

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Fakulta přírodovědecká**

**Katedra analytické chemie**

**ÚPRAVA VZORKŮ ČAJOVÝCH EXTRAKTŮ  
ZÍSKANÝCH METODOU ASE**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor práce:

Bc. Marie Králová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Pavlína Baizová, Ph.D.

**Olomouc 2014**

# Souhrn

V teoretické části této diplomové práce je charakterizován čaj, jeho původ, pěstování, zpracování, dělení a zároveň je popsáno chemické složení čaje. V další části jsou pak popsány některé extrakční techniky a čištění získaných extraktů. Teoretická část je také věnována metodám, kterými lze analyzovat složky obsažené v čaji. V poslední části se pojednává o antioxidační aktivitě čaje a jejím stanovení.

Praktická část je zaměřena na porovnání účinnosti metod čištění extraktů čaje. Zároveň také byla porovnána čistota a kvalita čaje z určitých pěstitelských oblastí. Pro extrakci vzorků čaje byla použita akcelerovaná extrakce rozpouštědlem (ASE). Jako rozpouštědlo byl použit methanol. Před koncovou analýzou bylo provedeno čištění extraktů různými způsoby. Následně přečištěné extrakty a získané vzorky byly proměřeny plynovou chromatografií. Dále byla proměřena antioxidační aktivita vzorků čaje, za použití průtokové coulometrie.

**Klíčová slova:** Čaj  
Polyfenoly  
Akcelerovaná extrakce rozpouštědlem  
Chlorofyl  
Antioxidační aktivita

# Summary

The theory element of my diploma thesis surrounds the characteristics of Tea. My work concerns its historical background, the types of cultivation, its manufacture and sorting and it will also describe the chemical composition of Tea. Another part of the theory will describe some techniques for extracting and the cleaning of those extracts. The whole theoretical part is dedicated to the methodologies which are used for analysing the ingredients found in the tea. In the last part of the theory element I will be highlighting the anti-oxidation activities of the tea and its composition.

The practical element concerns the comparison of the effectiveness of each method used to clean the extracts. At the same time I will also compare the purity and quality of the tea grown in different agricultural regions. To extract the samples of tea, I used an acceleration extraction method using solvents (ASE). The solvent used was Methanol. Before the final analysis, all extracts were cleaned using a variety of methods. Consecutive cleaning of the sample extracts was measured by gas chromatography. After this, the anti-oxidation activity, of the samples, was measured by using flow coulometry.

**Keywords:** Tea

Polyphenols

Accelerated Solvent Extraction

Chlorophyll

Antioxidant activity

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce bude prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....

Vlastnoruční podpis

## **Poděkování**

Děkuji své vedoucí diplomové práce RNDr. Pavlíně Baizové, Ph.D. za její cenné rady, připomínky, čas, ochotu a obětavost, které mi během mé práce věnovala. Poděkování rovněž patří Doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za jeho pomoc a rady při GC analýze vzorků.

Poděkovat bych také chtěla mé rodině za pochopení, podporu a trpělivost po celou dobu mého studia.

.....

Podpis

# Obsah

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| <b>1.</b>   | <b>Úvod</b> .....                            | <b>1</b>  |
| <b>2.</b>   | <b>Teoretická část</b> .....                 | <b>2</b>  |
| <b>2.1.</b> | <b>Historie čaje</b> .....                   | <b>2</b>  |
| <b>2.2.</b> | <b>Čajovník, pěstování</b> .....             | <b>3</b>  |
| 2.2.1.      | Oblasti pěstování čaje .....                 | 4         |
| 2.2.2.      | Zpracování .....                             | 6         |
| 2.2.3.      | Druhy čaje podle zpracování .....            | 6         |
| 2.2.3.1.    | Zelený čaj .....                             | 7         |
| 2.2.3.2.    | Černý čaj .....                              | 7         |
| 2.2.3.3.    | Oolong .....                                 | 7         |
| 2.2.3.4.    | Bílý čaj .....                               | 8         |
| 2.2.3.5.    | Pchu-er .....                                | 8         |
| 2.2.4.      | Kvalita čaje .....                           | 8         |
| 2.2.5.      | Chemické složení čaje .....                  | 9         |
| 2.2.5.1.    | Polyfenoly .....                             | 9         |
| 2.2.5.2.    | Katechiny .....                              | 9         |
| 2.2.5.3.    | Flavonoly .....                              | 11        |
| 2.2.5.4.    | Theaflaviny a thearubiginy .....             | 11        |
| 2.2.5.5.    | Kofein .....                                 | 12        |
| 2.2.5.6.    | Dusíkaté látky .....                         | 12        |
| 2.2.5.7.    | Theanin .....                                | 12        |
| 2.2.5.8.    | Karotenoidy a chlorofyl .....                | 13        |
| 2.2.5.9.    | Minerály .....                               | 14        |
| 2.2.5.10.   | Vitamíny .....                               | 14        |
| <b>2.3.</b> | <b>Metody extrakce</b> .....                 | <b>14</b> |
| 2.3.1.      | Zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE) ..... | 15        |
| 2.3.2.      | Superkritická fluidní extrakce (SFE) .....   | 16        |
| 2.3.3.      | Ultrazvuková extrakce (USE) .....            | 18        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2.4. Čištění a frakcionace čajových extraktů</b>                                    | <b>18</b> |
| 2.4.1. Extrakce kapalina-kapalina (LLE)  | 19        |
| 2.4.2. Extrakce na tuhé fázi (SPE)   | 19        |
| 2.4.3. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)  | 20        |
| 2.4.4. Sloupcová chromatografie (CG)   | 20        |
| <b>2.5. Metody stanovení a identifikace katechinů obsažených v čajových extraktech</b> | <b>20</b> |
| 2.5.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)                                   | 20        |
| 2.5.2. Plynová chromatografie (GC)   | 21        |
| 2.5.3. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)  | 22        |
| <b>2.6. Antioxidační aktivita</b>  | <b>23</b> |
| 2.6.1. Metody stanovení antioxidační aktivity  | 23        |
| 2.6.1.1. Metody založené na eliminaci radikálů   | 24        |
| 2.6.1.2. Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek                       | 25        |
| <b>3. Experimentální část</b>  | <b>26</b> |
| <b>3.1. Použité chemikálie a přístroje</b>   | <b>26</b> |
| 3.1.1. Použité chemikálie  | 26        |
| 3.1.2. Použité přístroje   | 26        |
| 3.1.3. Vzorky čaje   | 28        |
| <b>3.2. Stanovení antioxidační aktivity</b>  | <b>28</b> |
| 3.2.1. Příprava elektrolytu  | 28        |
| 3.2.2. Zásobní roztok askorbové kyseliny   | 28        |
| 3.2.3. Příprava vzorků čaje  | 28        |
| 3.2.4. Průtoková coulometrie   | 29        |
| 3.2.5. Výsledky a diskuze  | 29        |
| <b>3.3. Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu chlorofylu</b>                  | <b>33</b> |
| 3.3.1. Výsledky a diskuze  | 33        |
| <b>3.4. Stanovení účinnosti úpravy vzorků čajových extraktů</b>                        | <b>35</b> |
| 3.4.1. Příprava extraktů   | 35        |
| 3.4.2. Vytřepání extraktů v diethyletheru  | 35        |
| 3.4.3. Vytřepání extraktů v hexanu   | 36        |
| 3.4.4. Vytřepání v heptanu   | 36        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.4.5. Přechlštění extraktů za pomoci tetrachlormethanu ..... | 36        |
| 3.4.6. Derivatizační proces .....                             | 36        |
| 3.4.7. Výsledky a diskuze .....                               | 37        |
| <b>4. Závěr .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>5. Použitá literatura .....</b>                            | <b>51</b> |



# 1. Úvod

Čaj je jedním z nejpoblárnějších a široce konzumovaným nápojem na světě, díky jeho osvěžující chuti, atraktivní vůni, ale také díky určité dávce zdraví. V dnešní době, v mnoha studiích bylo prokázáno, že pití čaje může snížit riziko rakoviny a kardiovaskulárního onemocnění. Kromě toho byly hlášeny další biologické funkce čaje, jako je protizánětlivé, protialergické a protiobezitní. Tyto příznivé účinky jsou připisovány přítomnosti sloučenin, jako jsou polyfenoly, aminokyseliny, vitamíny, sacharidy a mnoho dalších.

Spotřebitelům je potřeba nabídnout jednotnou úroveň kvality výrobků. Proto k tomuto dosažení se čajové lístky, jejich extrakty a samotné spotřebitelské výrobky musí standardizovat a neustále monitorovat. A proto je kladena velká pozornost na vývoj analytických metod pro stanovení složení čajů.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Historie čaje

O objevení čaje se vypráví řada legend. Jedna legenda vypráví o čínském císaři Šen-ningovi (2737 – 2697 př. n. l.), o kterém bylo známo, že pil jen převařenou vodu. Jednoho dne zanesl vítr do jeho misky lístky čajovníku, voda tak získala zlatohnědou barvu. Císař tekutinu ochutnal a byl překvapen nejen osvěžující chutí, ale i povzbuzujícími účinky. Od onoho dne pil tento nápoj denně.

Další legenda pochází z Japonska. Hlasatele buddhismu Bódhidharma (495 n. l.) během meditace přemohla únava a usnul. Po probuzení byl velmi rozzlobený. Aby měl jistotu, že již nikdy nepodlehne únavě, odřízl si obě oční víčka a zahodil. Víčka do země zapustila kořeny, a vyrostla v keře se zelenými listy. Jakmile mnich ochutnal tyto lístky, únava jej okamžitě opustila a cítil se jako by zázrakem posílený.

Indická legenda věří, že poutníka Darmu, který složil slib, nespát na své pouti, ale raději meditovat, po pěti letech přepadla únava, a tak se šel projít mezi čajovníky. Jakmile rozžvýkal jejich lístky, únava jej opustila a on strávil zbývající roky beze spánku.

Legendy jsou různé a o jejich pravdivosti se vedou vždy spory. Lze jen velmi těžko určit, kdy a kde se čaj začal pít, ale Čína je považována za zemi původu čaje. Pro Číňany byl čaj nejen lékem při únavě, bolesti hlavy, revmatismu nebo při onemocnění močového měchýře, ale také potravina a obětina. Čajový monopol si Číňané udržovali až do let mezi 520 a 800 n. l., kdy byl čaj přinesen buddhistickými mnichy do Japonska. V kláštřích byl mnichy používán při meditacích jako stimulační prostředek. Toto drahocenné zboží bylo zprvu určeno výhradně horní společenské vrstvě, až kolem 12. století se čaj rozšířil mezi ostatní lid.

Do Evropy se zprávy o pěstování a účincích čaje dostaly prostřednictvím námořníků a misionářů v 16. století. První obchodování v Evropě proběhlo roku 1610, kdy čaj se dostal do Amsterdamu. Obchodování s čajem se rychle rozšířilo z Nizozemska do dalších měst a tím do celého světa.<sup>1</sup>

## 2.2. Čajovník, pěstování

Čaj vzniká zpracováním listů čajovníků. Čajovník je rostlina z rodu *Camellia*, stále zelená s květy připomínající květy jabloně. Byly definovány 4 odrůdy čajovníků, ale druhů čaje je nespočetně. Dle botaniků se rozlišují dva druhy.

Čínská odrůda *Camellia sinensis* (Obr. 1) je stálezelený keř s malými, dlouhými a spíše tužšími listy. Dorůstá do výšky 3-4 metrů, rostoucí v subtropických oblastech. Je odolná i vůči mrazům ve vysokých výškách.

Stromového vzrůstu je rostlina *Camellia assamica* (Obr. 2), vyskytující se v teplém podnebí, dorůstá 15-20 metrů. Od čínské odrůdy se liší tvarem listů, kvete méně a obsahuje větší množství tanninu a extrahovatelných látek. Listy čajovníků jsou dlouhé, mohou dosahovat až 35cm, vždy zelené, lesklé dospělé listy jsou tlusté, hladké a kožnaté, s krátkým řapíkem. Mladší lístky jsou porostlé jemnými chloupky.

Čajovníky se rozmnožovaly vyséváním semen, nebo vysazováním odnoží, v dnešní době se preferuje vysazování sazenic, po řízkování matečných rostlin. Čajové lístky se mohou sklízet až po třech letech opakovaného seřezávání, kdy má čajovník konečný tvar.

Sklízení čaje je náročná ruční práce. Denně se sklídí 30 až 35 kilogramů čerstvých listů čaje. U některých druhů se sklízí tři listy (pupen a dva listy) u jiných se sklízí čtyři listy. Při sklízení se dbá, aby se nepoškodily řapíky lístků. Čaje se sklízí čtyřikrát až pětkrát do roka.

Doba sklizní se dělí následovně:

- First Flush: Sklizeň v době od března až do poloviny dubna.
- In between: Sklizeň aromatických čajů od dubna do poloviny května.
- Second Flush: Čaj se silně kořeněnou vůní se sklízí od května až do června.
- Autumnal (podzimní): Sklizeň méně kvalitního čaje, ale s báječnou vůní probíhá v říjnu a listopadu.<sup>1,2,5</sup>



**Obr. 1** *Camellia sinensis* (Čajovník čínský)<sup>3</sup>



**Obr. 2** *Camellia assamica* (Čajovník assamský)<sup>4</sup>

### **2.2.1. Oblasti pěstování čaje**

Čaj se převážně pěstuje v Asii, Africe, Jižní Americe a Austrálii, v Evropě se pěstuje pouze na Azorských ostrovech.

#### **Asie**

##### **Čína**

Čaje se pěstují ve všech provinciích na jihu i ve středu země. Mezi známé čajové oblasti se řadí např. Šen-si, Chu-nan, Šan-tung, Kan-su aj. Nejvyšší kvalitní čajové rostou v nadmořských výškách okolo 1500 metrů. V Číně je nejvíce produkován zelený čaj, černý čaj se silně aromatickou a měkkou vůní, je určen pouze pro vývoz.

## **Tchaj-wan**

Tento ostrov se vyznačuje produkcí polofermentovaných čajů oolong, jejichž chuť je mezi chutí čaje zeleného a chutí čaje černého. Druhy Senča a Gunpowder se vyrábí ze zeleného čaje. Ve středním Tchaj-wanu se vyrábí především černý čaj. Sběr probíhá od poloviny dubna do května.

## **Japonsko**

Produkuje pouze zelený čaj. Černý čaj se do Japonska dováží. Nejvhodnější podnebí a podmínky pěstování čajovníků je na jihu hlavního ostrova Honšú, ostrově Šikoku s Kjúšu.

## **Indie**

Čaje vypěstované v Indii patří mezi nejkvalitnější na světě. I když čaj se zde začal pěstovat až od poloviny 19. století. Mezi oblasti produkující čaj v Indii patří např. Sikkim, Dooars, Nilgiri, ale mezi nejznámější se řadí Ásám a Dárdžiling.

Čajovník Assamský roste na severovýchodě Indie ve státě Ásám. Tato velmi rozlehlá oblast produkuje černý čaj vyznačující se svěží, květinovou chutí a světlou, zlatožlutou barvou. Sklizeň probíhá od března do poloviny dubna.

