaného (10). Průměrná koncentrace gallokatechin gallátu ve výluzích ze zelených čajů byla  $1,28 \text{ mg.g}^{-1}$ , z černých čajů  $0,22 \text{ mg.g}^{-1}$  a oolong čajů  $0,47 \text{ mg.g}^{-1}$ .

Z čajů (3), (12) a (15) přešlo do výluhu průměrně 67 % gallokatechin gallátu stanoveného v extraktech. U ostatních čajů byla koncentrace gallokatechin gallátu vyšší ve výluhu než v extraktu.

Zelené čaje obsahovaly až pětkrát větší množství gallokatechin gallátu než černé, oolong a bílé čaje. Fermentací čaje se množství gallokatechin gallátu snižuje.

#### 4.2.1.6. Epikatechin gallát

Epikatechin gallát byl stanoven ve všech extraktech i výluhách. U všech čajů byl epikatechin gallát nalezen ve vyšší koncentraci v extraktu. Na Obr. 16 je graficky znázorněna koncentrace epikatechin gallátu v extraktu a ve výluhu všech vzorků čajů.



Obr. 16: Koncentrace epikatechin gallátu v extraktu a výluhu ze vzorků čajů

Nejvyšší koncentrace epikatechin gallátu byla stanovena v extraktu z čaje zeleného sáčkového (8) a z čajů zelených sypaných (3), (2). Nejnižší koncentrace epikatechin gallátu byla v extraktech z černých odkofeinovaných čajů (6) a (5) a v černém sypaném čaji (9). Průměrná koncentrace epikatechin gallátu v extraktech ze zelených čajů byla 15,36 mg.g<sup>-1</sup>, z černých čajů 4,03 mg.g<sup>-1</sup> a oolong čajů 10,52 mg.g<sup>-1</sup>.

Nejvyšší koncentrace epikatechin gallátu obsahovaly výluhy z čajů zelených sáčkových (8) a (7) a ze zelených sypaných čajů (3) a (1). Nejnižší koncentrace epikatechin gallátu byla ve výluhu z čaje černého sypaného (9), z oolong sypaných (11) a (10) a zeleného sáčkového čaje (15). Výluhy ze zelených čajů obsahovaly průměrně 4,20 mg.g<sup>-1</sup> epikatechin gallátu, výluhy z černých čajů 2,28 mg.g<sup>-1</sup> a výluhy z oolong čajů 2,29 mg.g<sup>-1</sup>.

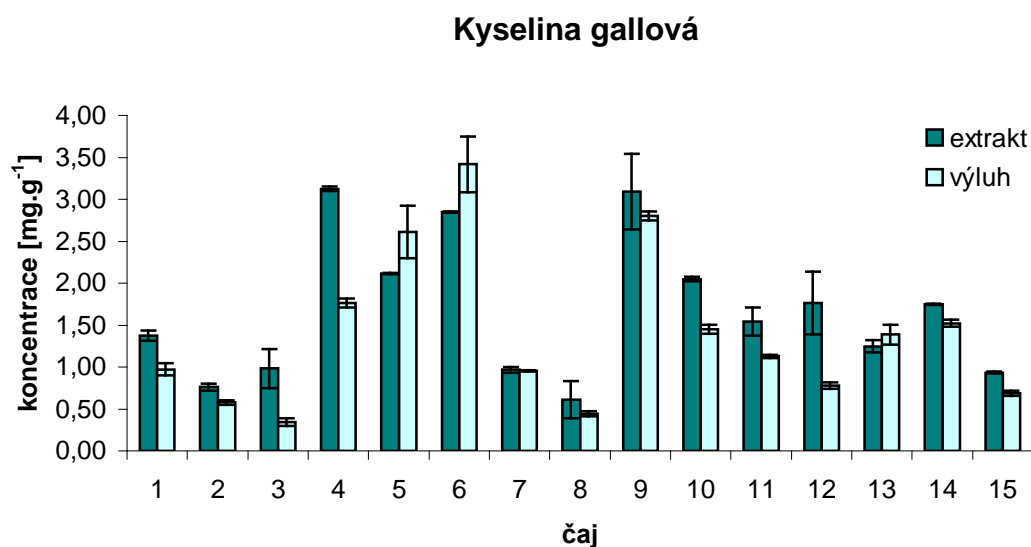
Do výluhů se v průměru vyluhovalo 32 % epikatechin gallátu stanoveného v extraktech. Rozdíl v koncentraci epikatechin gallátu v extraktu a ve výluhu byl výraznější u zelených čajů. U černých odkofeinovaných čajů (5) a (6) nebyl rozdíl v koncentraci epikatechin gallátu tak výrazný, do výluhu přešlo 68 % epikatechin gallátu stanoveného v extraktu. Nejméně epikatechin gallátu se vyluhovalo z čaje bílého sypaného, který ve výluhu obsahoval 17 % epikatechin gallátu stanoveného v extraktu.

Zelené čaje obsahovaly epikatechin gallátu až o 59 % více než černé, oolong a bílé čaje, protože při fermentaci čaje vznikají z katechinů theaflaviny a thearubiginy. Koncentrace epikatechin gallátu je vyšší ve výluzích ze sáčkových čajů, což je způsobeno snadnější difúzí látek z menších částic čaje, které jsou v sáčku.

## 4.2.2. Fenolové kyseliny

### 4.2.2.1. Kyselina gallová

Kyselina gallová byla nalezena ve všech vzorcích čajů, a to jak v extraktech tak i v připravených výluzích. U většiny čajů byla kyselina gallová stanovena ve vyšší koncentraci v extraktech, výjimkou jsou čaje černé odkofeinované (5) a (6) a zelený čaj sypaný (13). Tyto čaje měly vyšší koncentraci kyseliny gallové ve výluhu. Na Obr. 17 je graficky znázorněna koncentrace kyseliny gallové v extraktu a výluhu všech vzorků čajů.



Obr. 17: Koncentrace kyseliny gallové v extraktu a výluhu ze vzorků čajů

Nejvyšší koncentrace kyseliny gallové obsahovaly extrakty připravené z čaje bílého sypaného (4), dále z čaje černého sypaného (9), z odkofeinovaných černých čajů (6) a (5). Nejnižší koncentrace kyseliny gallové byly stanoveny v extraktech připravených z čajů zelených sáčkových (8) a (15), zelených sypaných (3) a (2). Průměrná koncentrace kyseliny gallové v extraktech ze zelených čajů byla 1,15 mg.g<sup>-1</sup>, z černých čajů 2,68 mg.g<sup>-1</sup> a oolong čajů 1,79 mg.g<sup>-1</sup>.

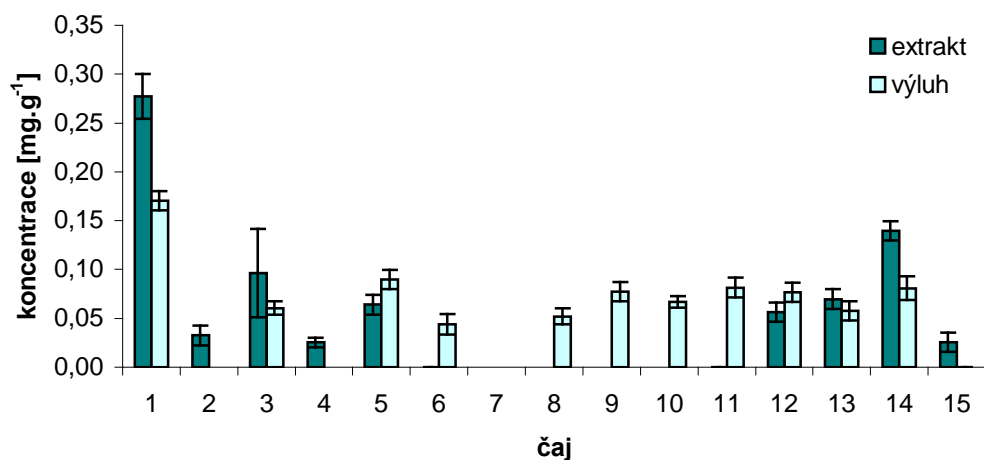
Vyšší koncentrace kyseliny gallové ve výluhu než v extraktu byla ve výluzích z čajů černých odkofeinovaných (5) a (6) a ze zeleného čaje sypaného (13). Nejvyšší koncentrace kyseliny gallové byla stanovena ve výluhu z čaje černého odkofeinovaného (6) a z čaje černého sypaného (9). Nejnižší koncentrace kyseliny gallové obsahovaly výluhy z čajů zelených sypaných (3) a (2), zelených sáčkových (8) a (15). Průměrná koncentrace kyseliny gallové ve výluzích ze zelených čajů byla  $0,85 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , z černých čajů  $2,94 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  a oolong čajů  $1,29 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Do čajového výluhu průměrně přešlo 71 % kyseliny gallové stanovené v extraktech. Výjimku tvoří odkofeinované černé čaje (5), (6) a sypaný zelený čaj (13), u kterých byla kyselina gallová ve vyšší koncentraci ve výluhu (o 18 %). Srovnatelná koncentrace kyseliny gallové v extraktu a výluhu byla u sáčkového zeleného čaje (7), kde do výluhu přešlo 99 % kyseliny gallové. Nejmenší množství kyseliny gallové přešlo do výluhu z čaje zeleného sypaného (3), který obsahoval 35 % kyseliny gallové stanovené v extraktu.

#### **4.2.2.2. Kyselina kávová**

Kyselina kávová byla stanovena jen v některých extraktech a v některých výluzích (viz Obr. 18). Ve vyšší koncentraci v extraktech než ve výluzích byla kyselina kávová stanovena u čajů zelených sypaných (1), (2), (3), (12), (13), (14) a (15). Pro tyto čaje byl rozdíl v koncentraci kyseliny kávové v extraktu a ve výluhu výraznější než u čaje černého odkofeinovaného (5) a zeleného sypaného čaje (12), které měly vyšší koncentraci kyseliny kávové ve výluhu.

## Kyselina kávová



Obr. 18: Koncentrace kyseliny kávové v extraktu a výluhu ze vzorků čajů

Kyselina kávová byla stanovena v extraktech z čajů zelených sypaných (1), (2), (3), (12), (13) a (14), dále v čaji bílém sypaném (4), v čaji černém odkofeinovaném (5) a zeleném čaji sáčkovém (15). Nejvyšší koncentrace kyseliny kávové byla v extraktu z čajů zelených sypaných (1) a (14). Kyselina kávová nebyla stanovena u extraktů z čaje černého odkofeinovaného (6), ze zelených sáčkových čajů (7) a (8), z černého sypaného (9), z oolong čajů (10) a (11). Nejnižší koncentrace kyseliny kávové byly stanoveny v extraktech z čaje bílého sypaného (4), zeleného sáčkového (15) a zeleného sypaného čaje (2).