Další slavná oblast s ideálními klimatickými podmínkami se rozkládá na jižních svazích Himalájí. Tropické horko, vlhký, horský chladný vzduch a monzunové deště jsou podmínky typické pro tuto oblast a vhodné pro růst čajovníků. Čaj z provincie Dárdžiling má velice jemnou chuť označuje se jako „šampaňské mezi čaji“. Převážně se zpracovává jako listový čaj.

## **Srí Lanka (Cejlon)**

Čaje pěstované na tomto ostrově se dělí podle nadmořské výšky. Low Grown (nížinné, do 650 m n. m.), Medium Grown (střední, mezi 650 – 1300 m n. m.) a High Grown (vysokohorské, nad 1300 m n. m.). Nejvýše položená oblast, která se vyznačuje produkcí velmi jemného čaje o nejvyšší jakosti, jsou Nuwara Eliya a Dimbula.

## Nepál

Nepál produkuje čaje ze všech zemí nejkratší dobu. V roce 1863 dostal správce oblasti Illam dárek, semena čajovníku pocházející z Číny. Po zasetí založil čajovou zahradu Illam. Nepálské čaje svou chutí a charakterem nápadně připomínají čaje z oblasti Dárdžiling.

Od 20. století se čajovníky pěstují také na africkém kontinentu, např. v Keni, kde je podnebí tak příznivé, že se čaj sklízí celý rok a převážně produkuje černý čaj. Dále Malawi, Mosambik, Tanzanie, Zimbabwe aj. Dalšími oblastmi jsou Austrálie, Indonésie, Portugalsko, Turecko, Argentina, Ekvádor, Peru.<sup>1</sup>

### 2.2.2. Zpracování

Sklizené čajové lístky v první řadě musí tzv. zavadnout, to probíhá v místnostech s kontrolovanou konstantní teplotou (20-24°C) a vlhkostí (75%). Dále se zavadlé listy svinují na speciálních strojích. Svinováním se naruší buněčná membrána a uvolní se šťáva, která reaguje s kyslíkem. Ve speciálních místnostech na dřevěných stolech při regulovaném mikroklimatu probíhá fermentace, při níž se mění zelená barva na červenou. Získávají charakteristické aroma. Po fermentaci se listy suší horkým vzduchem, tím listy získávají hnědočernou barvu. Ve finále se provádí třídění na sítích. Jedná se o tradiční metodu, která bývá v poslední době nahrazena metodou „CTC“ (crusting – tearing – curling, drcení – trhání - rolování), která se liší tím, že před svinováním se listy naruší na řezačce. Šťáva z listů se vylučuje silněji a díky tomu probíhá mnohem silnější fermentace.<sup>5</sup>

Podobné vlastnosti má modernější metoda LTP (Lawrie Tea Processing), kdy listy před oxidací jsou rozkrájeny noži, které se pohybují proti sobě.<sup>6</sup>

### 2.2.3. Druhy čaje podle zpracování

Spousta lidí žije v domněnku, že zelené a černé čaje jsou rozdílné rostliny. Ovšem oba pocházejí ze stejné rostliny. Rozdíl spočívá ve zpracování čajových lístků. Proces zpracování, kdy listy procházejí chemickým dějem, je označován jako fermentace, správnější označení je ovšem oxidace polyfenolů.<sup>1,2</sup>

### **2.2.3.1. Zelený čaj**

U zeleného čaje neprobíhá oxidace, a tím si tedy zachovává všechny polyfenoly. Pro výrobu zeleného čaje se používají pouze první dva lístky a výhonek. Po natrhání se lístky nechávají zavadnout ve stínu, nebo se ihned zpracovávají (deenzymují). Oxidaci se zamezuje pražením na pánvi, napařováním anebo pečením. Poté se listy svinou a nakonec suší, často několikrát po sobě. Znaky kvalitního zeleného čaje – vůně připomínající seno, listy nejsou fermentovány a tak mají žlutozelenou barvu. Nejznámější zelený čaj je Gunpowder.<sup>1</sup>

### **2.2.3.2. Černý čaj**

Černý čaj je ze všech čajů nejvíce oxidován, větší polovina polyfenolů je zoxidována. Takže obsahuje okysličené i neokysličené polyfenoly. Oxidované polyfenoly dodávají chuť, barvu a aroma černého čaje, naproti tomu neokysličené (přírodní) polyfenoly vytvářejí trpkost čaje a zahání žízeň. Ve východní Asii je označován podle barvy nálevu jako červený čaj. Po sklizni se lístky rozprostřou na plátech, jež jsou na vzduchu ve stínu. Jakmile listy zavadnou a změknou, mohou být svinuty. Svinováním se rozruší buněčné membrány, tím se spojí katechiny s enzymem polydenolázou, tento proces spouští oxidaci listů. Listy během fermentace v chladném prostředí, absorbují kyslík, který aktivuje enzymy. Čím je fermentace delší tím má čaj tmavší barvu a slabší chuť. Okraje listů fermentací červenají a vydávají mandlovou vůni. Fermentace se ukončuje sušením respektive pražením. Vysušené listy se nakonec třídí dle velikosti.<sup>2,6</sup>

### **2.2.3.3. Oolong**

Postup výroby čaje oolong je obzvláště obtížný a náročný. Listy na výrobu musí být sklizeny v plné zralosti a ihned zpracovány. Listy se po sklizni nechají na přímém slunci zavadnout a tím započne mírná fermentace. Listy se protřásají v bambusových košicích, tím se naruší okraje a ty oxidují rychleji než střed listu. Jakmile okraje lístků zčervenají, fermentace se ukončí sušením, při teplotě vyšší než je běžné u jiných druhů čaje. Sušené listy se zabalené do bavlněné látky hnětou, valchují a poté se opět suší. Proces se ukončí, jakmile

kraje listů zčernají, ale střed zůstane zelený. Získají se pevné a svinuté listy, které se ještě zcela finálně zahřejí, a tím se zajistí jejich trvanlivost.<sup>2,6</sup>

#### **2.2.3.4. Bílý čaj**

Ze zvláštních „bílých“ čajovníků se sklízí bílé pupeny a velmi mladé stříbřité listy. Po sklizni se nechají lístky zavadnout a protřepávají se na platech, aby se slabě pomačkaly. Naruší se buněčná membrána, což způsobí slabou oxidaci, která je rychle ukončena propařením nebo sušením. Lístky tohoto čaje se netvarují. Nálev má světle zelenou až žlutou barvu.<sup>6</sup>

#### **2.2.3.5. Pchu-er**

Zelený čaj Pchu-er vzniká speciálními postupy, z jarní sklizně, která se přežene párou a houbovými kulturami, poté se lisuje či plní do forem. Stejným postupem ovšem z letní sklizně získáváme červený Pchu-er.

Zelený i červený čaj Pchu-er se uchovává v chladu po dlouhou dobu až několik let, čímž se docílí osobitého, zatuchlého a zemitého aroma.<sup>2</sup>

#### **2.2.4. Kvalita čaje**

Výsledná kvalita čaje je ovlivněna mnoha faktory, jako podnebí, půda, nadmořská výška, prostředí kde se čaj pěstuje a sklízí, dále také zpracování, mísení, balení, doprava a skladování. Kvalitu si čaj uchovává osm měsíců, poté začne klesat. Do sáčkových čajů se používají méně kvalitní čaje, jejichž nevýhodou je, že rychle ztrácejí vůni, a pohlcují cizí pachy. Čaje se dělí do dvou skupin, listové a zlomkové.

Stupnice kvality čaje:

- 1) Orange Pekoe Teas – velmi kvalitní čaje obsahující mladé lístky, lístkové pupeny a malé množství stopek
  - 2) Pekoe Teas – obsahují druhé i třetí lístky, velké množství stopky
  - 3) Pekoe Souchong Teas, Souchong Teas – jsou čaje horší kvality, obsahují hrubé listy
- Congu Teas – velmi nekvalitní čaje<sup>5,9</sup>



## 2.2.5. Chemické složení čaje

Lístky čajovníku obsahují chemické látky jako aminokyseliny, karbohydráty, minerály, kofein a polyfenoly. Čerstvé lístky obsahují průměrně 70% vody. Při sušení se obsah vody zredukuje na 3%. Celkem bylo objeveno více jak 550 chemických látek, většina těchto látek vzniká výrobou. Tyto látky předávají čaji své vlastnosti, a mají vliv na vůni, chuť a barvu čaje.<sup>7</sup>

### 2.2.5.1. Polyfenoly

Čaj obsahuje až 30% polyfenolů. Protože fermentace deaktivuje polyfenoly, je v zeleném čaji jejich podíl až o devadesát procent větší než v černém čaji. Díky polyfenolům získává čaj barvu a svíravou chuť. Tyto sloučeniny jsou považovány za antioxidanty. Velké množství polyfenolů obsažených převážně v zeleném čaji, mají příznivý vliv na lidské zdraví. Konzumace čaje snižuje rizika kardiovaskulárních onemocnění, vysokou hladinu cholesterolu, diabetes a zubní kaz.<sup>8</sup>

Polyfenoly v čaji se dělí podle chemické struktury. Jednoduché čajové polyfenoly jsou syntetizovány během rané fáze biosyntézy polyfenolů.<sup>10</sup>

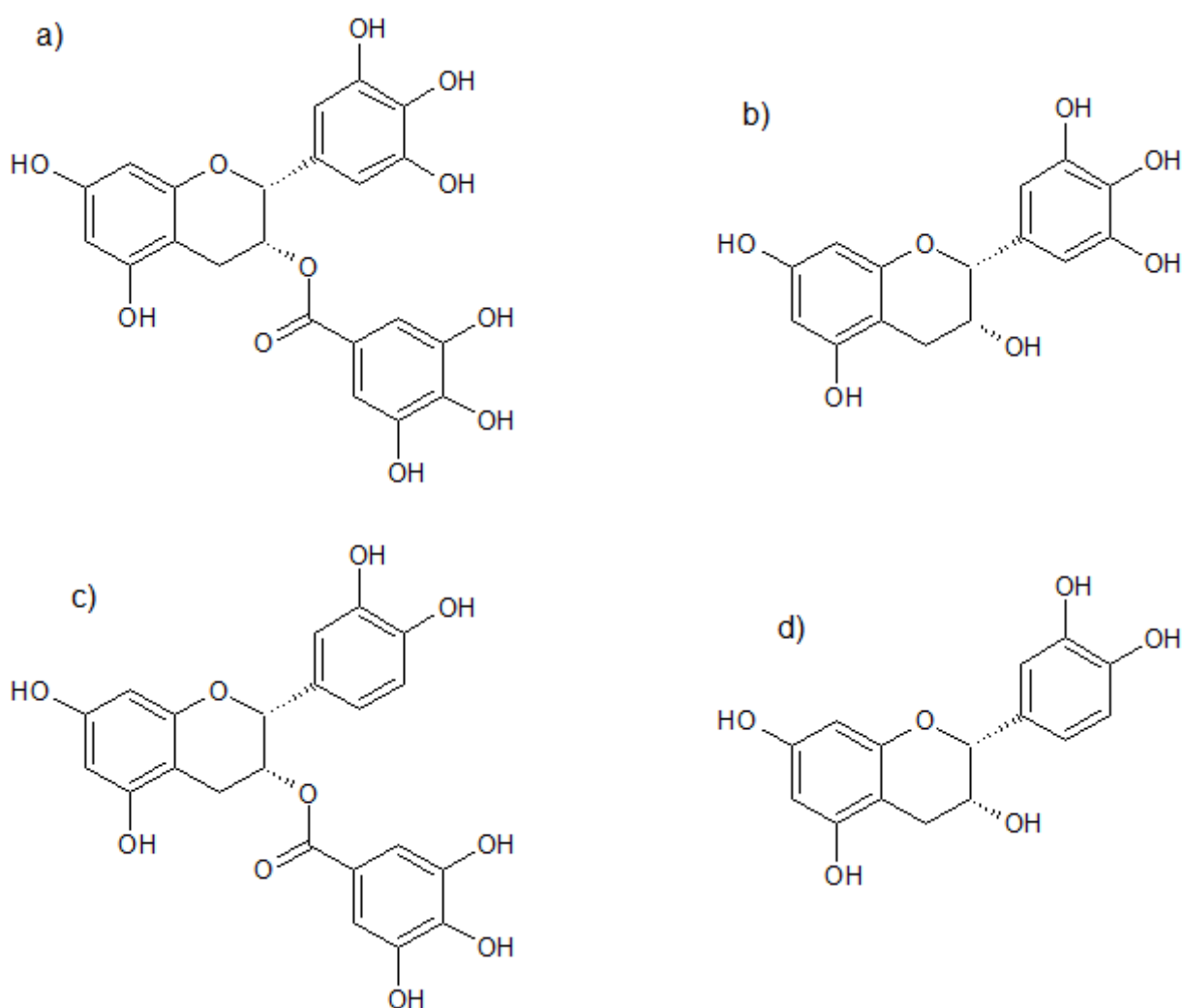
Čerstvé čajové lístky jsou bohaté na flavanolové monomery, známé pod názvem katechiny. Čajové lístky také obsahují polyfenolové enzymy oxidázy. Během průmyslové výroby, katechiny přicházejí do styku s polyfenoly oxidázy, což vede k jejich oxidaci a tvorbě flavanol dimerů a polymerů známých jako theaflaviny a thearubiginy. Černý čaj, který při výrobě prošel svinováním a fermentací, obsahuje vysoké koncentrace theaflavinu a thearubiginu, a naopak nízké koncentrace katechinů. U zeleného čaje po zavadnutí a následném pražení, dochází k inaktivaci polyfenolu oxidázy. V důsledku toho zelený čaj obsahuje vysoké množství katechinů a nízké koncentrace theaflavinu a thearubiginu. Čaj také obsahuje malé množství flavonolů ve formě glykosidů.<sup>11</sup>

### 2.2.5.2. Katechiny

Katechiny představují hlavní část polyfenolů zeleného čaje, a proto jsou považovány za stavební kameny polyfenolů černého čaje. Některé katechiny zeleného čaje odolávají procesu

fermentace a jsou detekovány v černém čaji. Vzhledem k oxidačním reakcím a teplotním podmínkám, jimž čelí čajové lístky během výroby černého čaje, se předpokládá, že některé katechiny vytváří epimery a může docházet k odštěpení kyseliny gallové, což vysvětluje výskyt volné kyseliny gallové, stejně jako zvýšený obsah epi izomerů katechinů.<sup>10</sup>

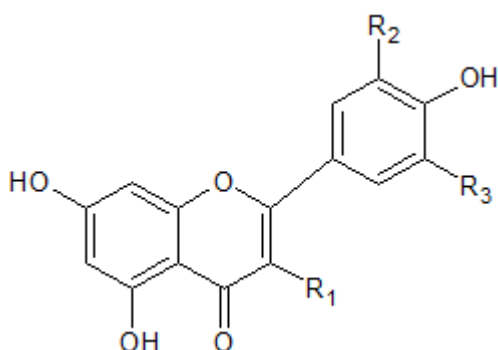
Katechiny jsou bezbarvé, ve vodě rozpustné sloučeniny, které dodávají hořkost a trpkost zelenému čaji. Nejznámější katechiny (Obr. 3) v čaji jsou epigallokatechin gallát (EGCG), epigallokatechin (EGC), epikatechin gallát (ECG) a epikatechin (EC). Epigallokatechin gallát (EGCG) má nejvyšší koncentraci v čaji.<sup>12</sup>



**Obr. 3** Strukturální vzorce katechinů a) EGCG, b) EGC, c) ECG, d) EC

### 2.2.5.3. Flavonoly

Hlavními flavonoly (Obr. 4) v čajových lístcích jsou kvercetin, kaempferol a myricetin. Tvoří až 3% vodného extraktu čaje. Flavonoly jsou převážně přítomny jako glykosidy, spíše než jako neglykosylované formě (aglykony). Cukerná část se skládá z glukózy, rhamnózy, galaktózy, arabinózy a fruktózy. Flavonolové aglykony se nevyskytují v čajovém nápoji vzhledem k jejich nerozpustnosti ve vodě.



Myricetin:  $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$

Quercetin:  $R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$

Kaempferol:  $R_1 = \text{OH}, R_2 = R_3 = \text{H}$

Obr. 4 Strukturální vzorec flavonolů v čaji

### 2.2.5.4. Theaflaviny a thearubiginy

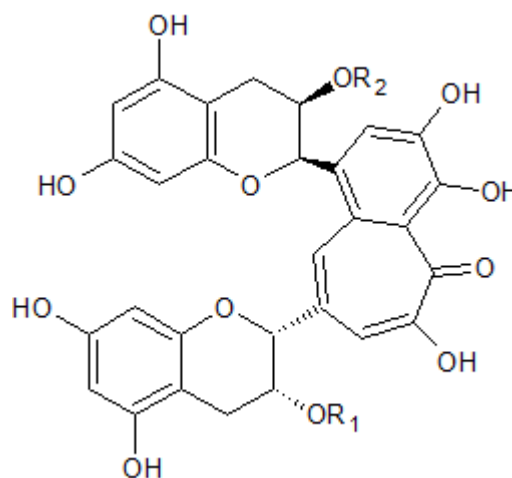
Při výrobě černého čaje jsou katechiny oxidovány za vzniku typické barvy a chutě čaje. Klasické pigmenty černého čaje byly rozděleny na oranžové theaflaviny a hnědé thearubiny. Obsah theaflavinů v černém čaji je 0,3 – 2%, zatímco thearubinové frakce je obsaženo 10 – 20% v sušině černého čaje, a spolu s theaflaviny dodávají čajovému nálevu barvu a sílu.<sup>12</sup>

Theaflavin:  $R_1 = R_2 = \text{H}$

Theaflavin 3-Gallat:  $R_1 = \text{Gallat}, R_2 = \text{H}$

Theaflavin 3'-Gallat:  $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Gallat}$

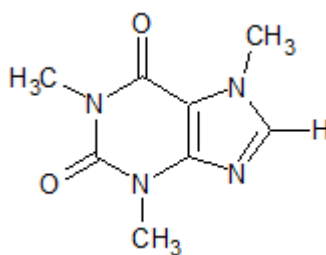
Theaflavin 3,3'-Digallat:  $R_1 = \text{Gallat}, R_2 = \text{Gallat}$



Obr. 5 Strukturální vzorec theaflavinů

### 2.2.5.5. Kofein

Kofein (Obr. 6) je důležitá složka čaje, povzbuzuje celý organismus i činnost mozku. Kladně působí na činnost srdce a na ledviny, napomáhá vyučovat žaludeční šťávy. Kofein je látka, která zvyšuje pozornost a zlepšuje náladu. Množství kofeinu v čaji závisí jak na druhu čaje, tak i na teplotě vody a na době luhování, je to mezi 2-5%. Zelený čaj obsahuje méně kofeinu než černý čaj.<sup>8,10</sup>



Obr. 6 Strukturální vzorec kofeinu

### 2.2.5.6. Dusíkaté látky

Dalšími dusíkatými látkami v čaji jsou proteiny/peptidy a aminokyseliny, které jsou přítomny v listech a extraktech čajů. Tyto látky tvoří asi 15% pevných látek v extraktu. Jejich množství se zvyšuje během zavadnutí, ale klesá během fermentace na černý čaj. Hlavní aminokyselina přítomná v čaji je theanin. Je hlavní součástí jak zeleného tak i černého čaje, v množství 3%.<sup>10</sup>

### 2.2.5.7. Theanin

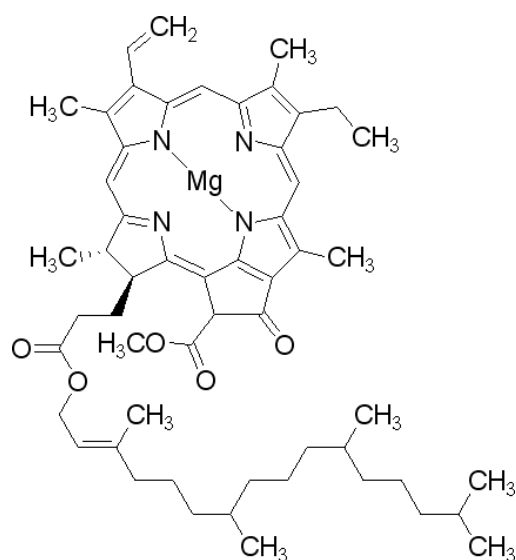
Theanin je aminokyselina, která v mozku vyvolává stav hluboké relaxace bez pocitu únavy. Zatím co katechin dodává čaji hořkost a trpkost, theanin chutná sladce, a tak se chutě vyrovnávají. Theanin zlepšuje paměť.<sup>14</sup>

### 2.2.5.8. Karotenoidy a chlorofyl

Hlavními pigmenty v čerstvém listu čaje jsou chlorofyly (chlorofyl a,b) a karotenoidy (karoteny a xantofyly). Karotenoidy jsou důležité lipofilní pigmenty rostlin žluté, oranžové někdy také žlutozelené a červené barvy. Karotenoidy jsou v rostlinách asociovány s chlorofyly v chromoplastech resp. v chloroplastech. Karotenoidy se řadí mezi tetraterpeny, jinými slovy mezi terpenoidy, které obsahují osm isoprenových jednotek. Barevné jsou díky řetězci konjugovaných dvojných vazeb, ty se vyskytují v mnoha základních strukturách a jejich kombinacích.<sup>16</sup>

Chlorofyl je přírodní barvivo, díky kterému čajové lístky mají zelenou barvu. Jedná se o porfyrinovou sloučeninu s centrálním hořčíkem. V zelených čerstvých listech čaje se nachází ve formě chlorofyl, chlorofyl a, a chlorofyl b. Po otrhání lístků od hlavní rostliny započne reakce odštěpování hořčíku, kdy vzniká látka nazývaná feofytin a. Reakce chlorofylu se urychluje působením vzdušné vlhkosti, teplotou, slunečním světlem. Projevem této reakce je změna zbarvení čajového listu ze zelené na žlutohnědou. Vysušené čajové lístky obsahují až 1,4 mg chlorofylu.<sup>15</sup>

Chlorofyly jsou v průběhu výroby černého čaje oxidovány na pheophytiny a pheophorbidy, které dodávají fermentovanému listu jeho charakteristickou hnědo-černou barvu. Bylo prokázáno, že přítomnost těchto složek v zeleném čaji, má silný vliv na kvalitu nápoje. Čaj pěstovaný ve stínu má sníženou hladinu katechinů a vyšší množství karotenoidů a chlorofylu. Karotenoidy významně ovlivňují aroma, charakteristické pro černý čaj.<sup>10</sup>



**Obr. 7** Strukturní vzorec chlorofylu

### 2.2.5.9. Minerály

Čaj obsahuje 5% minerálních látek. Bylo prokázáno, že čajovník je bohatý na draslík, který odstraňuje únavu, snižuje krevní tlak a slouží k odvodňování. Dále obsahuje významné množství vápníku a hořčíku, jakožto i malé množství manganu, železa, fosforu, mědi, niklu, sodíku, bóru a molybdenanu. Hořčík je nezbytný pro vstřebávání vápníku, působí proti únavě. Zinek a síra jsou základními prvky pro zdravé zrání čajovníku. Kobalt, olovo a kadmium byly zjištěny v rostlině a jejich koncentrace závisí na koncentraci těchto minerálů v půdě. Je známo, že čajovník hromadí hliník, tvoří komplex s fluoridem a katechiny. Čajové nápoje jsou také významným zdrojem fluoridů. Fluor působí proti vzniku zubního kamene.<sup>8,10</sup>

### 2.2.5.10. Vitamíny

V čaji se vyskytují vitaminy C a E, které mají antioxidační vlastnosti. Vitamíny B, K a P. Vitamín C, nejen, že posiluje imunitu organismu, odstraňuje únavu, ale působí i proti nádorovému onemocnění aj. Zelený čaj obsahuje větší množství vitamínů než čaj černý.<sup>8</sup>

## 2.3. Metody extrakce

Extrakce je separační metoda. Z pohledu fyzikální chemie je proces extrakce přechod složky fázovým rozhraním, mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami. Jako extrakce mohou být označeny i další metody, kdy složka směsi je převáděna fázovým rozhraním z jedné fáze (plynné, kapalné, pevné), do druhé fáze (kapalné, pevné), ovšem principiálně se jedná např. o absorpci nebo adsorpci.

Přechod částice z jedné fáze do druhé, je způsobeno interakcí molekul rozpouštědla s molekulami rozpuštěné látky. Selektivita, je dána povahou sil uplatňujících se při rozpouštění. Na znalosti typu těchto interakcí je založena volba vhodného rozpouštědla.<sup>18</sup>

Extrakční metody lze dělit podle skupenství fází, mezi kterými extrahovaná složka přechází.

V dnešní době je snaha zkrátit doby extrakce, snížit spotřebu rozpouštědel, a proto se klasické extrakční techniky jako destilace vodní parou, Soxhletova extrakce apod., nahrazují novějšími metodami, jako mikroextrakce pevnou fází, superkritická fluidní extrakce apod.<sup>17</sup>

### 2.3.1. Zrychlená extrakce rozpouštědlem (Accelerated Solvent Extraction - ASE)

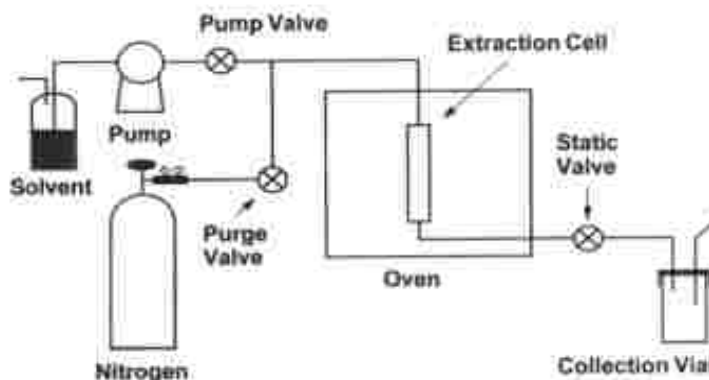
Akcelerovaná extrakce rozpouštědlem zahrnuje extrakci rozpouštědly za vysokého tlaku a teploty, aniž by bylo dosaženo kritického bodu. Tato technika získala různá jména, jako je Pressurized solvent extraction (PSE), Pressurized fluid extraction (PFE), Pressurized liquid extraction (PLE), pressurized hot solvent extraction (PHSE), subcritical solvent extraction (SSE) aj.<sup>19</sup>

Ačkoliv původní aplikace této techniky byla v oblasti životního prostředí, jeho univerzálnost a snadnost použití se ukázaly užitečné pro extrakce v potravinářském, polymérním průmyslu a farmaceutickém průmyslu.

Extrakce se provádí za použití stejných rozpouštědel jako v tradičních postupech, vodná a organická rozpouštědla, ale při vyšších teplotách. Toto zvýšení teploty zlepšuje kinetiku procesu a to vede k účinnější extrakci. Ve srovnání s tradičními postupy, extrakce probíhá rychleji za použití menšího množství rozpouštědla. Působící podtlak zajišťuje, že rozpouštědlo je udržováno v kapalném stavu. Například, rozpouštědla jako je voda, methanol, aceton a hexan se běžně používají v ASE při teplotách v rozmezí 75 – 150°C. Dále jsou udržovány pod tlakem až 10,4 MPa. ASE se provádí za velmi vysoké teploty, aby se urychlil proces extrakce.

Extrakční postup se skládá z kombinace dynamického a statického toku rozpouštědla, přes vyhřívanou extrakční celu obsahující vzorek. Tyto cely musí vyhovět požadavkům na vysoké tlaky v systému. Obvykle jsou vyrobeny z nerezové oceli, s frity v koncových uzávěrech pro umožnění průchodu rozpouštědla a současného zachování pevného vzorku uvnitř cely. Objem cely bývá v rozmezí od 1 do 100ml. Velikost pórů frity nesmí umožnit průchod matricových částic, běžná velikost je 5 – 10 µm. Cela se vzorkem se připojuje k dráze toku rozpouštědla a naplní se rozpouštědlem. Je důležité, aby veškerý prázdný objem byl naplněn rozpouštědlem pro dobrý kontakt mezi matricí vzorku a rozpouštědlem, a také aby se zabránilo možné oxidaci analytu, ke které může dojít v přítomnosti vzduchu při zvýšené teplotě. Cela se vzorkem se následně zahřívá přímým kontaktem se zdrojem tepla. V systému je také tlakový zdroj, aby se extrakční činidlo zachovalo v kapalném stavu. Tlak systému musí být nad hranicí potřebnou pro udržení kapalného stavu rozpouštědla u nastavené teploty a musí být schopen hnát rozpouštědlo přes měřicí celu v přiměřené době.

To zajišťuje čerpadlo, které udržuje konstantní tlak kapaliny v rozmezí 6,9 až 20,7 MPa. Jakmile se dosáhne tepelné rovnováhy, cela je udržována na nastavené teplotě po další dobu 5-10 min. Během této statické fáze, dochází k difúzi analytu z matrice do rozpouštědla. Po tomto kroku se otevře ventil a objem rozpouštědla se nechá odpustit přes vzorek do sběrné nádoby. Závěrem stlačený dusík slouží k vyhnání veškerého rozpouštědla z linie a cely do sběrné nádoby.<sup>20</sup>



**Obr. 8** Schematický diagram systému ASE<sup>21</sup>

Ve studii Piñeiro Z., Palma M., Barroso C. G.<sup>27</sup> byla srovnána tlaková extrakce rozpouštědlem s ultrazvukovou extrakcí a extrakcí s využitím magnetického míchání pro extrakci katechinů z čajových extraktů. Byla použita čtyři různá rozpouštědla a to voda, methanol, ethanol a ethylacetát. Nejlepších výsledků bylo dosaženo za použití methanolu. Na základě výtěžnosti katechinu a epikatechinu, metoda tlakové extrakce rozpouštědlem za použití methanolu jako rozpouštědla, vykazovala vyšší výsledky než ostatní extrakce. Navíc bylo potvrzeno, že výtěžnosti katechinu a epikatechinu začnou klesat při 130°C a výše. V této studii také nalezneme, že tlaková extrakce rozpouštědlem byla provedena na čajových lístcích různého stupně fermentace.