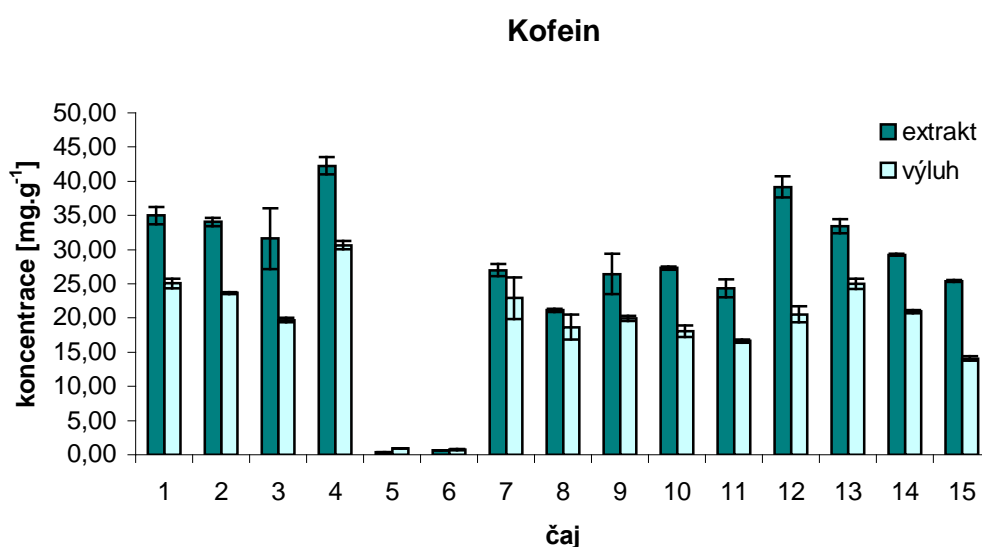
Kyselina kávová nebyla stanovena u výluhů připravených z čaje zeleného sypaného (2), bílého sypaného (4) a zelených sáčkových čajů (7) a (15). Nejnižší koncentrace kyseliny kávové byly stanoveny ve výluzích z čaje odkofeinovaného sáčkového (6), zeleného sáčkového čaje (8) a zeleného čaje sypaného (13). Nejvyšší koncentrace kyseliny kávové byla ve výluzích z čaje zeleného sypaného (1), černého odkofeinovaného (5) a oolong (11).

V některých extraktech kyselina kávová nalezena nebyla. Voda je polárnější než methanol a patrně se do ní vyluhovalo více kyseliny kávové. U zelených sypaných čajů (1), (3), (13) a (14), u kterých byla kyselina kávová ve vyšší koncentraci v extraktech, se do vody se vyluhovalo průměrně 66 % kyseliny kávové stanovené v extraktech.

## 4.2.3. Alkaloidy

### 4.2.3.1. Kofein

Kofein byl stanoven ve všech extraktech i vyluzích (viz Obr. 19). Koncentrace kofeinu byla v extraktech vyšší než ve vyluzích, jen u černých odkofeinovaných čajů (5) a (6) byla koncentrace kofeinu vyšší ve vyluhu než v extraktu.



Obr. 19: Koncentrace kofeinu v extraktu a vyluhu ze vzorků čajů

Nejvyšší koncentrace kofeinu byla stanovena v extraktu připraveného z čaje bílého sypaného (4), dále zelených sypaných čajů (12), (1) a (2). Nejnížší koncentrace kofeinu měly černé odkofeinované čaje (5) a (6). Nižší koncentraci kofeinu měl extrakt z čaje zeleného sáčkového (8), oolong sypaného (11) a zeleného sáčkového čaje (15). Průměrná koncentrace kofeinu v extraktech ze zelených čajů byla  $30,67 \text{ mg.g}^{-1}$ , z černých odkofeinovaných čajů  $0,53 \text{ mg.g}^{-1}$  a oolong čajů  $25,82 \text{ mg.g}^{-1}$ .

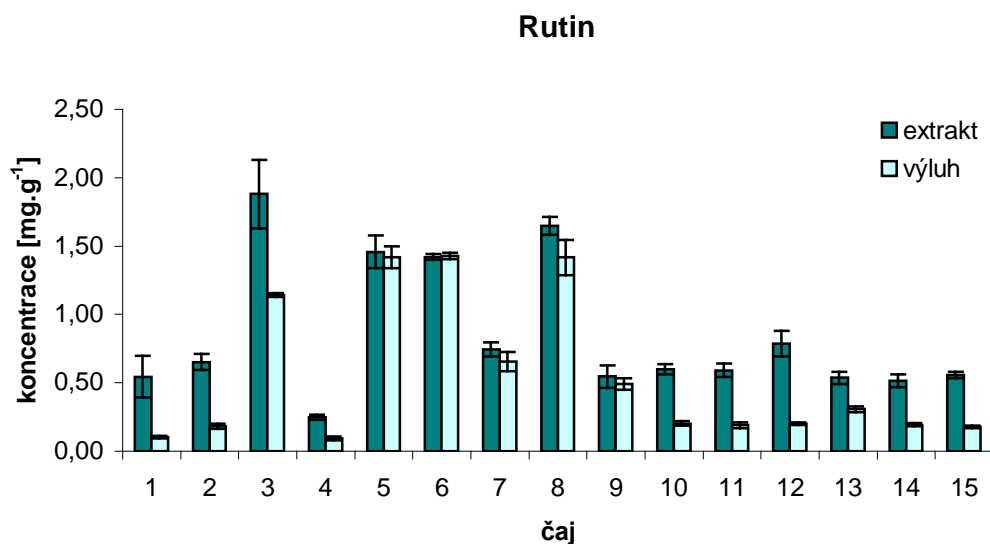
Nejvyšší koncentrace kofeinu byla ve vyluzích připravených z čaje bílého sypaného (4), zelených sypaných čajů (1), (13) a (2). Nejnížší koncentrace kofeinu byla v černých odkofeinovaných čajích (5) a (6). Mezi ostatními čaji byla nejnížší koncentrace kofeinu ve vyluhu z čaje zeleného sáčkového (15), oolong sypaného (11) a (10) a zeleného sáčkového čaje (8). Ve vyluzích ze zelených čajů byla stanovena průměrná koncentrace kofeinu  $21,17 \text{ mg.g}^{-1}$ , ve vyluzích z černých odkofeinovaných čajů  $0,84 \text{ mg.g}^{-1}$  a ve vyluzích z oolong čajů  $17,37 \text{ mg.g}^{-1}$ .

Ve všech ostatních vyluzích byla koncentrace kofeinu podobná, průměrně přešlo do výluhu 70 % kofeinu stanoveného v extraktech. Nejvíce kofeinu přešlo do výluhu ze zeleného čaje sáčkového (8), do kterého se vyluhovalo 88 % kofeinu stanoveného v extraktu. Nejméně kofeinu přešlo do výluhu z čaje zeleného sypaného (12), který obsahoval 52 % kofeinu stanoveného v extraktu. Odkofeinované čaje mají oproti ostatním čajům koncentraci kofeinu velmi nízkou (méně než  $1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Pro maximální zachování ostatních látek se pro odkofeinování čajů používá extrakce oxidem uhličitým v nadkritickém stavu. Je patrné, že odstranění kofeinu z čaje není 100%. Odkofeinováním se sníží koncentrace kofeinu v čaji asi na 4 %.

## 4.2.4. Flavonoly

### 4.2.4.1. Rutin

Rutin byl stanoven ve všech extraktech i ve vyluzích. Koncentrace rutinu byla vyšší u většiny extraktů, jen výluh připravený z čaje černého odkofeinovaného (6) měl nepatrně vyšší koncentraci rutinu než extrakt. Na Obr. 20 je graficky znázorněna koncentrace rutinu v extraktu a ve výluhu všech vzorků čajů.



Obr. 20: Koncentrace rutinu v extraktu a výluhu ze vzorků čajů

Nejvyšší koncentraci rutinu obsahoval extrakt připravený z čaje zeleného sypaného (3). Vysoká koncentrace rutinu byla dále v extraktech z čaje zeleného sáčkového (8)

a z černých odkofeinovaných čajů (5) a (6). Nejnižší koncentrace rutinu byla v extraktech připravených z čaje bílého sypaného (4) a z čajů zelených sypaných (14), (13) a (1). Průměrná koncentrace rutinu v extraktech ze zelených čajů byla  $0,87 \text{ mg.g}^{-1}$ , z černých čajů  $1,14 \text{ mg.g}^{-1}$  a oolong čajů  $0,60 \text{ mg.g}^{-1}$ .

Ve vyluzích připravených z černých odkofeinovaných čajů (5) a (6) a ze zeleného čaje sáčkového (8) byla koncentrace rutinu nejvyšší. Nejnižší koncentrace rutinu byla stanovena ve vyluzích z čaje bílého sypaného (4), zelených čajů sypaných (1) a (2) a zeleného sáčkového čaje (15). Výluhy ze zelených čajů obsahovaly průměrně  $0,49 \text{ mg.g}^{-1}$  rutinu, výluhy z černých čajů  $1,11 \text{ mg.g}^{-1}$  a výluhy z oolong čajů  $0,20 \text{ mg.g}^{-1}$ .

Výluhy obsahovaly průměrně 55 % rutinu stanoveného v extraktech. U čajů černých odkofeinovaných (5) a (6), zelených sáčkových (7) a (8) a černého sypaného čaje (9) bylo ve výluhu průměrně 92 % rutinu stanoveného v extraktech. U ostatních čajů byla koncentrace rutinu v extraktu až trojnásobná oproti koncentraci rutinu ve výluhu.

#### **4.2.4.2. Kvercetin**

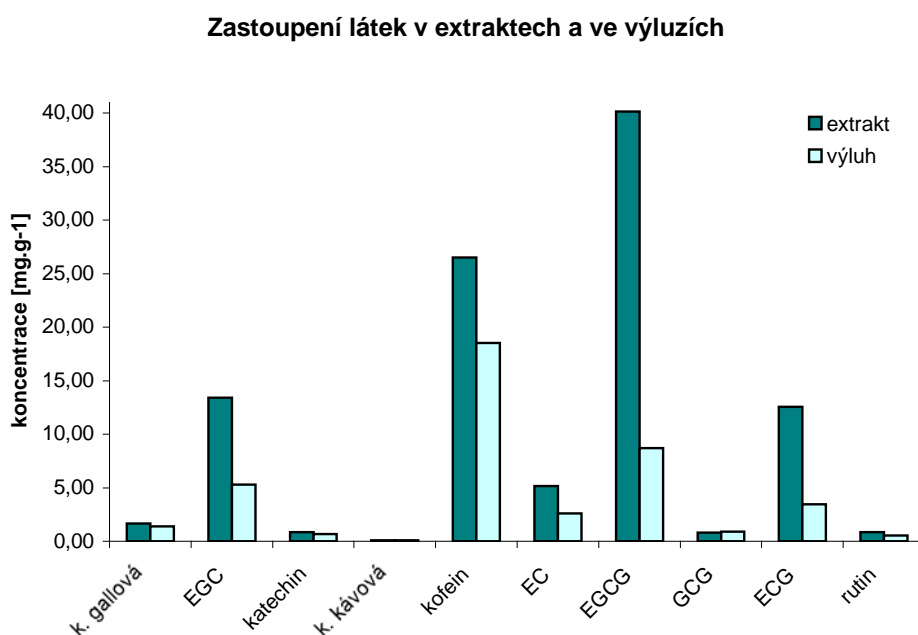
Kvercetin byl stanoven pouze v extraktech ze dvou čajů, a to ze zeleného sypaného čaje (3) a zeleného sáčkového čaje (8). V extraktech z ostatních čajů byl kvercetin pod mezí detekce. Ve vyluzích připravených ze všech vzorků čajů byl kvercetin pod mezí detekce. Vyšší koncentrace  $0,22 \text{ mg.g}^{-1}$  kvercetinu byla v extraktu připraveného z čaje zeleného sypaného (3), extrakt ze zeleného sáčkového čaje (8) obsahoval  $0,13 \text{ mg.g}^{-1}$ .

#### **4.2.4.3. Kemferol**

Kemferol byl stanoven v extraktech z čaje zeleného sypaného (1) a (12), z černého odkofeinovaného čaje (5) a z oolong sypaných (10) a (11). Ve vyluzích připravených ze všech čajů byl kemferol pod mezí detekce. Nejvyšší koncentrace  $0,16 \text{ mg.g}^{-1}$  kemferolu byla v extraktu z čaje zeleného sypaného (12), nejnižší koncentrace  $0,08 \text{ mg.g}^{-1}$  kemferolu byla v extraktu z čaje zeleného sypaného (1).

#### 4.2.5. Zastoupení látek v extraktech a ve výluzích

Na Obr. 21 je graficky znázorněna průměrná koncentrace sledovaných látek v extraktech a ve výluzích ze všech analyzovaných čajů. Většina látek se v extraktech nacházela ve vyšší koncentraci. Výjimku tvoří gallokatechin gallát, nicméně tento rozdíl v obsahu látek byl minimální. V extraktech měl ze všech stanovených látek nejvyšší koncentraci epigallokatechin gallát a dále kofein. Ve výluzích se toto pořadí změnilo. Látkou s nejvyšší koncentrací ve výluhu byl kofein. Epigallokatechin gallát se do vody vyluhoval jen z 23 %, což bylo nejméně ze všech sledovaných látek. I tak je epigallokatechin gallát po kofeinu druhou nejvíce zastoupenou látkou v čajovém výluhu.



Obr. 21: Zastoupení látek v extraktech a ve výluzích

## 5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo nalezení vhodných podmínek na separaci antioxidantů v čajích. Pro přípravu vzorku k analýze byly zvoleny dvě metody, klasická Soxhletova extrakce a běžný způsob přípravy čaje. Takto připravené vzorky byly analyzovány technikou HPLC s DAD.

Optimalizaci byla podrobena jak chromatografická separace, tak extrakce v Soxhletově extraktoru. Nejvhodnější mobilní fází pro separaci antioxidantů byla voda s 0,05 % kyseliny fosforečné s acetonitrem. Separace byla provedena s použitím gradientové eluce, aby bylo dosaženo co nejlepší separace v krátkém čase analýzy. Jako extrakční činidlo pro Soxhletovu extrakci byl zvolen methanol a nejvhodnější extrakční doba byla 120 minut. Tyto podmínky byly použity na analýzu 15 vzorků čajů, zelené (sypané i sáčkové), černý (sypaný) a odkofeinované (sáčkové), oolong (sypané) a bílý (sypaný). U vzorků čajů připravených oběmi metodami byly identifikovány vybrané antioxidanty a kofein a byla stanovena jejich koncentrace.

Ve vzorcích byly stanoveny katechiny – epigallokatechin gallát, katechin, epigallokatechin gallát, epikatechin, gallokatechin gallát, epikatechin gallát, dále kyselina gallová, kyselina kávová, kofein a flavonoly – rutin, kvercetin a kemferol. V zelených čajích byla koncentrace katechinů až čtyřikrát vyšší než u ostatních čajů. Kyselina gallová byla ve vyšších koncentracích obsažena v černých čajích než v zelených, tento rozdíl byl až trojnásobný. U odkofeinovaných černých čajů byla koncentrace kofeinu v porovnání s ostatními čaji velmi nízká, ale koncentrace katechinů byla srovnatelná s černým čajem sypaným. Nejvyšší koncentrace kofeinu byla nalezena v bílém čaji.

U většiny stanovených látek byla jejich koncentrace vyšší ve vzorku připraveném Soxhletovou extrakcí. Výjimku tvořila především kyselina kávová, která byla stanovena ve většině výluhů, ale jen u části vzorků byla nalezena v extraktech. Rozdíl v koncentraci látek mezi extraktem a výluhem byl nejvýznamnější u katechinů, především u epigallokatechin gallátu. Z tohoto i šestinásobného rozdílu je patrné, jak malá část zdraví příznivých katechinů se vyluhuje do nápoje. Tento rozdíl je způsobený tím, že čajové listy byly pro extrakci rozdrceny, látky se z listů rychleji vyextrahují do rozpouštědla, ve kterém mají vyšší rozpustnost. Drcení čajových listů má poměrně značný vliv na obsah antioxidantů ve výluhu čaje, což bylo experimentálně dokázáno.

Aplikace metody na více vzorků a vyzkoušení dalších podmínek extrakce byla mimo rozsah diplomové práce. Z naměřených dat vyplývá, že čajové listy obsahují daleko vyšší množství antioxidantů, než které získáme klasickou přípravou čaje jako nápoje.

## 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Kadlec P., Melzoch K., Voldřich M. a kol.: *Co byste měli vědět o výrobě potravin? Technologie potravin*, KEY Publishing, Ostrava 2009.
2. Pratt S. C., Matzhews K.: *Superpotraviny*, IKAR, Praha 2005.
3. Oppliger P.: *Nová kniha o zeleném čaji*, PRAGMA, Praha 2000.
4. Martin P.: *Čaj, čaj, čaj*, Ivo Železný, Praha 1999.
5. Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin 2*, OSSIS, Tábor 2009.
6. Shao-Ping X., Ming-Yong X.: *Food Hydrocolloid*. 25, 144–149 (2011).
7. Leung A.Y., Foster S.: *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*, John Wiley & Sons Inc. 1996.
8. Lunder T.L.: *American Chemical Society*, 114–120 (1992).
9. Velíšek J.: *Chemie potravin 3*, OSSIS, Tábor 1999.
10. Mindell E.: *Vitamínová bible pro 21. století*, Euromedia Group, Praha 2000.
11. Youngson R.: *Antioxidanty*, Jota, Brno 1995.
12. Bravo L.: *Nutr. Rev.* 56, 317–333 (1998).
13. Leibovitz B.E., Mueller J.A.: *J. Optim. Nutr.* 2, 79, 17–35 (1993).
14. King A., Young G.: *J. Am. Diet. Assoc.* 99, 213–218 (1999).
15. Heller W., Forkmann G.: *Biosynthesis of flavonoids*, Chapman & Hall, London 1993.
16. Stafford H.A.: *Annu Rev. Plant. Physiol.* 25, 459–486 (1974).
17. Cadenas E., Packej L.: *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker Inc., New York 2002.
18. Dufresne Ch.J., Farnworth E.R.: *J. Nutr. Biochem.* 12, 404–421 (2001).
19. Namiki M., Osawa T.: *Basic. Life. Sci.* 39, 131–142 (1986).
20. Balentine D. A. *Tea*. V: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
21. Obanda M., Owuor P.O.: *J. Sci. Food. Agric.* 69, 529–534 (1995).
22. Fernández P.L., Martín M.J., González A.G., Pablos F.: *Analyst.* 125, 421–425 (2000).
23. Perva-Uzunalić A., Škerget M., Knez Ž., Weinreich B., Otto F., Grüner S.: *Food Chem.* 96, 597–605 (2006).
24. Harbowy M., Balentine D.A.: *Crit. Rev. Plant. Sci.* 16, 415–480 (1997).
25. Ortembergová A.: *Mládne s antioxidanty*, Ivo Železný, Praha 2003.
26. Chen Y., Guo Z., Xiaoyu W., Changgui Q.: *J. Chromatogr. A* 1184, 191–219 (2008).
27. Luque de Castro D., Luque-García J.L.: *Acceleration and Automation of Solid Sample Treatment*, Elsevier, Amsterdam 2002.

28. Luque de Castro M.D., Priego-Capote F.: *J. Chromatogr. A* 1217, 2383–2389 (2010).
29. Astill C., Birch M.R., Dacombe C., Humphrey P.G., Martin P.T.: *J. Agr. Food Chem.* 49, 5340–5347 (2001).
30. Jaganyi D., Ndlovu T.: *Food Chem.* 75, 63–66 (2001).
31. Lakenbrink C., Lapczynski S., Maiwald B., Engelhardt U.H.: *J. Agr. Food Chem.* 48, 2848–2852 (2000).
32. Peterson J., Dwyer J., Jacques P., Rand W., Prior R., Chui K.: *J. Food Compos. Anal.* 17, 397–405 (2004).
33. Price W.E., Spitzer J.C.: *Food Chem.* 50, 19–23 (1994).
34. Sharma V., Gulati A., Ravindranath S.D.: *Food Chem.* 93, 141–148 (2005).
35. Spiro M., Jaganyi D.: *Food Chem.* 69, 119–124 (2000).
36. Zimmermann B.F., Gleichenhagen M.: *Food Chem.* 124, 1543–1548 (2011).
37. Šnita D. a kol.: *Chemické inženýrství I*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006.
38. Klouda P.: *Moderní analytické metody*, nakl. Pavel Klouda, Ostrava 2003.
39. Churáček J.: *Analytická separace látek*, Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1990.
40. Komatsu Y., Suematsu S., Hisanobu Y., Saigo H., Matsuda R., Hara K.: *Biosci. Biotech. Bioch.* 57, 907–910 (1993).
41. Wang H., Helliwell K.: *Food Chem.* 70, 337–344 (2000).
42. Yoshida Y., Kiso M., Goto T.: *Food Chem.* 67, 429–433 (1999).
43. Row K.H., Jin Y.: *Bioresource Technol.* 97, 790–793 (2006).
44. Ndiomu D.P., Simpson C.F.: *Anal. Chim. Acta* 213, 237–243 (1988).
45. Wang L., Weller C.L.: *Trends Food Sci. Tech.* 17, 300–312 (2006).
46. Luque de Castro M.D., Valcárcel M., Tena M.T.: *Analytical Supercritical Fluid Extraction*, Springer, Heidelberg 1994.
47. Luque de Castro M.D., Garcia-Ayuso L.E.: *Anal. Chim. Acta* 369, 1–10 (1998).
48. Zarnowski R., Suzuki Y.: *J. Food Compos. Anal.* 17, 649–664 (2004).
49. Borse B.B., Vijay Kumar H., Jagan Mohan Rao L.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 1750–1754 (2007).
50. Luque-Garcia J.L., Luque de Castro M.D.: *J. Chromatogr. A* 1034, 237–242 (2004).
51. Spigno G., Tramelli L., Marco de Faveri D.: *J. Food Eng.* 81, 200–208 (2007).
52. Cheong W.J., Park M.H., Kang G.W., Ko J.H., Bull Y.J.S.: *Korean Chem. Soc.* 26, 747–754 (2005).