### 2.3.2. Superkritická fluidní extrakce (Supercritical Fluid Extraction - SFE)

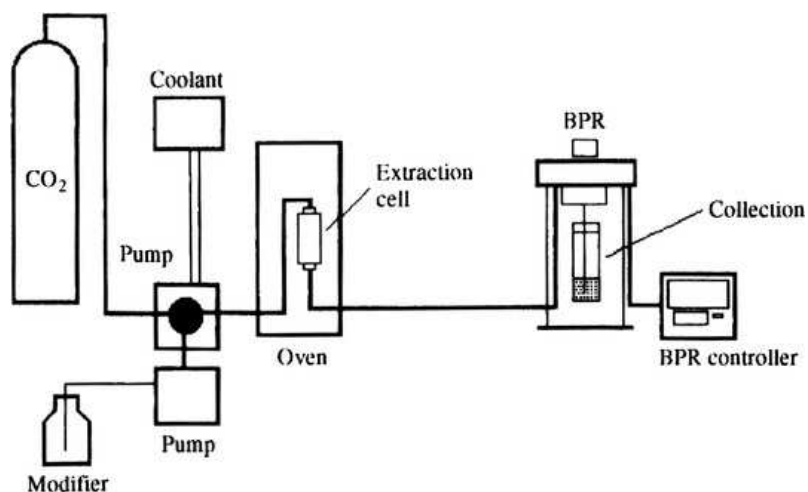
V této technice se pracuje se specifickými vlastnostmi nadkritické tekutiny. Z pohledu fyzikálně chemických vlastností superkritické tekutiny tvoří přechod mezi plynnou a kapalnou fází a vykazují zvláštní vlastnosti, jako například vysokou hustotu a velkou



solvatační schopnost. S vysokými hodnotami difúzních koeficientů souvisí nízká viskozita, která zásadně ovlivňuje kinetiku extrakce. Zmíněné vlastnosti jsou výhodou použití superkritické kapaliny pro extrakci organických látek z tuhých matric. Nejběžnější rozpouštědlo, užívané v SFE, je oxid uhličitý. Jeho největší předností je snadné dosažení nadkritické teploty a tlaku (31,1°C, 7,43 MPa), jedná se o netoxickou a nehořlavou látku, lze ji získat v dostatečné čistotě za přijatelnou cenu. Oxid uhličitý je málo polární a jeho extrakční účinnost je přibližně stejná, jako u hexanu. Extrakční účinnost CO<sub>2</sub> ovšem klesá s rostoucí polaritou analytů. Tento problém se řeší přidávkou modifikátoru – vhodná polární látka (methanol, acetonitril, apod.).<sup>22</sup>

Ukázalo se, že SFE extrakce jsou účinné v oddělení éterických olejů a jejich derivátů, pro použití v potravinářském, kosmetickém, farmaceutickém a dalších souvisejících odvětvích, produkující vysoce kvalitní esenciální oleje.<sup>23</sup>

Systém musí obsahovat čerpadlo a CO<sub>2</sub>, tlakové cely naplněné vzorkem, prostředky pro udržování tlaku v systému a sběrných nádobkách. Kapalina se čerpá do vyhřívané zóny, kde je zahřívána. Následně přechází do extrakční nádoby, kde se rychle difunduje do pevné matrice, a cílových analytů, které mají být extrahovány. Rozpuštěné složky jsou při nižším tlaku přeneseny z extrakční cely do separátoru. CO<sub>2</sub> se poté ochladí, stlačí a recykluje, nebo se vypouští do atmosféry.<sup>23</sup>



**Obr. 9** Schematický diagram systému SFE<sup>24</sup>

### 2.3.3. Ultrazvuková extrakce (Ultrasonic Assisted Extraction - USE)

Ultrazvuková extrakce se provádí v ultrazvukové vaně nebo za použití ultrazvukové sondy. Rozdrcený vzorek je v kádince smíchán s vhodně zvoleným rozpouštědlem. Účinnost extrakce lze ovlivnit volbou intenzity energie. Sondou lze nastavit dobu a teplotu extrakce. Analyt přechází do rozpouštědla a po oddělení extraktu následuje filtrace. Získaný extrakt se zakoncentruje odpařením rozpouštědla.<sup>25</sup> Vlivem ultrazvuku dochází k rozpadu pevného vzorku, který je smíchán s vhodným rozpouštědlem. Ultrazvuk vyvolává větší pronikání rozpouštědla do buněčného materiálu a zlepšit tak přenos hmoty.

Je to rychlá, jednoduchá a levná extrakční metoda. Výhody této metody jsou zvýšení extrakčního výtěžku a rychlejší kinetika. Ultrazvuk může také snížit provozní teplotu umožňující extrakci termolabilních sloučenin. Extrakční výtěžek závisí nejen na druhu použitého materiálu a jeho hmotnosti, ale také na volbě rozpouštědla, frekvenci a teplotě extrakce. Používá se nejen k extrakci esenciálních olejů a tuků, ale také v potravinářském průmyslu.<sup>26</sup>

V práci Xia T., Shi S., Wan X.<sup>28</sup> bylo zjištěno, že ultrazvuková extrakce má lepší účinnost extrakce hlavních chemických složek čaje a to při nižších teplotách. Obsah čajových polyfenolů, aminokyselin a kofeinu byl větší než u extraktů získaných běžnou extrakcí. Ultrazvuková extrakce inhibuje extrakci bílkovin a pektinu. Výsledky také ukázaly, že tato metoda může zvýšit výtěžky extrakce aromatických složek.

## 2.4. Čištění a frakcionace čajových extraktů

U surových extraktů získaných extrakčními metodami jako je ASE, Soxhletova extrakce apod. je nutnost provedení čistících procesů před samotnou koncovou analýzou. Protože extrakty mohou obsahovat nežádoucí příměsi, např. chlorofyly, vosky, tuky, terpeny atd., tak mohou ovlivňovat identifikaci sledovaných analytů. Různorodost složení surového extraktu vede k nutnosti dalšího separačního kroku, kdy cílem je frakcionace, eliminace interferujících složek a zkoncentrování analytů vzorků.

K tomuto slouží separační procesy, jako sloupcová chromatografie, extrakce kapalina-kapalina, za použití řady rozpouštědel, chromatografie na tenké vrstvě a v neposlední řadě sorbce na pevné fázi.

### **2.4.1. Extrakce kapalina – kapalina (Liquid-Liquid Extraction LLE)**

Jedná se o jednu nejstarší a nejvíce využívanou techniku v přípravě vzorků pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. Extrakce kapalina – kapalina je založena na relativní rozpustnosti analytu ve dvou nemísitelných fázích a řídí se koeficientem rovnovážné distribuce. Jedná se o tzv. vytřepávání. Obvykle se používá dělicí nálevka a dvě nemísitelné rozpouštědla, které se smísí třepáním a poté se ponechají oddělit.<sup>29</sup>

### **2.4.2. Extrakce na tuhé fázi (Solid-Phase Extraction SPE)**

Tato extrakce je v dnešní době nejúčinnější technika, která slouží nejen jako čistící proces surových extraktů, jak biologických vzorků, tak i rostlinných vzorků, ale také k zakoncentrování stopových množství látek, k derivatizaci apod.<sup>17,30</sup>

Tato metoda spočívá v použití jednorázových kolonek, k zadržení analytů a jejich oddělení od matrice. Vzhledem k tomu, roztok vzorku prochází aktivním sorbentem, analyty se zadržují na jeho povrchu tak, že ostatní složky vzorku jen projdou. Rovnováhy mezi analytem a sorbentem je dosaženo rychle díky velkému rozhraní. Velikost částic sorbentu se pohybuje v rozmezí 10 až 60  $\mu\text{m}$ . Sorbenty řadíme do tří skupin: nepolární, polární a iontově výměnné, jejich činnost je závislá na vlastnostech vázající se fáze. Volba sorbentu je závislá na potravinové matrici, analytech a jejich interferencích.

Extrakce se provádí ve čtyřech krocích:

- Kondicionace (funkční skupiny sorbentu jsou solvatovány, aby byl připraven pro interakci se vzorkem)
- Retence (analyty jsou zachycovány na sorbentu)
- Selektivní promytí (nežádoucí příměsi jsou odstraněny)
- Eluce (analyty jsou desorbovány a jímány pro analýzu)

Metoda SPE je velmi jednoduchá, rychlá a reprodukovatelná. Výhodou této extrakce je menší spotřeba organických rozpouštědel. SPE se převážně používá pro kapalné vzorky, a to výhradně pro středně těkavé a netěkavé látky.<sup>31</sup>

### **2.4.3. Tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography – TLC)**

Chromatografie na tenké vrstvě je jednoduchá, rychlá a levná metoda. Jako tenká vrstva se používá destička ze skla, kovu, nebo plastu, a ta je potažena tenkou vrstvou pevného adsorbentu. K těm nejpoužívanějším sorbentům patří oxid křemičitý, oxid hlinitý, polyamid či celulóza. Malé množství směsi, která má být analyzována, se nanese v dolní části destičky. Poté se destička umístí ve vyvíjecí nádobce naplněné rozpouštědlem tak, aby byla ponořena spodní část desky. Toto rozpouštědlo je mobilní fáze a pomalu stoupá a to kapilárním účinkem. Jakmile rozpouštědlo dosáhne horní části destičky, deska se vyjme z vyvíjecí nádoby, vysuší se a výsledky jsou vizualizovány.

### **2.4.4. Sloupcová chromatografie (Column Chromatography – CC)**

V sloupcové chromatografii, stacionární fáze, neboli pevný adsorbent je umístěn ve svislém skleněném sloupci (koloně). Mobilní fáze, kapalina se přidává na začátek kolony a stéká kolonou buď působením gravitace, nebo vnějšího tlaku. Sloupcová chromatografie se používá jako čistící metoda, to znamená, že izoluje požadované sloučeniny ze směsi. Nejběžnější používané adsorbenty jsou silikagel ( $\text{SiO}_2$ ) a oxid hlinitý ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ).<sup>33</sup>

## **2.5. Metody stanovení a identifikace katechinů obsažených v čajových extraktech**

Pro stanovení katechinů v čajových extraktech bylo prokázáno, že je možno použít většinu metod.<sup>34</sup> Kapalinová a plynová chromatografie (HPLC, GC), Kapilární zónová elektroforéza (CZE), ale i tenkovrstvá a papírová chromatografie (TLC, PC).

### **2.5.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)**

Metoda HPLC kombinuje výhody současné separace a kvantifikace flavonoidů bez možnosti předběžné derivatizace. Z tohoto důvodu bylo publikováno mnoho prací o HPLC

metodě pro analýzu katechinů v čajových lístcích. Ve většině z těchto prací<sup>36-39</sup> se používá reverzní fázové kolony. Jako mobilní fáze se často používají vodné roztoky methanolu nebo acetonitrilu. Nejčastěji používané detektory jsou UV detektory a fotodiody.<sup>12</sup>

V publikované práci Rahim A. A. a kolektiv<sup>40</sup> byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie za použití monolitické kolony s reverzní fází ke stanovení osmi katechinových monomerů a kofeinu ve vzorcích čaje. Použitím mobilní fáze voda: acetonitril: methanol (83:6:11) při průtokové rychlosti 1,4 ml/min, byly katechiny a kofein isokraticky odděleny přibližně v 7 minutách. Limity detekce a kvantifikace byly v rozmezí 0,11 – 0,29 a 0,33 – 0,87 mg/l.

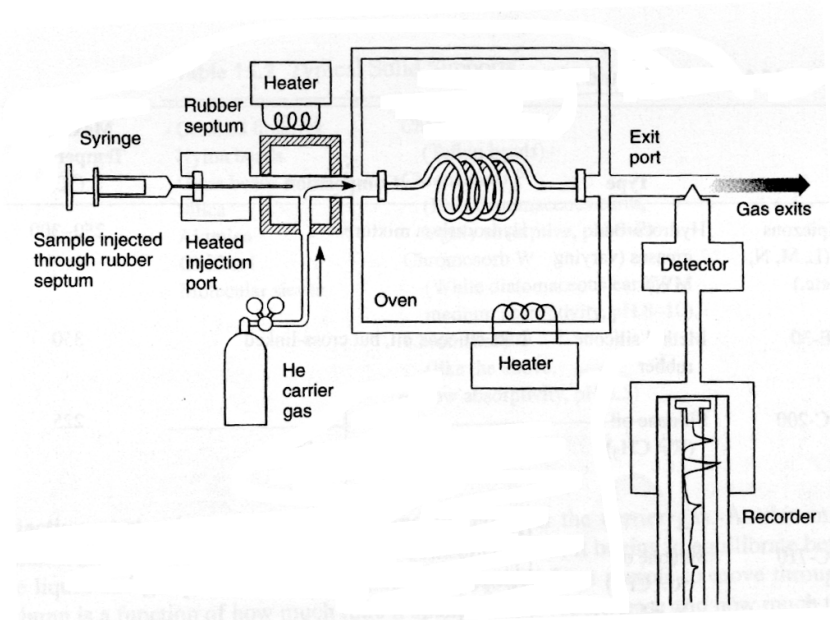
Práce Narumi K. a spol.<sup>41</sup> obsahuje využití iont-párové vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí ke stanovení katechinů a kyseliny gallové v lidském séru. Pro předúpravu před separací byl zvolen hydrofobní polytetrafluorethylenový (PTFE) filtr. HPLC separace byla provedena za použití C18 reverzní fázové kolony s gradientem mobilní fáze fosfátového pufru, který obsahuje tetrahexylammonium hydrogensulfát jako iont-párové činidlo. Při použití této metody, byly detekovány epikatechin, epigalokatechin, epikatechin-3-galát, epigalokatechin-3-galát a kyselina gallova jako jednotlivé píky.

### **2.5.2. Plynová chromatografie (Gas Chromatography – GC)**

GC metody využívají křemenné kapilární kolony pro stanovení katechinů. Ve všech případech je nutné převést katechiny, derivatizačním krokem, na těkavé sloučeniny.<sup>34</sup>

V práci Pierce A. R. a kolekt.<sup>42</sup> a Collier P. D., Mallows R.<sup>43</sup> bylo separováno pět katechinů, jako jejich trimethylsilyl (TMS) deriváty. Způsob detekce, je v obou případech plamenoionizační detekcí (FID). V práci Pierce A. R. byly využity dva izokratické teplotní běhy, nejprve při 250 °C v čase 20 minut byl detekován epikatechin, katechin a epigalokatechin. Při zvýšení teploty na 300 °C se detekují do 20 minut epikatechin galát a epigalokatechin galát. Naproti tomu, Collier P. D. a Mallows R. vyvinuli teplotně naprogramovanou GC metodu, která odděluje všech pět katechinů v jednom teplotním běhu za méně než 32 minut.