53. Sihvonen M., Jarvenpaa E., Hietaniemi V., Huopalahti R.: Trends Food Sci. Tech. 10, 217–222 (1999).
54. Park H.S., Choi H.K., Lee S.J., Park K.W., Choi S.G., Kim K.H.: J. Supercrit. Fluid. 42, 205–211 (2007).
55. Kaufmann B., Christen P., Veuthey J. L.: Phytochem. Analysis 12, 327–331 (2001).
56. Pan X., Niu G., Liu H.: Chem. Eng. Process. 42, 129–133 (2003).
57. Dalluge J.J., Nelson B.C.: J. Chromatogr. A 881, 411–424 (2000).
58. Káš J., Kodíček M., Valentová O.: *Laboratorní techniky biochemie*, 1. vyd., Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006.
59. Churáček J.: *Analytická separace látek*, 1. vyd., Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1990.
60. <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/e231682c-3f66-483f-9117-960d321004a2.pdf?returnURL=/Search> staženo 18. 4. 2011.
61. Garaj J., Bustil D., Hladký Z.: *Analytiká chémie*, ALFA-SNTL, Bratislava 1987.
62. Churáček, J. a kol.: *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*, Academica, Praha 1993.
63. Holčapek M., Jandera P.: Chemické listy 92, 278–286 (1998).
64. Wang Z.Y., Khan W.A., Bickers D.R., Mukhtar H.: Carcinogenesis 10, 411 (1989).
65. Yang C.S.: Nature 389, 134 (1997).
66. Khan W.A., Wang Z.Y., Athar M., Bickers D.R., Mukhtar H.: Cancer Lett. 42, 7 (1988).
67. Kada T., Kaneko K., Matsuzaki S., Matsuzaki T., Hara Y.: Mutat. Res. 150, 127 (1985).
68. Sharma V., Gulati A., Ravindranath S. D., Kumar V.: J. Food Compos. Anal. 18, 583–594 (2005).
69. Hompesch R. W., García C. D., Weiss D. J., Vivanco J. M., Henry C. S.: Analyst 130, 694–700 (2005).
70. Sano M., Tabata M., Suzuki M., Degawa M., Miyase T., Yamamoto M. M.: Analyst 126, 816–820 (2001).

## **7. PŘÍLOHY**

Příloha 1: Kalibrační závislosti a strukturní vzorce standardů

Příloha 2: Chromatogram analýzy standardů

Příloha 3: Chromatogram analýzy Turecký zelený čaj sypaný – extrakt

Příloha 4: Chromatogram analýzy Nepal GFOP Kanyam oolong sypaný – extrakt

Příloha 5: Chromatogram analýzy Jemča zelený čaj sáčkový – výluh

Příloha 6: Chromatogram analýzy Lipton Yellow Label Tea odkofeinovaný – výluh

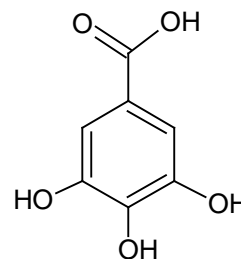
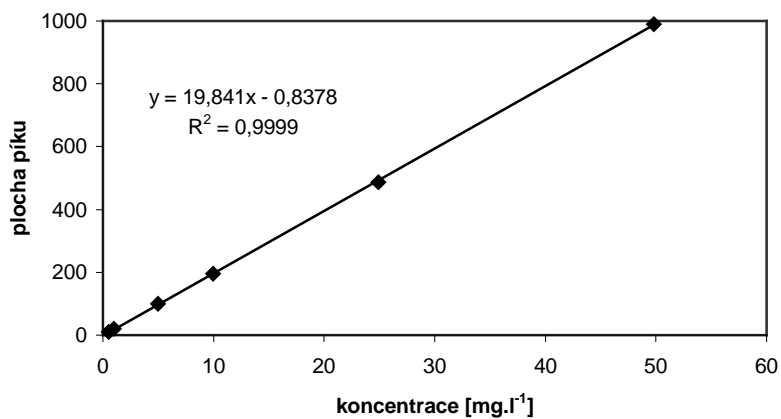
Příloha 7: Koncentrace stanovených látek ve všech extraktech

Příloha 8: Koncentrace stanovených látek ve všech nápojích

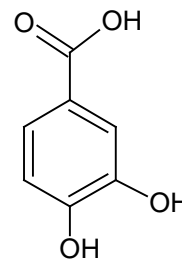
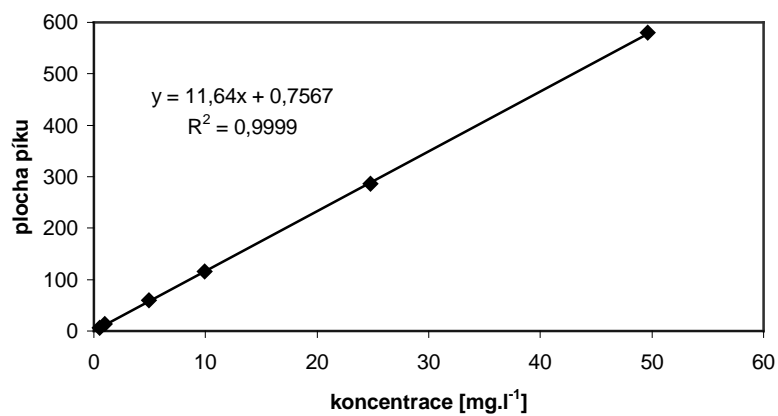
Příloha 9: Procentické srovnání obsahu látek v extraktu a ve výluhu

## Příloha 1: Kalibrační závislosti a strukturální vzorce standardů

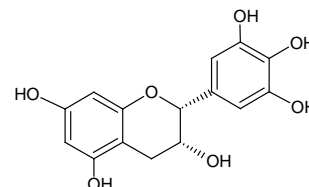
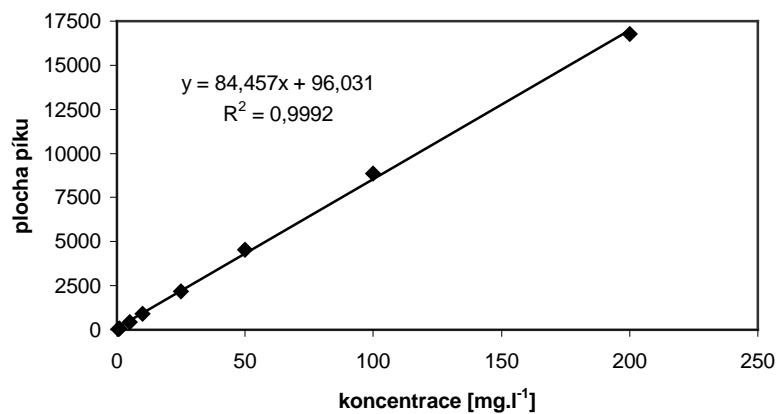
### 1) kalibrační závislost kyseliny gallové



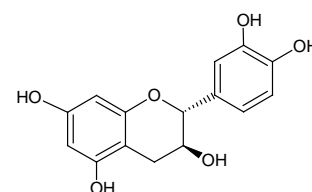
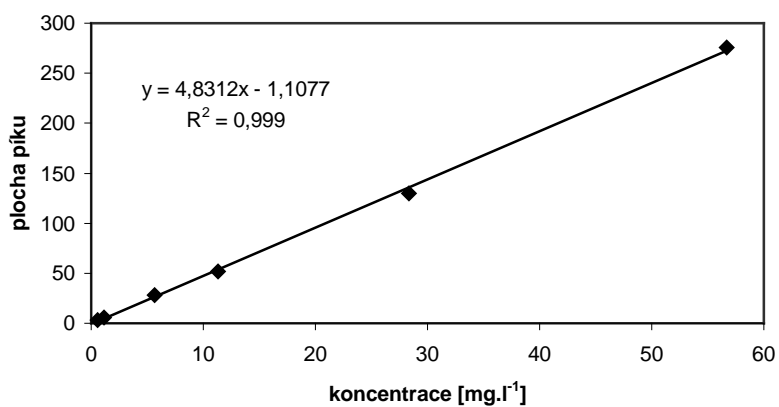
### 2) kalibrační závislost kyseliny protokatechové



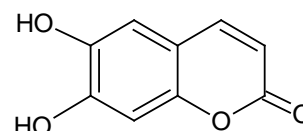
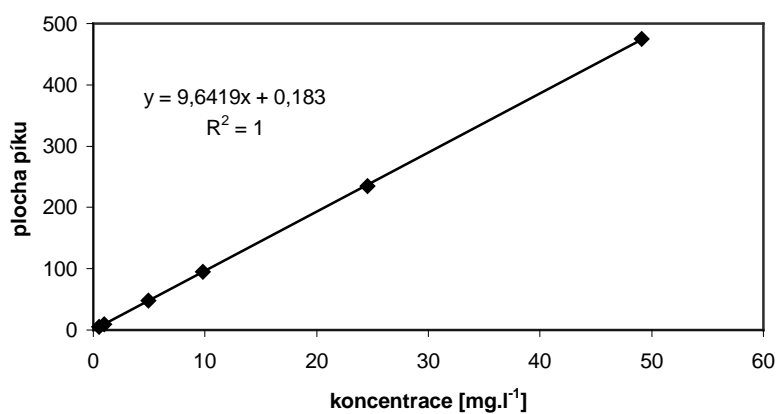
### 3) kalibrační závislost epigallokatechinu



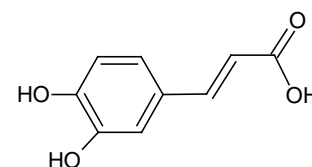
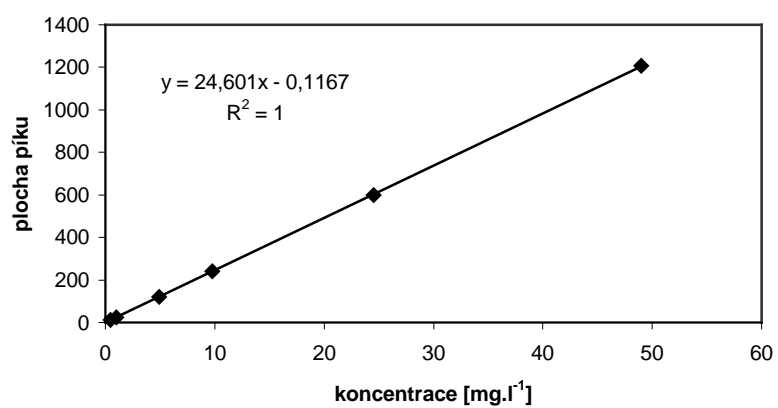
#### 4) kalibrační závislost katechinu



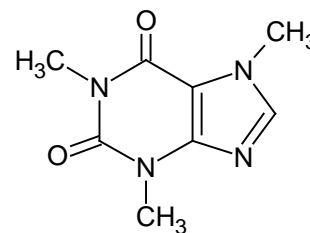
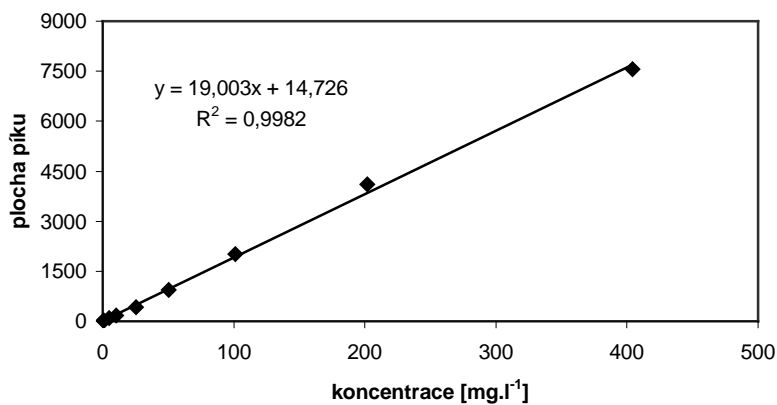
#### 5) kalibrační závislost eskuletinu



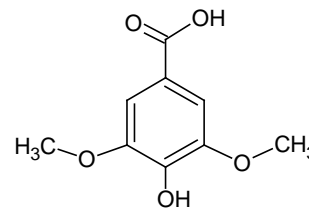
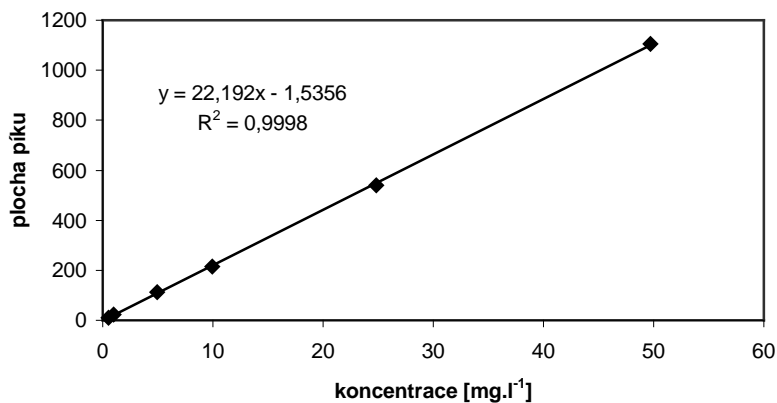
#### 6) kalibrační závislost kyseliny kávové



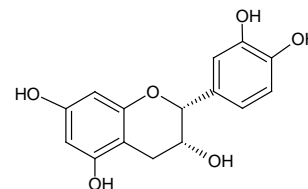
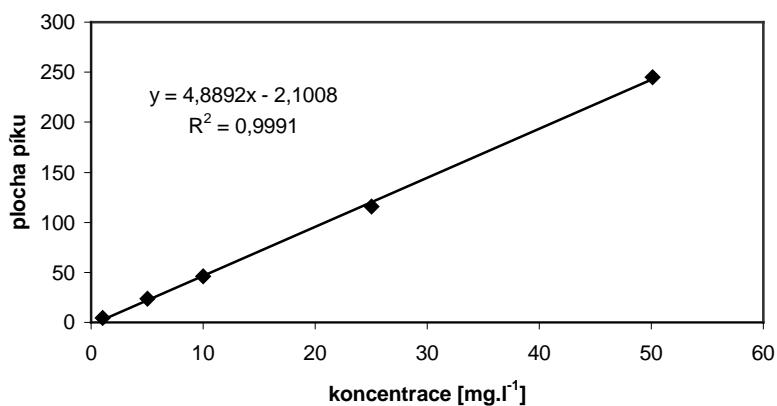
### 7) kalibrační závislost kofeinu



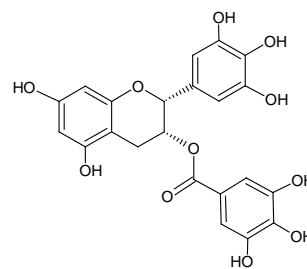
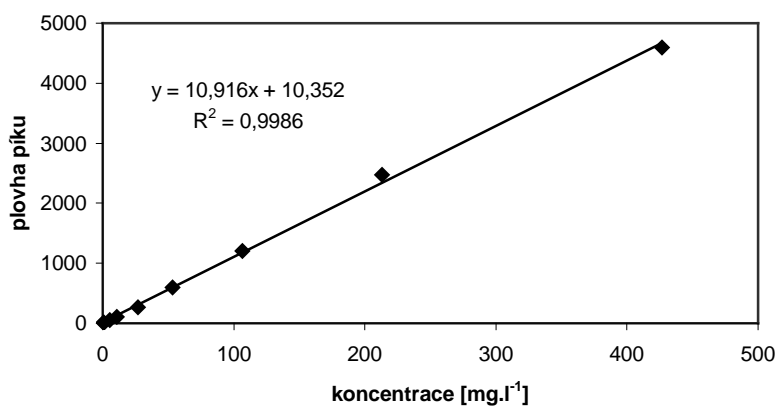
### 8) kalibrační závislost kyseliny syringové



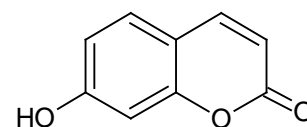
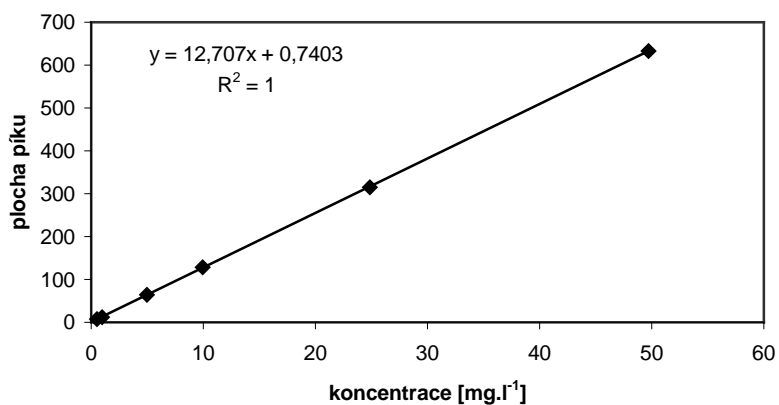
### 9) kalibrační závislost epikatechinu



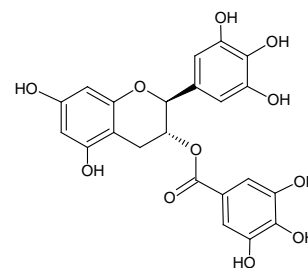
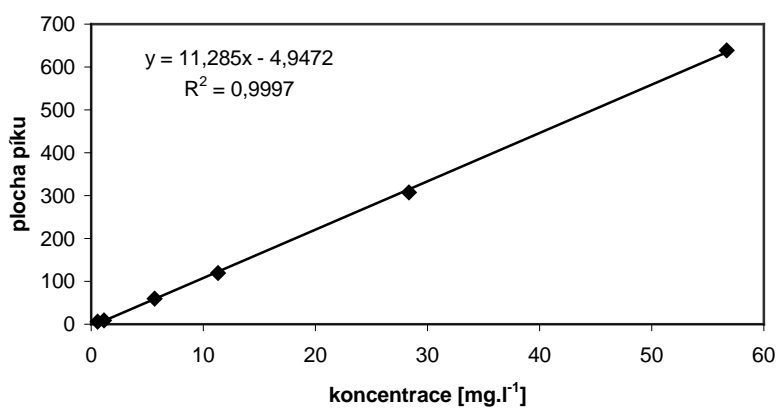
### 10) kalibrační závislost epigallokatechin gallátu



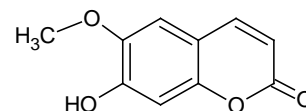
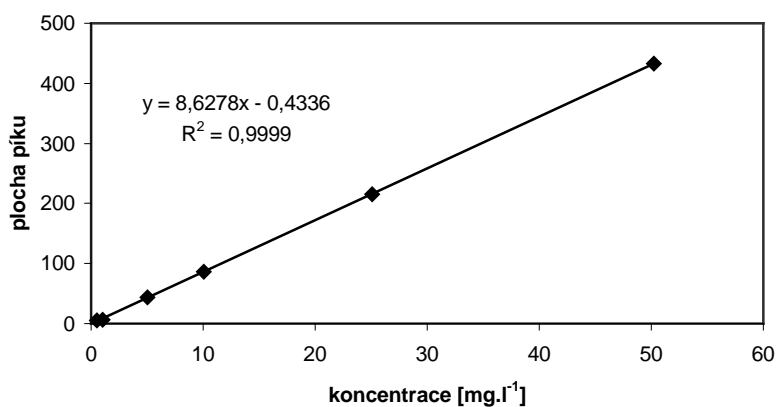
### 11) kalibrační závislost umbelliferonu