V publikované práci Du L. a kolektiv<sup>44</sup> byly použity dvě extrakce (mikroextrakce na pevné fázi, simultánní destilační extrakce), a následně plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií pro stanovení těkavých látek ve vzorcích čaje. Bylo identifikováno 79 těkavých sloučenin.



**Obr. 10** Schéma plynového chromatografu<sup>45</sup>

### 2.5.3. Kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis – CZE)

Kapilární zónová elektroforéza se řadí mezi analytické instrumentální elektromigrační techniky. Tato metoda je založena na separaci nabitých složek vzorku vložení elektrického pole v tenkých kapilárách. Na základě různých pohyblivostí analytů v elektrickém poli se rozdělují do jednotlivých zón. Zóny jsou na konci kapiláry detekovány. Nejčastěji se používá UV-VIS, nebo vodivostní detekce.

CZE metoda se používá ke stanovení organických i anorganických lehce ionizovaných molekul a atomů. Výhodou jsou nízké spotřeby chemikálií, rozpouštědel a vysoká účinnost separace. Mezi další výhody je možné využití, v potravinářství, biologii, farmacii, biotechnologii aj.<sup>46</sup>

Existuje řada publikovaných prací, které se zabývají využitím kapilární elektroforézy na separaci nebo kvantifikaci čajových katechinů. Pro stanovení katechinů se nejvíce využívá zónová elektroforéza (CZE) a micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC) s UV detekcí.<sup>34</sup>

V uvedených pracích Horie H.<sup>47</sup> a Arce L.<sup>48</sup> využívaly CZE metody pro stanovení pěti katechinů, za použití pufrů na boritanové bázi.

## 2.6. Antioxidační aktivita

Lidský organismus lze chránit před vlivem volných radikálů působením antioxidantů. Tyto antioxidanty jsou molekuly, zabraňující, či omezující oxidační destrukci látek. Spousta přírodních látek, které se dostávají spolu s potravou do lidského organismu, mají antioxidační vlastnosti. Tyto vlastnosti se přikládají zejména polyfenolickým sloučeninám. Zdrojem těchto látek jsou především zelenina, vláknina, ovoce, čaj, chmel, léčivé a aromatické rostliny a mnoho dalších. Celkový denní příjem polyfenolických sloučenin z různých zdrojů je přibližně 1 g, což je tedy vyšší hodnota, než příjem antioxidačních vitamínů.<sup>50</sup> V řadě publikovaných studií byl prokázán vztah mezi antioxidační aktivitou látek obsažených v potravě, či v nápojích a prevencí některých chorob.<sup>49</sup>

Antioxidační aktivita fenolických látek je především kvůli jejich redox vlastnostem, které jim umožňují působit jako redukční činidlo, donory vodíku, singletového kyslíku a zhášeče. Kromě toho mají kovový chelatační potenciál.<sup>51</sup>

Jedna z možností stanovení antioxidační aktivity je testování reaktivity individuálních izolovaných látek vůči jednotlivým volným radikálům. Ovšem většinu přírodních antioxidantů přijímáme jako součást složitějších směsí, kdy jednotlivé složky mohou reagovat s různými radikály a mohou na sebe vzájemně působit. Proto se charakterizuje antioxidační aktivita směsných vzorků jako celku.<sup>50</sup>

### 2.6.1. Metody stanovení antioxidační aktivity

V oblasti chemické analýzy a hodnocení potravin bylo vypracována celá řada metod, kterými lze stanovit tzv. celkovou antioxidační aktivitu vzorku. Základním cílem je charakterizovat jejich antioxidační účinnost, jako souhrnnou vlastnost potraviny.<sup>52</sup>

Rozmanitost metod vyplývá z toho, že antioxidanty působí různými mechanismy. Většinou jde o přímou reakci s radikály, nebo reakci s přechodnými kovy. Obecně jsou metody stanovení antioxidační aktivity kategorizovány do dvou skupin – na metody založené na eliminaci radikálů, a dále na metody posuzující redoxní vlastnosti látek.<sup>50</sup>

### **2.6.1.1. Metody založené na eliminaci radikálů**

Tyto metody jsou postaveny na schopnosti vzorku vychytávat volné radikály. Buď jsou tyto radikály generovány v reakční směsi anebo jsou do reakční směsi přidávány. Jedná se o kyslíkové radikály (hydroxyl, peroxy, superoxidový anion-radikál) nebo stabilní syntetické radikály (DPPH). Do zvláštní skupiny řadíme metody testující schopnost zpomalovat nebo inhibovat lipidovou peroxidaci.<sup>50</sup>

- **Metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)**

Tato metoda využívá řady činidel, která iniciačním procesem jiné látky přecházejí do své radikálové formy, která je barevná a poměrně stabilní. V přítomnosti antioxidačně aktivní složky extrahované ze vzorku se činidlo redukuje, a tím odbarvuje. Míra a rychlost odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku.<sup>52</sup>

- **Metoda používající DPPH**

Metoda je postavena na reakci vzorku se stabilním radikálem difenylpicrylhydrazylem (DPPH). Dochází k redukci radikálu která se projeví odbarvením roztoku, a to se měří spektrofotometricky.<sup>50, 52</sup>

- **Metoda ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)**

Tato metoda je založena na vytvoření peroxylového radikálu fykoeritrinu, a to jeho oxidací ABAP (2,2'- azobis-2-methyl- propionamidin) činidlem. Radikál se zjišťuje kvantitativně fluorimetricky a sleduje se rychlost úbytku signálu po přidání analyzovaného vzorku.<sup>52</sup>



### 2.6.1.2. Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

Neenzymové antioxidanty mohou být označeny jako redukční činidla, které reagují s oxidanty, které oxidují a tím inaktivují. Podle tohoto tvrzení lze antioxidační aktivitu charakterizovat na základě redukčních schopností látky.<sup>50</sup>

- **Metoda FRAP**

Do pufového prostředí se přidává nejen vzorek, ale také roztok ferrikyanidu draselného a chloridu železitého. Látky s redukčním potenciálem redukuje železitou sůl na železnatou, která reaguje s ferrikyanidem, za vzniku modrého zbarvení. Intenzita zbarvení se měří následně spektrofotometricky.<sup>52</sup>

- **Průtoková coulometrie**

Principem průtokové coulometrie je měření elektrického náboje. Tento náboj je spotřebovaný během kvantitativní oxidace antioxidačních látek ve vzorku uvnitř porézní uhlíkové elektrody za pomoci konstantního proudu. Měřením potenciálu porézní elektrody se sleduje průběh této oxidace. Za chodu oxidace se potenciál mění velmi pomalu. Jakmile se zoxidují veškeré antioxidační látky, dochází k rapidnímu nárůstu potenciálu, a to indikuje ukončení vnitřně elektrodové titrace. Nakonec získáváme signál  $dt/dE = f(t)$  ve tvaru píku, kdy jeho plocha odpovídá přechodovému času, který je úměrný koncentraci antioxidantů ve vzorku.<sup>53</sup>

## 3. Experimentální část

### 3.1. Použité chemikálie a přístroje

#### 3.1.1. Použité chemikálie

- Rozpouštědla diethylether, ethanol, heptan, tetrachlormethan (p. a., Lachema, Neratovice).  
Aceton, methylalkohol, pyridin (p. a., Penta, Chrudim)  
Hexan (p. a., PARK, UK)
- Silanizační činidlo bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) (Fluka, Buchs, Švýcarsko).
- Kyselina fosforečná 85% (p. a., Lachema a.s., Neratovice).
- Hydroxid sodný (p. a., Lach–Ner s.r.o., Neratovice).
- Askorbová kyselina (p. a. Lachema a.s., Neratovice).

#### 3.1.2. Použité přístroje

- Vysokotlaký extraktor one PSE (Applied Separations Inc., Allentown, PA, USA).



Obr. 11 ASE extraktor

- Ultrazvuk (KRAINTEK CZECH s.r.o., Hradec Králové, ČR).
- Centrifuga HETTICH EBA 20
- Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem

Extrakty byly proměřeny na plynovém chromatografu Agilent 6890 s hmotnostním detektorem 5973N (Agilent, Palo Alto, USA). Nosný plyn – Helium (99,998%, rychlost průtoku 0,9 ml/min, SIAD, Bergamo, Itálie). Injektor Agilent byl použit pro nástřik 1 $\mu$ l vzorku (Agilent, Palo Alto, USA).

- pH metr InoLab pH 720 (WTW, Weinheim, Německo)
- Elektrochemický analyzátor EcaFlow 120 GLP (Istran, Bratislava) řízený počítačem s programem EcaFlow verze 2.3 s kompaktní průtokovou měřící celou s pracovní porézni uhlíkovou elektrodou E56C



**Obr. 12** Průtokový analyzátor EcaFlow

- UV/Vis spektrometr Lambda 25 (PerkinElmer, USA) řízený počítačem s programem Wavelength, verze 2.85.04.



**Obr. 13** UV/VIS spektrometr Lambda

### 3.1.3. Vzorky čaje

Vzorky čaje byly zakoupeny v obchodech společnosti Oxalis, spol. s.r.o.

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Čína – Oblast Yunnan          | Pu - Erh (černý sypaný čaj)<br>Green Pu – Erh (zelený sypaný čaj)                                 |
| Indie – Oblast Assam          | Assam Hattialli TGOP (černý sypaný čaj)<br>Assam Green Tea OP (zelený sypaný čaj)                 |
| Indie – Oblast Darjeeling     | Darjeeling Noble SFTGFOP1 FF (černý sypaný čaj)<br>Darjeeling green Singbulli (zelený sypaný čaj) |
| Nepál – Oblast svahy Himaláji | Nepal Himalayan FTGFOP1 (černý sypaný čaj)<br>Nepal Green Tea Super Fine (zelený sypaný čaj)      |
| Srí Lanka – Oblast Sencha     | Ceylon Lovers‘ Leap (černý sypaný čaj)<br>Ceylon Sencha (zelený sypaný čaj)                       |

## 3.2. Stanovení antioxidační aktivity

### 3.2.1. Příprava elektrolytu (0,1M fosfátový pufr – PBS)

Elektrolyt byl připraven z 0,1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , jehož pH bylo upraveno 0,2 M roztokem NaOH na hodnotu 7,0.

### 3.2.2. Zásobní roztok askorbové kyseliny

Bylo naváženo 17,6000 mg pevné látky kyseliny askorbové, rozpuštěné v elektrolytu na přípravu 50 ml zásobního roztoku o koncentraci  $2 \cdot 10^{-3}$  mg/l.

### 3.2.3. Příprava vzorků čaje

Bylo naváženo 0,1000 g vzorků čaje, zalito 10 ml (100 °C, 80 °C, 60 °C) destilované vody a ponecháno 10 minut louhovat. Poté byly čajové nálevy zfiltrvány přes filtrační papír (modrá páska), a naředěny elektrolytem v 25 ml odměrné baňce na stejný objem.

### 3.2.4. Průtoková coulometrie

K proměření vzorků byl použit elektrochemický analyzátor EcaFlow 120 GLP řízený počítačem s programem EcaFlow. Po spuštění programu EcaFlow verze 2.3, byla nastavena metoda pro měření kyseliny askorbové a parametry měření (Tab. I). Po promytí průtokového systému destilovanou vodou, se hadičky pro elektrolyt a roztok standardu umístily do roztoku základního elektrolytu a hadička určena k nasávání vzorku se vkládala postupně do jednotlivých vzorků. Nejprve se provedla standardizace za použití standardu kyseliny askorbové o koncentraci  $2 \cdot 10^{-3}$  mg/l. Poté byly proměřovány všechny jednotlivé vzorky.

|                               |                              |
|-------------------------------|------------------------------|
| <b>Počáteční potenciál</b>    | <b>0 mV</b>                  |
| <b>Konečný potenciál</b>      | <b>800 mV</b>                |
| <b>Klidová doba</b>           | <b>30 s</b>                  |
| <b>Konstantní proud</b>       | <b>100 <math>\mu</math>A</b> |
| <b>Potenciál regenerace</b>   | <b>-750 mV</b>               |
| <b>Průtoková rychlost</b>     | <b>6 ml/min</b>              |
| <b>Dávkovaný objem vzorku</b> | <b>3 ml</b>                  |
| <b>Průtok během oxidace</b>   | <b>Vypnutý</b>               |

**Tab. I** Parametry při měření průtokové coulometrie

### 3.2.5. Výsledky a diskuze

Roztoky vzorků čaje byly připraveny při jednotlivých teplotách destilované vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty celkové antioxidační aktivity pro jednotlivé vzorky byly proměřeny průtokovou coulometrií.

V tabulkách II, III a IV jsou uvedeny naměřené průměrné hodnoty antioxidační aktivity (mg/l) a směrodatné odchylky (mg/l) pro jednotlivé teploty. Dále na obrázku 14 a 15 jsou porovnána množství antioxidačních aktivit jednotlivých druhů čaje v závislosti na teplotě destilované vody při výrobě extraktů.

Z obrázků 14 a 15 vyplývá, pokud je čaj zalit vodou o teplotě 60 °C zachovává si větší část antioxidantů. Čím vyšší je teplota vody, použité na přípravu čaje, tím se obsah antioxidantů snižuje. Z obrázku 16 je patrné, že zelené čaje mají vyšší obsah antioxidační

aktivity, což je způsobeno tím, že zelené čaje neprochází během výroby fermentací, tudíž jsou v zeleném čaji zachovány všechny zdraví prospěšné látky.