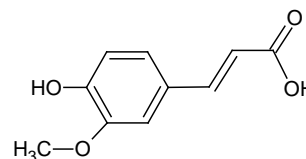
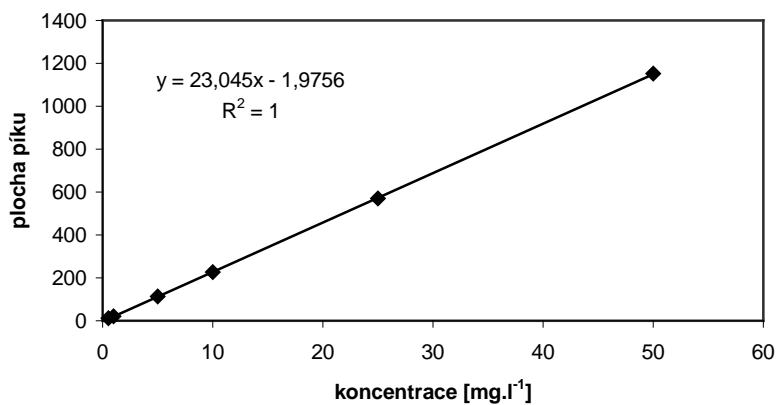
### 12) kalibrační závislost gallokatechin gallátu



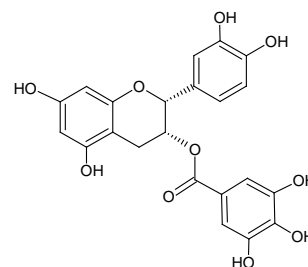
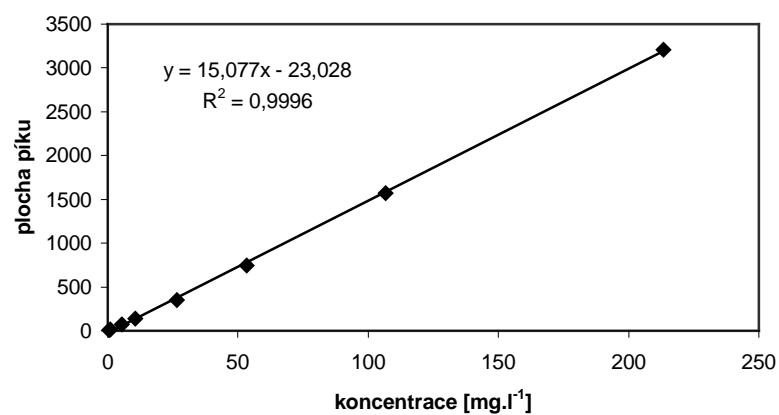
### 13) kalibrační závislost skopoletinu



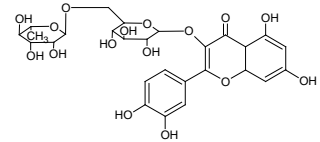
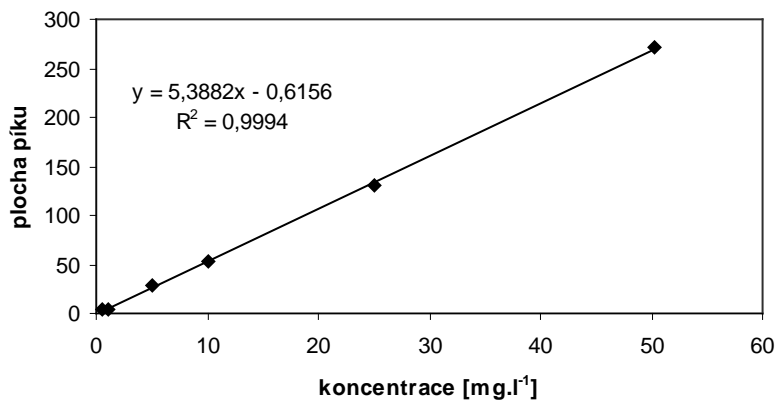
### 14) kalibrační závislost kyseliny ferulové



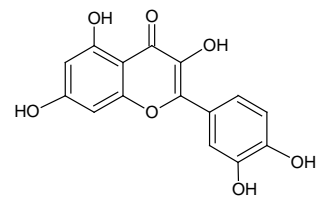
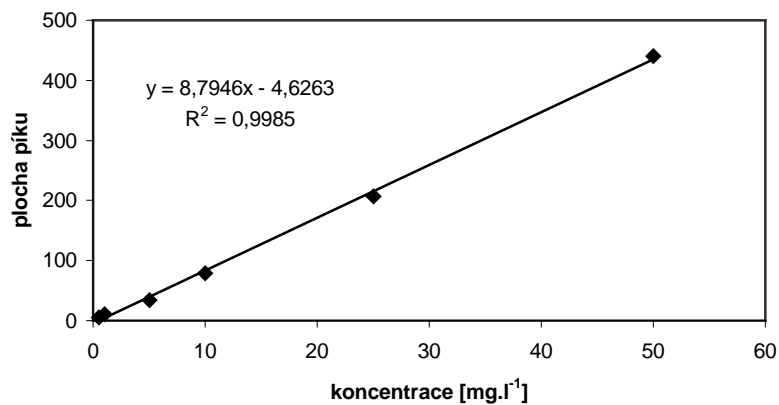
### 15) kalibrační závislost epikatechin gallátu



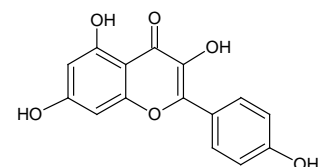
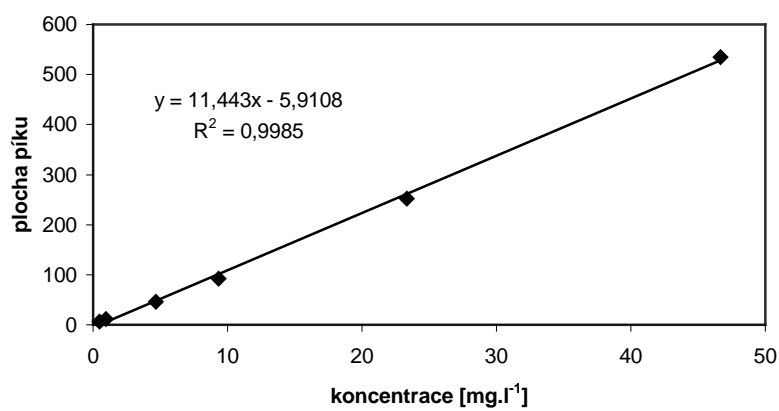
### 16) kalibrační závislost rutinu



### 17) kalibrační závislost kvercetin

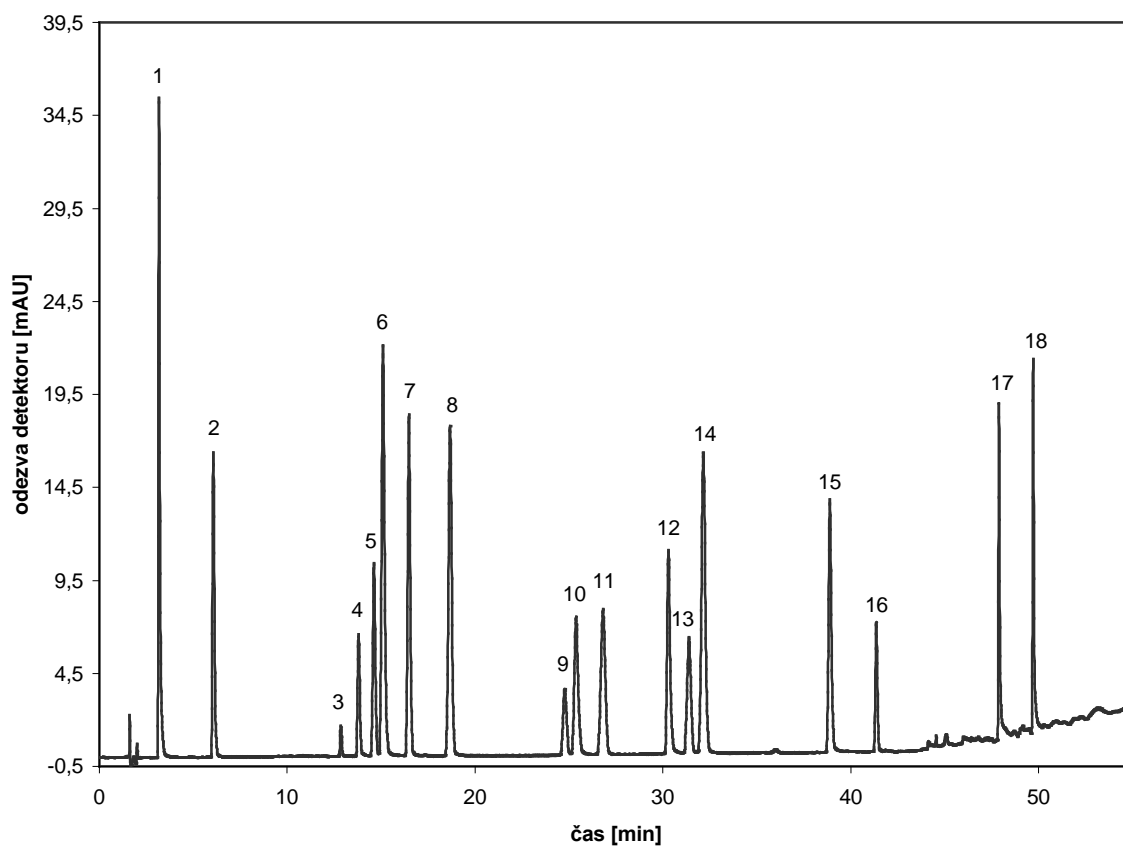


### 18) kalibrační závislost kemferolu



## Příloha 2: Chromatogram analýzy standardů

$\lambda = 280 \text{ nm}$

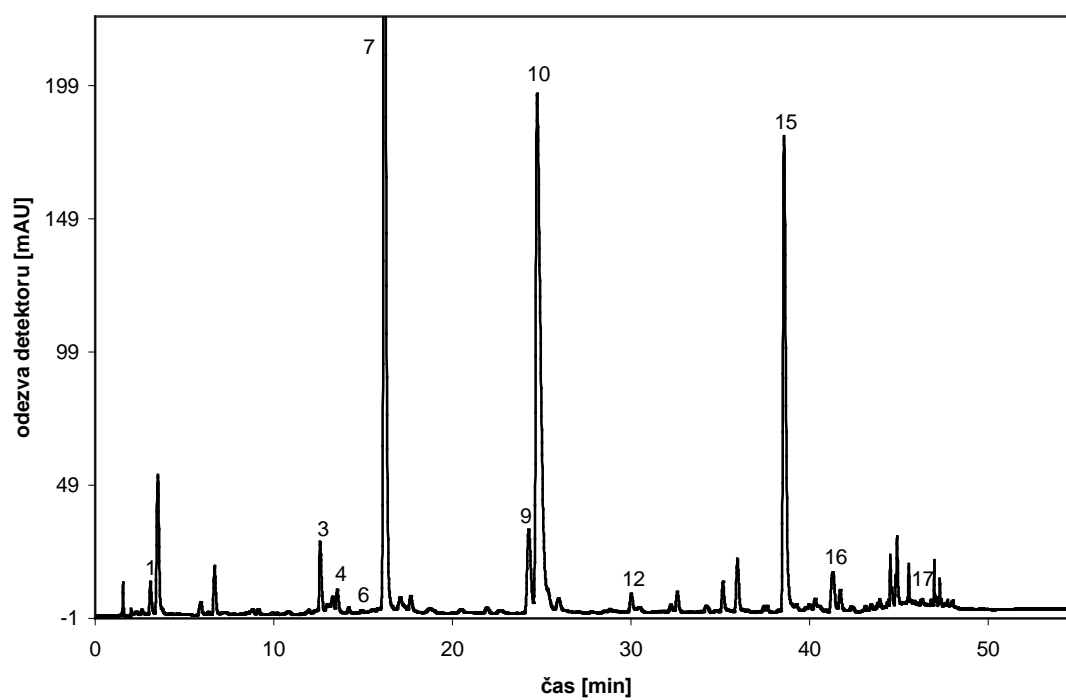


1 – kyselina gallová  
2 – kyselina protokatechová  
3 – EGC  
4 – katechin  
5 – eskuletin  
6 – kyselina kávová  
7 – kofein  
8 – kyselina syringová  
9 – EC

10 – EGCG  
11 – umbelliferon  
12 – GCG  
13 – scopoletin  
14 – kyselina ferulová  
15 – ECG  
16 – rutin  
17 – kvercetin  
18 – kemferol

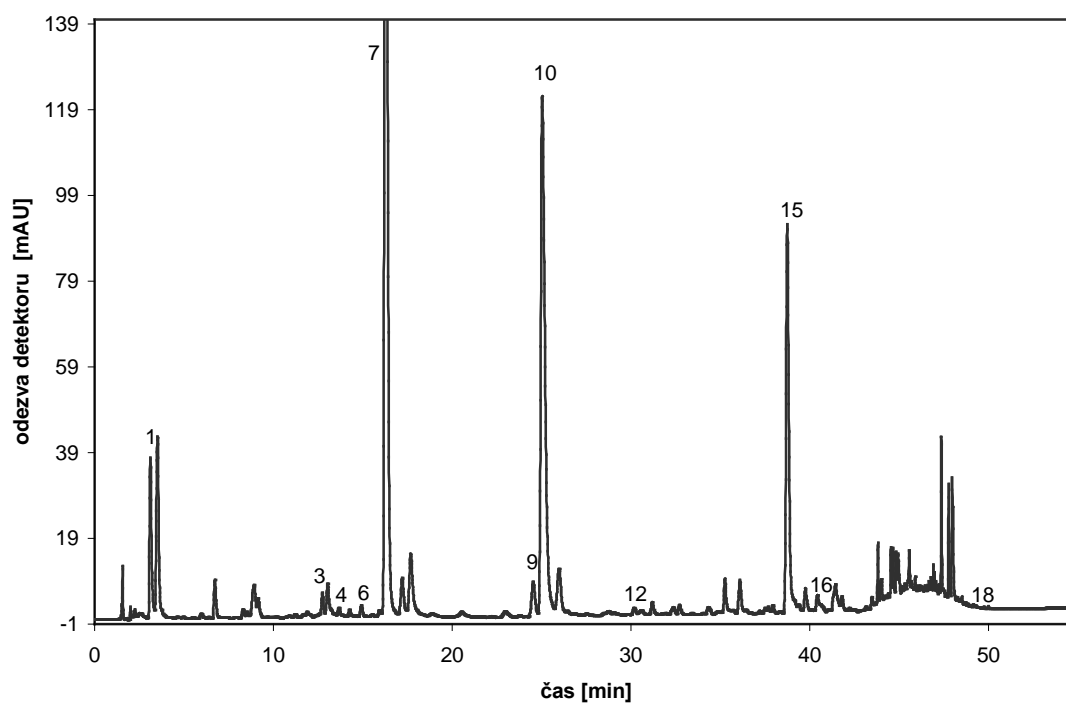
### Příloha 3: Chromatogram analýzy Turecký zelený čaj – extrakt

$\lambda = 280 \text{ nm}$



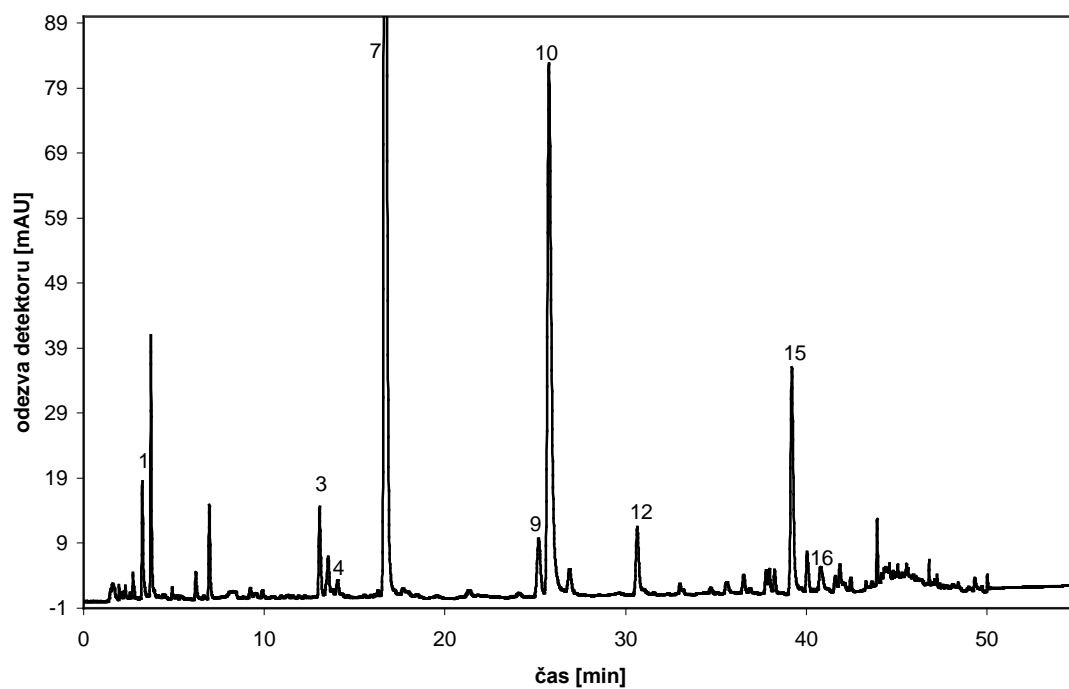
### Příloha 4: Chromatogram analýzy Nepal GFOP Kanyam oolong sypaný – extrakt

$\lambda = 280 \text{ nm}$



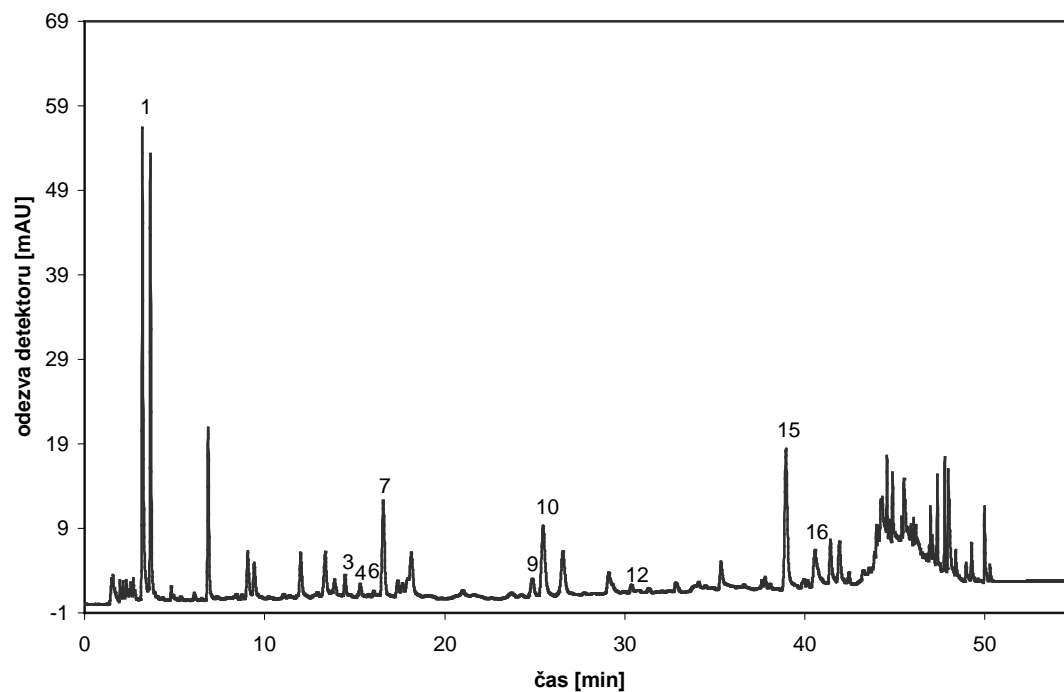
### Příloha 5: Chromatogram analýzy Jemča zelený čaj sáčkový – výluh