Lze na základě porovnání celkové antioxidační aktivity označit zelený čaj z oblasti Assam (Indie) a zelený čaj z oblasti Sencha (Ceylon) za kvalitní s vysokým obsahem antioxidantů. Také černý čaj z oblasti svahů Himalájí (Nepál) obsahuje vyšší množství antioxidantů, je možné že tento čaj neprochází tak výrazným procesem fermentace.

| <b>Druh čaje</b>                | <b>Průměrná hodnota<br/>TAA (mg/l)</b> | <b>Směrodatná<br/>odchylka (mg/l)</b> |
|---------------------------------|--|---------------------------------------|
| <b>Černý Pu-Erh</b>             | <b>0,02</b>                            | 0,00                                  |
| <b>Zelený Pu-Erh</b>            | <b>0,15</b>                            | 0,00                                  |
| <b>Černý Assam Hattialli</b>    | <b>0,05</b>                            | 0,00                                  |
| <b>Zelený Assam Green tea</b>   | <b>0,23</b>                            | 0,08                                  |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>    | <b>0,08</b>                            | 0,01                                  |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>   | <b>0,12</b>                            | 0,03                                  |
| <b>Černý Ceylon Lovers leap</b> | <b>0,12</b>                            | 0,03                                  |
| <b>Zelený Ceylon Sencha</b>     | <b>0,11</b>                            | 0,03                                  |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>   | <b>0,07</b>                            | 0,01                                  |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b>  | <b>0,08</b>                            | 0,02                                  |

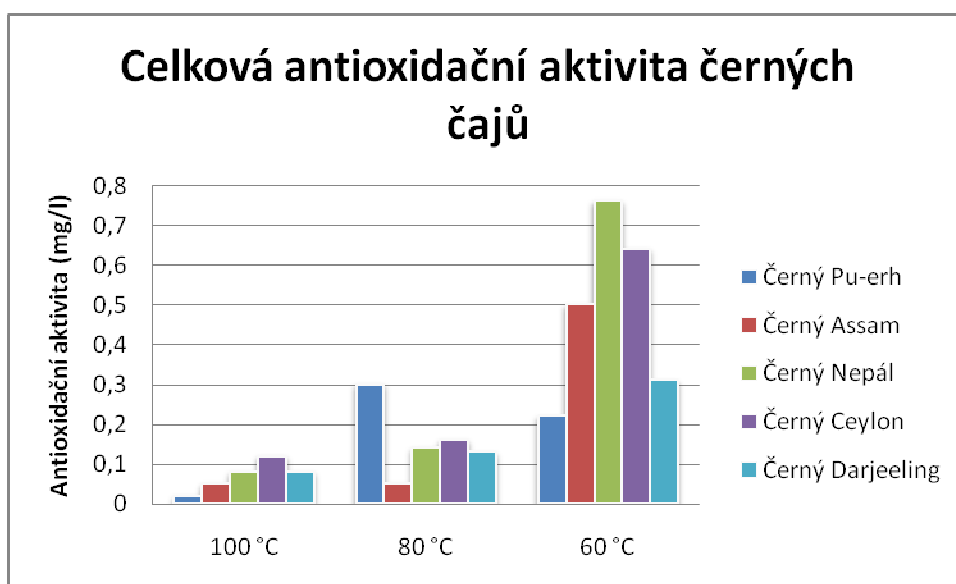
**Tab. II** Naměřené hodnoty celkové antioxidační aktivity u jednotlivých vzorků čaje, kdy vzorky čajů byly zality 100 °C destilovanou vodou

| <b>Druh čaje</b>                | <b>Průměrná hodnota<br/>TAA (mg/l)</b> | <b>Směrodatná<br/>odchylka (mg/l)</b> |
|---------------------------------|--|---------------------------------------|
| <b>Černý Pu-Erh</b>             | <b>0,30 mg/l</b>                       | 0,00                                  |
| <b>Zelený Pu-Erh</b>            | <b>0,21 mg/l</b>                       | 0,04                                  |
| <b>Černý Assam Hattialli</b>    | <b>0,05 mg/l</b>                       | 0,01                                  |
| <b>Zelený Assam Green tea</b>   | <b>0,34 mg/l</b>                       | 0,13                                  |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>    | <b>0,14 mg/l</b>                       | 0,03                                  |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>   | <b>0,14 mg/l</b>                       | 0,04                                  |
| <b>Černý Ceylon Lovers leap</b> | <b>0,16 mg/l</b>                       | 0,04                                  |
| <b>Zelený Ceylon Sencha</b>     | <b>0,24 mg/l</b>                       | 0,05                                  |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>   | <b>0,12 mg/l</b>                       | 0,05                                  |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b>  | <b>0,13 mg/l</b>                       | 0,03                                  |

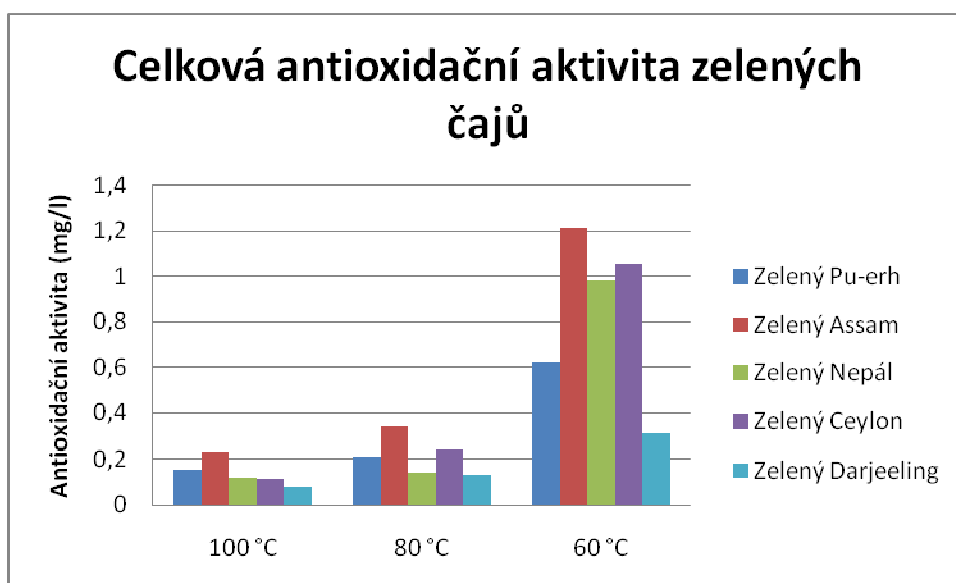
**Tab. III** Naměřené hodnoty celkové antioxidační aktivity u jednotlivých vzorků čaje, kdy vzorky čajů byly zality 80 °C destilovanou vodou

| <b>Druh čaje</b>                | <b>Průměrná hodnota<br/>TAA (mg/l)</b> | <b>Směrodatná<br/>odchylka (mg/l)</b> |
|---------------------------------|--|---------------------------------------|
| <b>Černý Pu-Erh</b>             | <b>0,22</b>                            | 0,00                                  |
| <b>Zelený Pu-Erh</b>            | <b>0,62</b>                            | 0,08                                  |
| <b>Černý Assam Hattialli</b>    | <b>0,50</b>                            | 0,01                                  |
| <b>Zelený Assam Green tea</b>   | <b>1,21</b>                            | 0,04                                  |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>    | <b>0,76</b>                            | 0,01                                  |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>   | <b>0,98</b>                            | 0,07                                  |
| <b>Černý Ceylon Lovers leap</b> | <b>0,64</b>                            | 0,13                                  |
| <b>Zelený Ceylon Sencha</b>     | <b>1,05</b>                            | 0,13                                  |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>   | <b>0,28</b>                            | 0,06                                  |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b>  | <b>0,31</b>                            | 0,08                                  |

**Tab. IV** Naměřené hodnoty celkové antioxidační aktivity u jednotlivých vzorků čaje, kdy vzorky čajů byly zality 60 °C destilovanou vodou

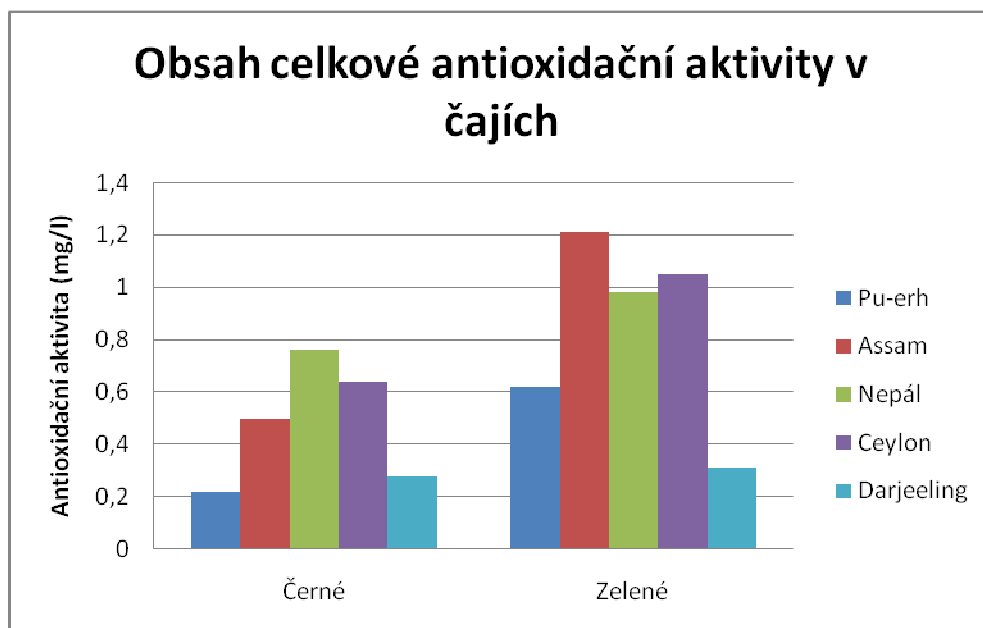


**Obr. 14** Porovnání celkové antioxidační aktivity černých čajů v závislosti na teplotě destilované vody při přípravě extraktů



**Obr. 15** Porovnání celkové antioxidační aktivity zelených čajů v závislosti na teplotě destilované vody při přípravě extraktů





**Obr. 16** Porovnání obsahu antioxidační aktivity v černých a zelených vzorcích čaje

### 3.3. Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu chlorofylu

K 0,1000 g vzorku bylo přidáno 20 ml acetonu, a necháno 10 min louhovat. Supernatant byl zfiltrován přes papírový filtr (modrá páska). Extrakt byl převeden do 25 ml odměrné baňky a doplněn acetonem po rysku. Pro analýzu bylo z roztoku odpipetováno 7 ml do zkumavky obsahující 10 ml diethyletheru. Následně se opatrně přidávala voda, dokud všechno barvivo nepřešlo do diethyletheru. Po každém přidavku malého množství vody (2 ml) se zkumavka se vzorkem nechala centrifugovat při maximálních otáčkách 2 minuty. Po centrifugaci se odstranila vodná fáze a diethyletherový extrakt se opět převedl do vody, tento proces se opakoval 4 krát. Nakonec byla změřena absorbance diethyletherového extraktu při vlnových délkách 660 a 642,5 nm proti diethyletheru.

Celkové množství chlorofylu se vypočítalo podle vztahu:

$$\text{Obsah chlorofylu [mg/l]} = 7,12 \cdot A_1 (660 \text{ nm}) + 16,8 \cdot A_2 (642,5 \text{ nm})$$

#### 3.3.1. Výsledky a diskuze

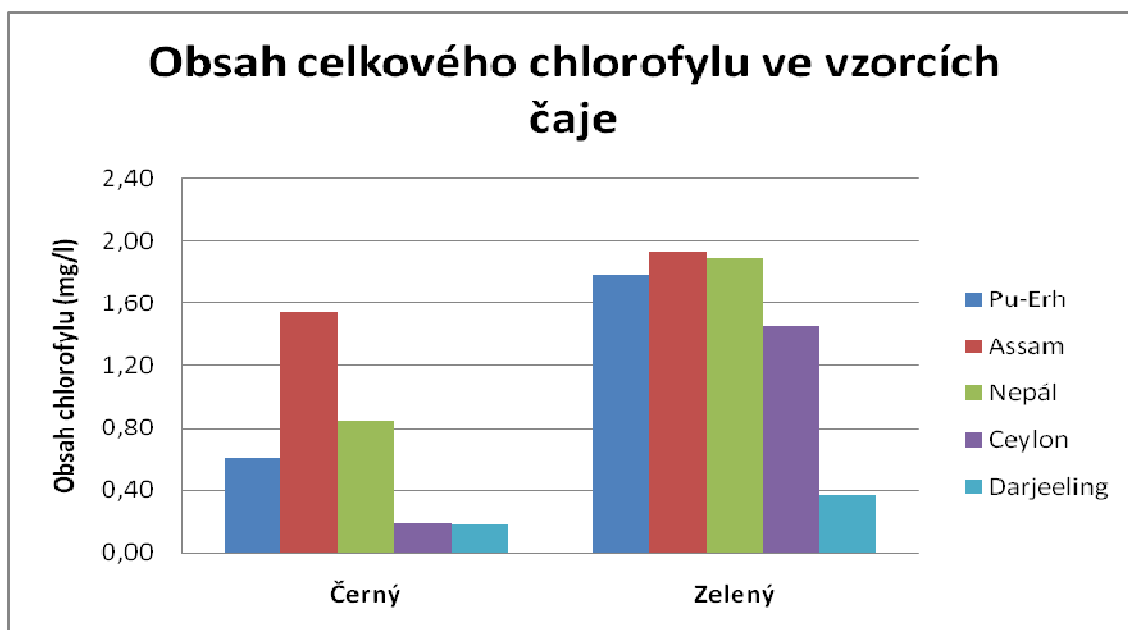
Připravené roztoky vzorků čaje byly proměřeny na UV – VIS spektrometru při vlnových délkách 660 a 642,5 nm proti čistému diethyletheru.

V tabulce V jsou uvedeny naměřené hodnoty absorbancí při daných vlnových délkách a vypočítaný obsah chlorofylu.

Jak lze vidět na obrázku 17, vyšší množství chlorofylu se nachází ve vzorcích zelených čajů, menší množství pak ve vzorcích černých čajů. Nevyšší množství chlorofylu bylo nalezeno v zeleném čaji z oblasti Assam (Indie).

|                                 | Absorbance při<br>660 nm | Absorbance při<br>642,5 nm | Obsah chlorofylu<br>(mg/l) |
|---------------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Černý Pu-Erh</b>             | 0,0546                   | 0,0131                     | <b>0,6088</b>              |
| <b>Zelený Pu-Erh</b>            | 0,1560                   | 0,0399                     | <b>1,7810</b>              |
| <b>Černý Assam Hattiali</b>     | 0,1283                   | 0,0373                     | <b>1,5401</b>              |
| <b>Zelený Assam Green tea</b>   | 0,1726                   | 0,0415                     | <b>1,9261</b>              |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>    | 0,0760                   | 0,0183                     | <b>0,8486</b>              |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>   | 0,1486                   | 0,0493                     | <b>1,8863</b>              |
| <b>Černý Ceylon Lovers leap</b> | 0,0155                   | 0,0043                     | <b>0,1826</b>              |
| <b>Zelený Ceylon Sencha</b>     | 0,1335                   | 0,0298                     | <b>1,4512</b>              |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>   | 0,0163                   | 0,0037                     | <b>0,1782</b>              |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b>  | 0,0337                   | 0,0079                     | <b>0,3727</b>              |

**Tab. V** Naměřené hodnoty pro stanovení celkového obsahu chlorofylu a vypočítaný obsah chlorofylu



**Obr. 17** Obsah celkového chlorofylu v jednotlivých vzorcích čaje

## 3.4. Stanovení účinnosti úpravy vzorků čajových extraktů

### 3.4.1. Příprava extraktů

Homogenizované vzorky čajů byly vysušeny při teplotě 70 °C po dobu 30 minut. 1,000 g vysušeného vzorku bylo vloženo do patrony o objemu 22 ml, a extrahováno akcelerovanou extrakcí rozpouštědlem na přístroji one PSE za podmínek uvedených v (Tab. VI). Získané extrakty byly centrifugovány při 6 000 otáčkách, po dobu 10 minut, následně přefiltrovány přes 0,22 µm LUT Syringe Filtry.

|                      |                      |
|----------------------|----------------------|
| <b>Teplota</b>       | <b>100 °C</b>        |
| <b>Tlak</b>          | <b>100 bar</b>       |
| <b>Doba extrakce</b> | <b>10 min</b>        |
| <b>Rozpouštědlo</b>  | <b>Methylalkohol</b> |

Tab. VI Parametry extrakce



Obr. 18 Extrakty připravené na přístroji one PSE

### 3.4.2. Vytřepání extraktů v diethyletheru

Extrakty byly vysušeny do sucha proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody, a převeden do dělicí nálevky s 10 ml diethyletheru. Po vytřepání a rozdělení

fázi byla odebrána vodná fáze, která byla za mírného varu odpařena do sucha. Odparek byl do provedení konečné analýzy uschován v mrazicím boxu.

### **3.4.3. Vytřepání extraktů v hexanu**

Extrakty byly v dělicí nálevce vytřepány s 20 ml hexanu. Methanolvá fáze byla odebrána a vysušena proudem dusíku do sucha. Odparek byl do provedení konečné analýzy uschován v mrazicím boxu.

### **3.4.4. Vytřepání extraktů v heptanu**

Extrakty byly v dělicí nálevce vytřepány s 20 ml heptanu. Methanolvá fáze byla odebrána a vysušena proudem dusíku do sucha. Odparek byl do provedení konečné analýzy uschován v mrazicím boxu.

### **3.4.5. Přechlazení extraktů za pomoci tetrachlormethanu**

Extrakty vzorků čaje získané z akcelerované extrakce rozpouštědlem, byly vysušeny proudem dusíku do sucha. Odparky byly methanolem naředěny na konstantní objem 1 ml. K 1 ml extraktu bylo přidáno 0,4 ml tetrachlormethanu a 0,6 ml destilované vody. Zkumavka s dvoufázovým systémem byla protřepána a centrifugována při 10 000 otáčkách po dobu 10 minut. K analýze byla odebrána horní, vodná vrstva.

### **3.4.6. Derivatizační proces**

Před koncovou analýzou prováděnou na plynovém chromatografu musela být provedena derivatizace.

Vzorky byly doplněny methanolem na objem 1ml. Pro derivatizaci bylo odebráno 100 µl vzorků čaje do skleněné vialky, tento extrakt byl vysušen proudem dusíku do sucha. Do vialky s odparkem bylo přidáno 75 µl pyridinu a 75 µl N, O – bis (trimethylsilyl) trifluoracetamidu (BSTFA). Reakční směs byla zahřívána při teplotě 80 °C po dobu 30 minut.

Po ochlazení bylo k reakční směsi přidáno 350  $\mu$ l hexanu. Poté byla provedena analýza na plynovém chromatografu.



**Obr. 19** Připravené reakční směsi k analýze na plynovém chromatografu

### 3.4.7. Výsledky a diskuze

Vzorky byly extrahovány akcelerovanou extrakcí rozpouštědlem na přístroji one PSE. Jedna série extraktů byla přečištěna vytřepáním do diethyletheru, druhá série byla vytřepána v hexanu, třetí byla vytřepána do heptanu a čtvrtá série byla přečištěna za pomoci tetrachlormethanu.

Pro měření vzorků byla použita plynová chromatografie s hmotnostní detekcí. Z důvodu nízké těkavosti fenolických látek ve vzorcích čaje bylo nutné provést nejprve derivatizační proces. Tento derivatizační proces byl proveden za použití BSTFA činidla v prostředí pyridinu. Identifikace fenolických látek v extraktech vzorků čaje byla provedena porovnáním hmotnostního spektra a retenčních časů hledané látky s knihovnou spekter.

Metoda pro posouzení účinnosti čistícího kroku byla použita UV-VIS spektrometrie. V plynové chromatografii byly porovnány plochy píků fenolických látek v přečištěných a nepřečištěných extraktech vzorků čaje. U nepřečištěného vzorku byla nalezena kyselina gallová, kyselina chlorogenová, epikatechin a epigalokatechin gallát. Tyto látky byly porovnány se standardy. Při přečištění došlo u vzorků ke ztrátě kyseliny chlorogenové. V UV-VIS spektrometrii byly porovnány intenzity absorbancí přečištěných a nepřečištěných vzorků.

V tabulce VII jsou uvedeny retenční časy a ionty použité pro identifikaci v plynové chromatografii.

|                               | <b>t<sub>r</sub> (min)</b> | <b>Ionty (m/z)</b> |
|-------------------------------|----------------------------|--------------------|
| <b>Gallová kyselina</b>       | 19,59                      | 458, 281           |
| <b>Epikatechin</b>            | 26,98                      | 368, 355           |
| <b>Epigalokatechin gallát</b> | 36,40                      | 648, 369, 559      |

**Tab. VII** Retenční časy a fragmenty použité pro identifikaci

V tabulce VIII - X jsou porovnány plochy píků pro kyselinu gallovou, epikatechin a epigalokatechin gallát u jednotlivých přečištěných a nepřečištěných extraktů vzorků čaje. V tabulce XI jsou porovnány absorbance přečištěných a nepřečištěných extraktů vzorků čaje.

Bylo potvrzeno, že zelený čaj obsahuje vyšší množství katechinů než černý čaj. Naše nepřečištěné vzorky zelených čajů obsahovaly nejen větší obsah epikatechinu a epigalokatechin gallátu, ale také kyseliny chlorogenové. Černé čaje vykazovaly větší obsah kyseliny gallové, k tomu může docházet na základě tvrzení, že některé katechiny při výrobě černého čaje nejen že vytváří epimery, ale také uvolňují kyselinu gallovou. Z plynového chromatogramu na obrázku 25 lze vidět, že nepřečištěné černé čaje obsahují více nečistot než nepřečištěné zelené čaje. Při přečištění extraktů došlo ve všech případech k viditelnému snížení nečistot a ke ztrátě kyseliny chlorogenové. Z obrázku 20 – 22 lze pozorovat, že nedošlo k výraznému poklesu nebo ke ztrátě katechinů, které nám v tomto případě sloužily jako ukazatele účinnosti přečištění.

Na obrázku 20 lze pozorovat viditelný nárůst plochy píků kyseliny gallové po přečištění. Nárůst může být způsoben, že při přečištění dochází k uvolňování kyseliny gallové. Nejnižší nárůst kyseliny gallové proběhl při přečištění heptanem. A k nejvyššímu nárůstu došlo při přečištění diethyletherem.

U epikatechinu a epigalokatechin gallátu došlo při přečištění k mírnému poklesu ploch píků. Obsah epikatechinu byl zachován ve značné míře při přečištění hexanem a diethyletherem. K nejmenšímu poklesu epigalokatechin gallátu proběhlo při přečištění heptanem a tetrachlormethanolem.

Za pomoci srovnávací metody UV-VIS jsme potvrdili, že černé čaje obsahují větší množství nečistot. Z obrázku 23 vyplývá, že při přečištění hexanem a diethyletherem jsme odstranili větší část nečistot a přitom nedošlo ke ztrátě cílových analytů.

| <b>Kyselina Gallová</b>        | <b>Přečištěné</b>       |                            |          |
|--------------------------------|-------------------------|----------------------------|----------|
|                                | <b>Heptanem</b>         | <b>Nepřečištěný vzorek</b> | <b>%</b> |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>   | 295019927               | 318769532                  | 92,55    |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>  | 265531357               | 324069611                  | 81,94    |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>  | 223041303               | 292369768                  | 76,29    |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b> | 270827461               | 269567131                  | 100,47   |
|                                | <b>Hexanem</b>          | <b>Nepřečištěný vzorek</b> | <b>%</b> |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>   | 473776601               | 318769532                  | 148,63   |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>  | 341971534               | 324069611                  | 105,52   |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>  | 415944975               | 292369768                  | 142,27   |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b> | 265729369               | 269567131                  | 98,58    |
|                                | <b>Diethyletherem</b>   | <b>Nepřečištěný vzorek</b> | <b>%</b> |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>   | 575449865               | 318769532                  | 180,52   |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>  | 494948578               | 324069611                  | 152,73   |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>  | 570693516               | 292369768                  | 195,20   |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b> | 352091050               | 269567131                  | 130,61   |
|                                | <b>Tetrachlormethan</b> | <b>Nepřečištěný vzorek</b> | <b>%</b> |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>   | 462753304               | 318769532                  | 145,17   |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>  | 429735054               | 324069611                  | 132,61   |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>  | 521051405               | 292369768                  | 178,22   |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b> | 479463324               | 269567131                  | 177,86   |

**Tab. VIII** Porovnání velikostí píků kyseliny gallové u nepřečištěných a přečištěných vzorků čaje

| <b>Epikatechin</b>             | <b>Přečištěné</b>       |                            |          |
|--------------------------------|-------------------------|----------------------------|----------|
|                                | <b>Heptanem</b>         | <b>Nepřečištěný vzorek</b> | <b>%</b> |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>   | 718611803               | 928163369                  | 77,42    |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>  | 769063014               | 996673397                  | 77,16    |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>  | 470745217               | 817287393                  | 57,60    |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b> | 863913704               | 1269244110                 | 68,07    |
|                                | <b>Hexanem</b>          | <b>Nepřečištěný vzorek</b> | <b>%</b> |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>   | 922907607               | 928163369                  | 99,43    |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>  | 855450753               | 996673397                  | 85,83    |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>  | 752269287               | 817287393                  | 92,04    |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b> | 847668640               | 1269244110                 | 66,79    |
|                                | <b>Diethyletherem</b>   | <b>Nepřečištěný vzorek</b> | <b>%</b> |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>   | 837063162               | 928163369                  | 90,18    |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>  | 972146446               | 996673397                  | 97,54    |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>  | 605262351               | 817287393                  | 74,06    |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b> | 872231726               | 1269244110                 | 68,72    |
|                                | <b>Tetrachlormethan</b> | <b>Nepřečištěný vzorek</b> | <b>%</b> |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>   | 760342748               | 928163369                  | 81,92    |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>  | 574574122               | 996673397                  | 57,65    |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>  | 466794838               | 817287393                  | 57,12    |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b> | 583892668               | 1269244110                 | 46,00    |

**Tab. IX** Porovnání velikostí píků epikatechinu u nepřečištěných a přečištěných vzorků čaje



| <b>Epigalokatechin<br/>gallát</b> | <b>Přečištěné</b>       |                            |          |
|-----------------------------------|-------------------------|----------------------------|----------|
|                                   | <b>Heptanem</b>         | <b>Nepřečištěný vzorek</b> | <b>%</b> |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>      | 478017125               | 682433009                  | 70,05    |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>     | 423242541               | 445503053                  | 95,00    |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>     | 178065328               | 754740238                  | 23,59    |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b>    | 471987109               | 693673960                  | 68,04    |
|                                   | <b>Hexanem</b>          | <b>Nepřečištěný vzorek</b> | <b>%</b> |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>      | 272978227               | 682433009                  | 40,00    |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>     | 264617689               | 445503053                  | 59,40    |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>     | 256335079               | 754740238                  | 33,96    |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b>    | 237270861               | 693673960                  | 34,20    |
|                                   | <b>Diethyletherem</b>   | <b>Nepřečištěný vzorek</b> | <b>%</b> |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>      | 116961372               | 682433009                  | 17,14    |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>     | 88614393                | 445503053                  | 19,89    |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>     | 308854897               | 754740238                  | 40,92    |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b>    | 86046584                | 693673960                  | 12,40    |
|                                   | <b>Tetrachlormethan</b> | <b>Nepřečištěný vzorek</b> | <b>%</b> |
| <b>Černý Nepal Himalayan</b>      | 342414432               | 682433009                  | 50,18    |
| <b>Zelený Nepal green tea</b>     | 369147883               | 445503053                  | 82,86    |
| <b>Černý Darjeeling Noble</b>     | 477579715               | 754740238                  | 63,28    |
| <b>Zelený Darjeeling Green</b>    | 206169685               | 693673960                  | 29,72    |

**Tab. X** Porovnání velikostí píků Epigalokatechin gallátu u nepřečištěných a přečištěných vzorků čaje

**Přečištění extraktů vytřepáním do heptanu**

|                         | Absorbance        |                     | Nečistoty    |
|-------------------------|-------------------|---------------------|--------------|
|                         | Přečištěný vzorek | Nepřečištěný vzorek | %            |
| Černý Nepal Himalayan   | 2,2405            | 3,043               | <b>26,37</b> |
| Zelený Nepal green tea  | 2,2894            | 2,5789              | <b>11,23</b> |
| Černý Darjeeling Noble  | 1,9066            | 2,6964              | <b>29,29</b> |
| Zelený Darjeeling Green | 2,2147            | 2,3862              | <b>7,19</b>  |

**Přečištění extraktů vytřepáním do hexanu**

|                         | Absorbance        |                     | Nečistoty    |
|-------------------------|-------------------|---------------------|--------------|
|                         | Přečištěný vzorek | Nepřečištěný vzorek | %            |
| Černý Nepal Himalayan   | 2,0151            | 3,043               | <b>33,78</b> |
| Zelený Nepal green tea  | 2,0492            | 2,5789              | <b>20,54</b> |
| Černý Darjeeling Noble  | 1,9935            | 2,6964              | <b>26,07</b> |
| Zelený Darjeeling Green | 2,2913            | 2,3862              | <b>3,98</b>  |