$\lambda = 280 \text{ nm}$



### Příloha 6: Chromatogram analýzy Lipton Yellow Label Tea odkofeinovaný – výluh

$\lambda = 280 \text{ nm}$



**Příloha 7: Koncentrace stanovených látek ve všech extraktech**

Č.	Čaj	Látka [mg.g <sup>-1</sup> ]											
		kyselina gallová	EGC	C	kyselina kávová	kofein	EC	EGCG	GCG	ECG	rutin	kvercetin	kemferol
1	Himalayan zelený čaj sypaný	1,37±0,06	22,54±0,54	0,93±0,03	0,28±0,02	34,98±1,24	5,71±0,04	69,51±2,04	1,11±0,09	15,82±0,46	0,54±0,15	< LOD	0,08±0,01
2	New Top Mist zelený čaj sypaný	0,76±0,04	20,35±0,47	0,76±0,07	0,03±0,01	34,05±0,62	6,36±0,05	66,24±0,86	1,21±0,01	16,86±0,22	0,65±0,06	< LOD	< LOD
3	Turecký zelený čaj sypaný	0,98±0,23	30,67±4,62	2,95±0,34	0,10±0,05	31,61±4,48	14,10±0,82	54,87±6,23	1,36±0,47	21,81±1,87	1,88±0,41	0,22±0,01	< LOD
4	Pai Mu Tan bílý čaj sypaný	3,13±0,02	4,01±0,04	0,28±0,07	0,03±0,01	42,24±1,26	1,71±0,04	49,84±1,46	0,58±0,18	16,83±0,86	0,25±0,02	< LOD	< LOD
5	Lipton Yellow Label Tea černý čaj odkofein. sáč.	2,11±0,01	0,70±0,01	0,35±0,01	0,06±0,01	0,40±0,01	1,17±0,06	3,92±0,02	0,14±0,01	3,86±0,01	1,46±0,12	< LOD	0,13±0,01
6	Twinings Earl Grey Tea černý čaj odkofein. sáč.	2,84±0,01	0,32±0,01	0,58±0,01	< LOD	0,65±0,01	1,81±0,03	1,71±0,03	< LOD	3,58±0,01	1,42±0,02	< LOD	< LOD
7	Jemča zelený čaj sáčkový	0,97±0,04	21,95±0,12	0,68±0,10	< LOD	27,00±0,91	5,46±0,14	47,79±1,63	1,38±0,22	10,33±0,35	0,74±0,05	< LOD	< LOD
8	Pickwick zelený čaj sáčkový	0,61±0,22	21,07±1,09	2,73±0,05	< LOD	21,13±0,24	12,33±0,68	37,22±2,02	0,64±0,10	21,92±1,48	1,65±0,07	0,13±0,02	< LOD
9	Ceylon Teač černý čaj sypaný	3,09±0,45	0,73±0,22	0,24±0,03	< LOD	26,43±2,95	0,96±0,04	4,66±0,22	0,14±0,01	4,67±0,24	0,55±0,08	< LOD	< LOD
10	Nepal GFOP Kanyam oolong sypaný	2,05±0,02	5,22±0,11	0,44±0,01	< LOD	27,30±0,25	3,12±0,02	25,33±0,43	0,23±0,01	9,55±0,15	0,60±0,04	< LOD	0,11±0,01
11	Nepal Himalayan Shangrilla oolong sypaný	1,54±0,17	10,14±0,22	0,56±0,04	< LOD	24,34±1,33	5,24±0,25	33,08±1,05	0,51±0,02	11,48±0,31	0,59±0,05	< LOD	0,11±0,01
12	E Mei Ruizi zelený čaj sypaný	1,76±0,37	23,13±3,40	1,12±0,10	0,06±0,01	39,18±1,52	6,36±0,82	70,58±9,81	2,74±1,17	14,12±1,37	0,79±0,09	< LOD	0,16±0,04
13	Kanchaam Valley zelený čaj sypaný	1,25±0,07	10,78±0,47	0,86±0,08	0,07±0,01	33,40±1,04	4,44±0,28	45,65±1,05	0,53±0,04	13,62±0,32	0,54±0,05	< LOD	< LOD
14	Shree Antu Nepál zelený čaj sypaný	1,75±0,01	5,60±0,03	0,41±0,03	0,14±0,01	29,25±0,14	2,32±0,02	40,44±1,17	0,21±0,03	12,28±0,47	0,51±0,05	< LOD	< LOD
15	Loyd Tea zelený čaj sáčkový	0,93±0,01	23,68±0,27	< LOD	0,03±0,01	25,40±0,14	6,19±0,13	51,53±0,61	1,65±0,04	11,48±0,09	0,56±0,03	< LOD	< LOD

< LOD... pod mezí detekce

### Příloha 8: Koncentrace stanovených látek ve všech nápojích

Č.	Čaj	Látka [mg.g <sup>-1</sup> ]											
		kyselina gallová	EGC	C	kyselina kávová	kofein	EC	EGCG	GCG	ECG	rutin	kvercetin	kemferol
1	Himalayan zelený čaj sypaný	0,97±0,07	4,48±0,45	0,54±0,04	0,17±0,01	25,06±0,68	2,28±0,17	10,94±0,59	1,50±0,01	4,40±0,30	0,10±0,01	< LOD	0,08±0,01
2	New Top Mist zelený čaj sypaný	0,58±0,02	5,18±1,15	0,64±0,01	< LOD	23,69±0,14	2,95±0,16	13,18±3,11	1,22±0,09	3,83±0,30	0,18±0,02	< LOD	< LOD
3	Turecký zelený čaj sypaný	0,34±0,04	10,10±0,45	1,38±0,03	0,06±0,01	19,68±0,33	6,00±0,24	9,79±0,59	1,11±0,03	4,79±0,33	1,14±0,01	0,22±0,01	< LOD
4	Pai Mu Tan bílý čaj sypaný	1,77±0,05	0,46±0,02	< LOD	< LOD	30,65±0,60	1,05±0,04	5,21±0,17	0,83±0,02	2,86±0,42	0,09±0,01	< LOD	< LOD
5	Lipton Yellow Label Tea černý čaj odkofein. sáč.	2,61±0,31	0,45±0,02	0,56±0,01	0,09±0,01	0,93±0,03	1,04±0,01	0,94±0,93	0,16±0,07	2,30±0,28	1,42±0,08	< LOD	0,13±0,01
6	Twinings Earl Grey Tea černý čaj odkofein. sáč.	3,42±0,33	< LOD	0,69±0,08	0,04±0,01	0,75±0,14	0,22±0,01	0,70±0,10	< LOD	2,72±0,57	1,43±0,02	< LOD	< LOD
7	Jemča zelený čaj sáčkový	0,95±0,01	16,09±0,61	0,75±0,01	< LOD	22,91±3,04	4,43±0,33	19,55±2,53	1,78±0,23	4,50±0,56	0,66±0,07	< LOD	< LOD
8	Pickwick zelený čaj sáčkový	0,44±0,03	16,25±2,62	2,46±0,30	0,05±0,01	18,67±1,85	9,52±1,12	15,20±3,25	1,29±0,15	7,66±1,01	1,42±0,13	0,13±0,02	< LOD
9	Ceylon Teač černý čaj sypaný	2,80±0,05	< LOD	0,27±0,04	0,08±0,01	19,95±0,35	0,55±0,01	1,03±0,24	0,28±0,05	1,81±0,29	0,49±0,04	< LOD	< LOD
10	Nepal GFOP Kanyam oolong sypaný	1,45±0,05	1,00±0,21	0,24±0,03	0,07±0,01	18,10±0,86	1,19±0,09	3,36±0,24	0,43±0,02	2,40±0,16	0,20±0,02	< LOD	0,11±0,01
11	Nepal Himalayan Shangrilla oolong sypaný	1,13±0,02	1,73±0,08	0,40±0,01	0,08±0,01	16,63±0,24	2,00±0,17	3,48±0,17	0,51±0,04	2,17±0,06	0,19±0,02	< LOD	0,11±0,01
12	E Mei Ruizi zelený čaj sypaný	0,78±0,04	10,63±0,96	0,68±0,01	0,08±0,01	20,52±1,17	1,95±0,10	19,78±1,84	1,31±0,08	3,10±0,03	0,20±0,01	< LOD	0,16±0,04
13	Kanchaam Valley zelený čaj sypaný	1,39±0,12	3,77±0,28	0,44±0,02	0,06±0,01	25,02±0,77	1,84±0,06	11,41±0,32	1,25±0,06	3,64±0,34	0,31±0,02	< LOD	< LOD
14	Shree Antu Nepál zelený čaj sypaný	1,52±0,04	1,64±0,02	0,24±0,01	0,08±0,01	20,94±0,22	1,03±0,09	8,08±0,23	0,92±0,09	3,40±0,25	0,19±0,01	< LOD	< LOD
15	Loyd Tea zelený čaj sáčkový	0,69±0,03	7,68±0,19	0,68±0,04	< LOD	14,09±0,32	2,78±0,07	7,77±0,19	1,18±0,02	2,52±0,10	0,18±0,01	< LOD	< LOD

< LOD... pod mezí detekce

**Příloha 9: Procentické srovnání obsahu látek v extraktu a ve výluhu**

Č.	Čaj	Látka [%]											
		kyselina gallová	EGC	C	kyselina kávová	kofein	EC	EGCG	GCG	ECG	rutin	kvercetin	kemferol
1	Himalayan zelený čaj sypaný	71	20	58	61	72	40	16	*134	28	19	#	#
2	New Top Mist zelený čaj sypaný	76	25	84	#	70	46	20	*101	23	28	#	#
3	Turecký zelený čaj sypaný	35	33	47	63	62	43	18	82	22	61	#	#
4	Pai Mu Tan bílý čaj sypaný	56	11	#	#	73	61	10	*143	17	38	#	#
5	Lipton Yellow Label Tea černý čaj odkofein. sáč.	*124	65	*161	*140	*234	89	24	*112	60	97	#	#
6	Twinings Earl Grey Tea černý čaj odkofein. sáč.	*120	#	*119	#	*116	12	41	#	76	*101	#	#
7	Jemča zelený čaj sáčkový	99	73	*110	#	85	81	41	*128	44	88	#	#
8	Pickwick zelený čaj sáčkový	73	77	90	#	88	77	41	*202	35	86	#	#
9	Ceylon Teač černý čaj sypaný	91	#	*113	#	75	57	22	*197	39	90	#	#
10	Nepal GFOP Kanyam oolong sypaný	71	19	55	#	66	38	13	*186	25	34	#	#
11	Nepal Himalayan Shangrilla oolong sypaný	73	17	72	#	68	38	11	*100	19	32	#	#
12	E Mei Ruizi zelený čaj sypaný	44	46	61	*136	52	31	28	48	22	26	#	#
13	Kanchaam Valley zelený čaj sypaný	*111	35	51	83	75	41	25	*234	27	57	#	#
14	Shree Antu Nepál zelený čaj sypaný	87	29	60	58	72	44	20	*447	28	38	#	#
15	Loyd Tea zelený čaj sáčkový	73	32	#	#	55	45	15	72	22	32	#	#
<b>Průměr</b>		<b>71</b>	<b>37</b>	<b>64</b>	<b>66</b>	<b>70</b>	<b>50</b>	<b>23</b>	<b>67</b>	<b>32</b>	<b>52</b>	<b>#</b>	<b>#</b>

\* vyšší koncentrace ve výluhu, # nelze stanovit, Průměr je vypočten z hodnot nepřesahujících 100 %.