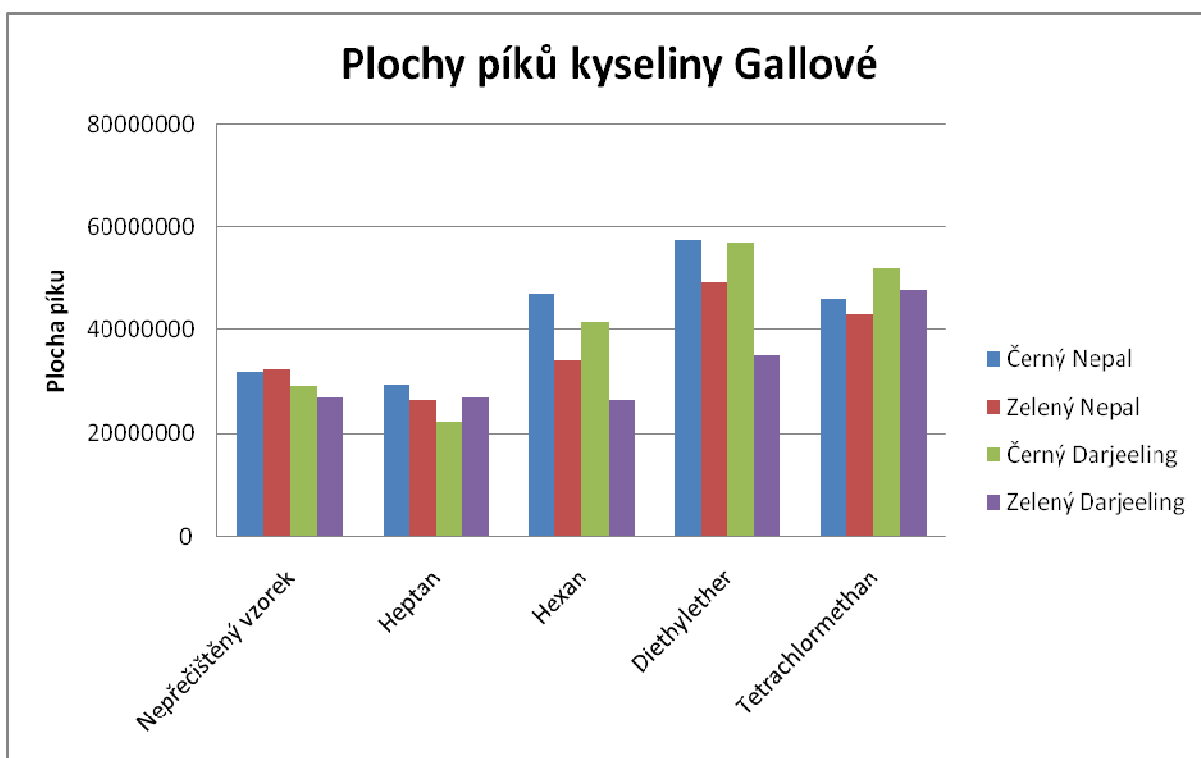
**Přečištění extraktů vytřepáním do Diethyletheru**

|                         | Absorbance        |                     | Nečistoty    |
|-------------------------|-------------------|---------------------|--------------|
|                         | Přečištěný vzorek | Nepřečištěný vzorek | %            |
| Černý Nepal Himalayan   | 2,1376            | 3,043               | <b>29,75</b> |
| Zelený Nepal green tea  | 2,159             | 2,5789              | <b>16,28</b> |
| Černý Darjeeling Noble  | 2,1379            | 2,6964              | <b>20,71</b> |
| Zelený Darjeeling Green | 2,1711            | 2,3862              | <b>9,01</b>  |

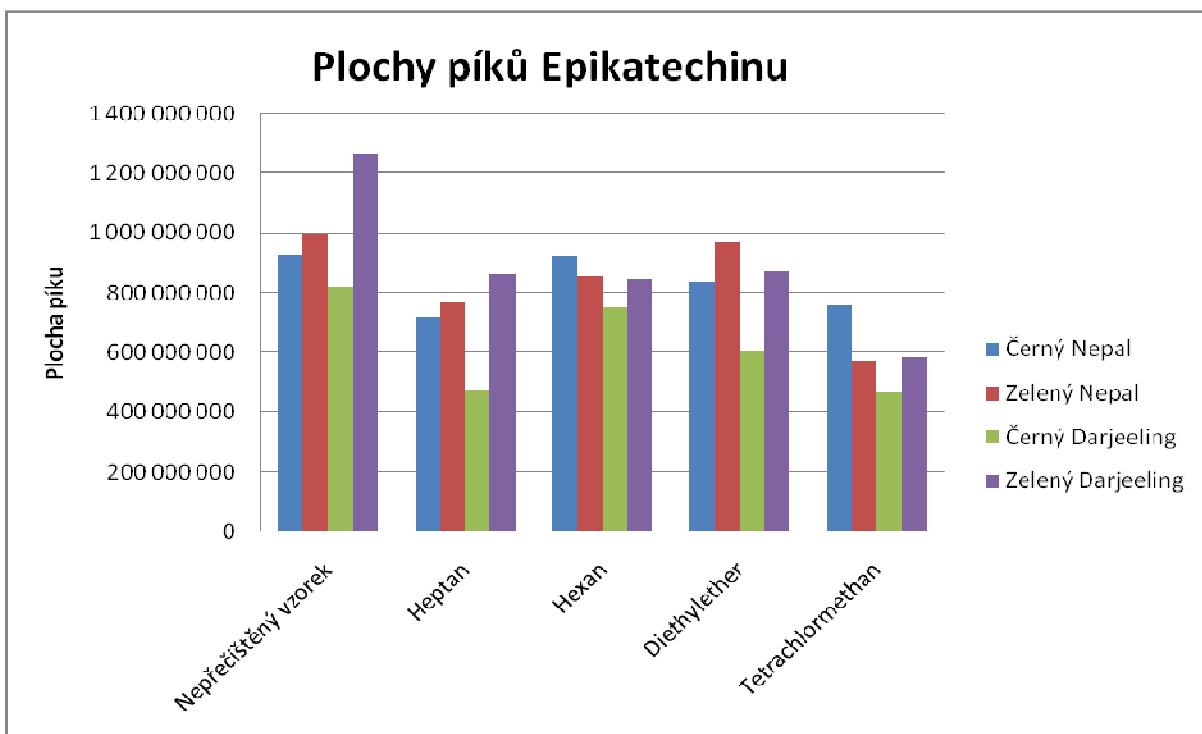
**Přečištění extraktů za použití tetrachlormethan**

|                         | Absorbance        |                     | Nečistoty    |
|-------------------------|-------------------|---------------------|--------------|
|                         | Přečištěný vzorek | Nepřečištěný vzorek | %            |
| Černý Nepal Himalayan   | 2,4658            | 3,043               | <b>18,97</b> |
| Zelený Nepal green tea  | 1,9937            | 2,5789              | <b>22,69</b> |
| Černý Darjeeling Noble  | 2,1788            | 2,6964              | <b>19,20</b> |
| Zelený Darjeeling Green | 2,2232            | 2,3862              | <b>6,83</b>  |

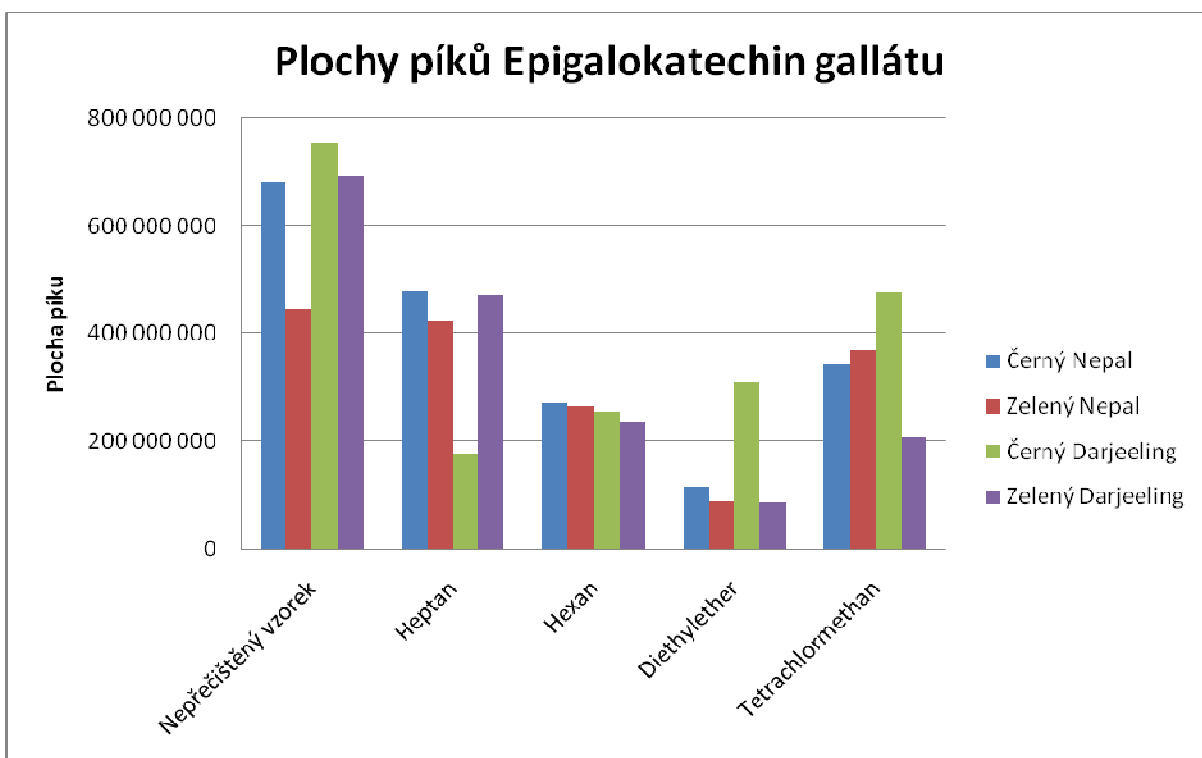
**Tab. XI** Porovnání absorbcí u nepřečištěných a přečištěných extraktů vzorků čaje a vypočtená procenta odstraněných nečistot



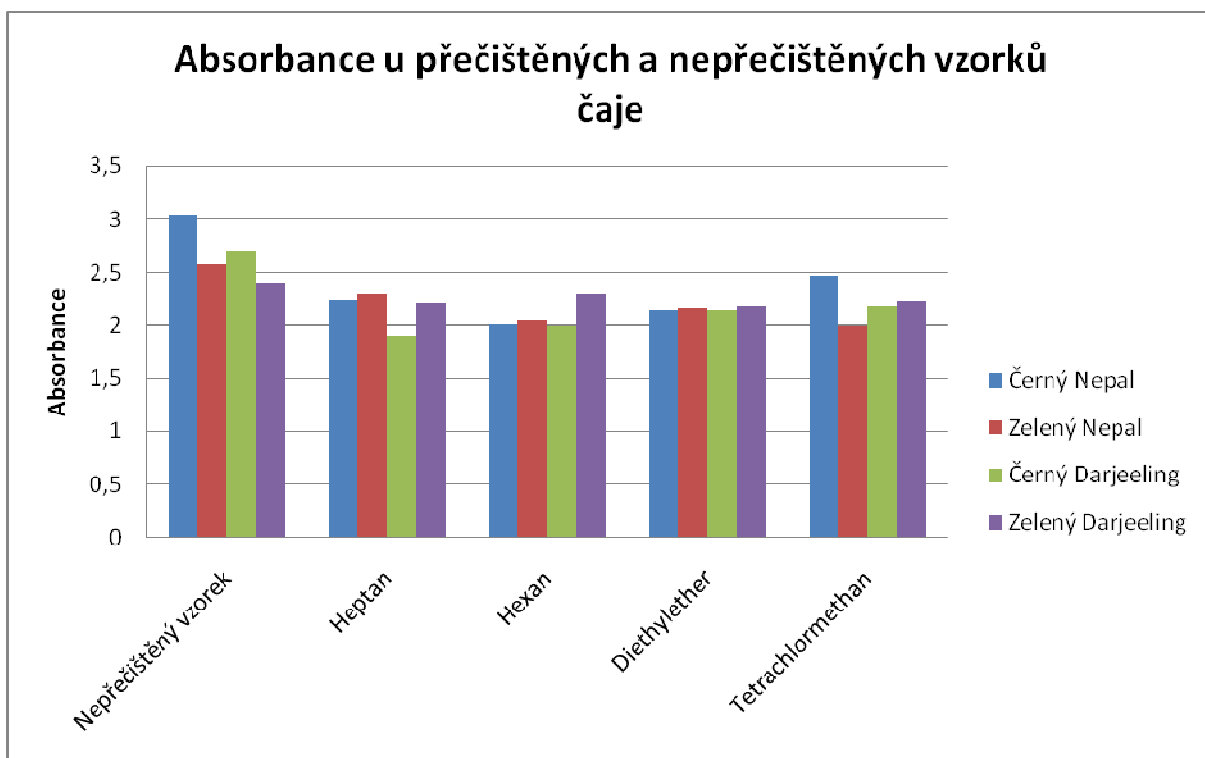
**Obr. 20** Porovnání ploch píků kyseliny gallové u nepřečištěných a přečištěných extraktů vzorků čaje



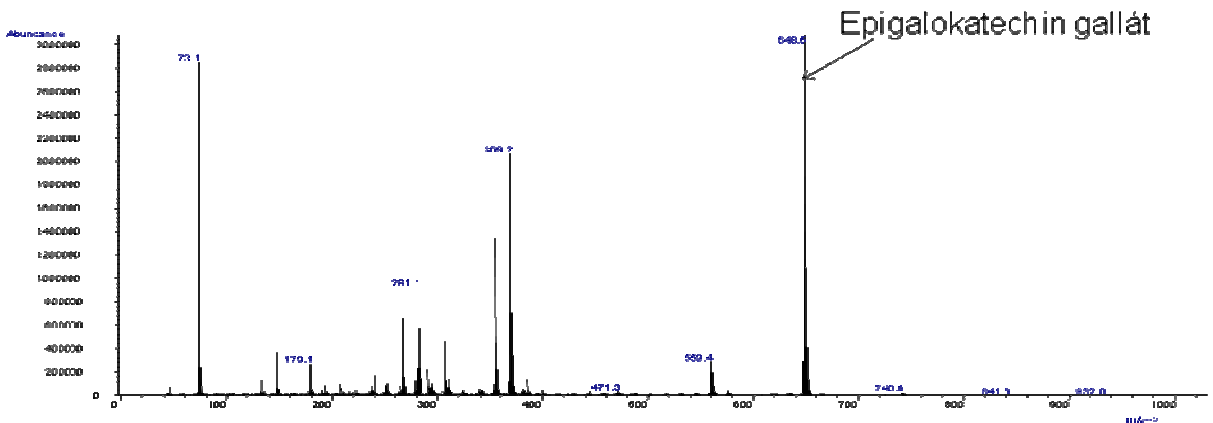
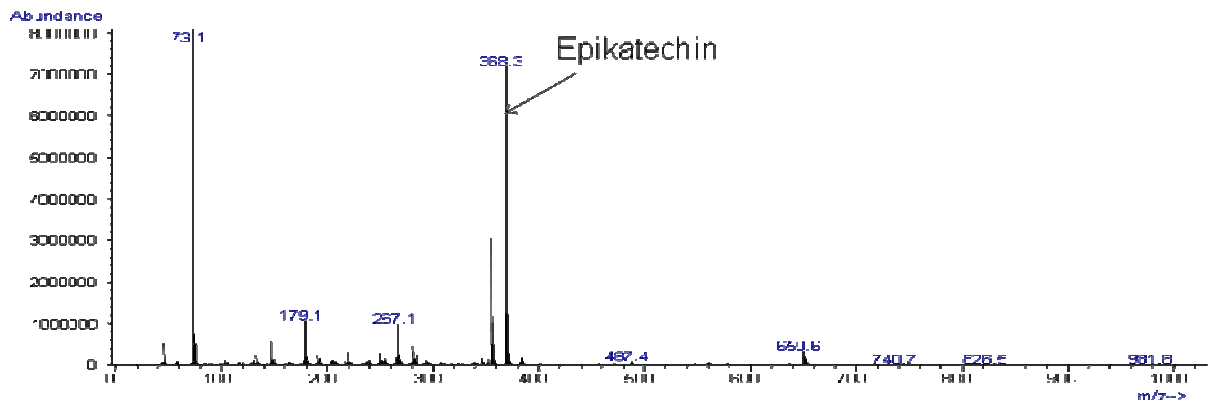
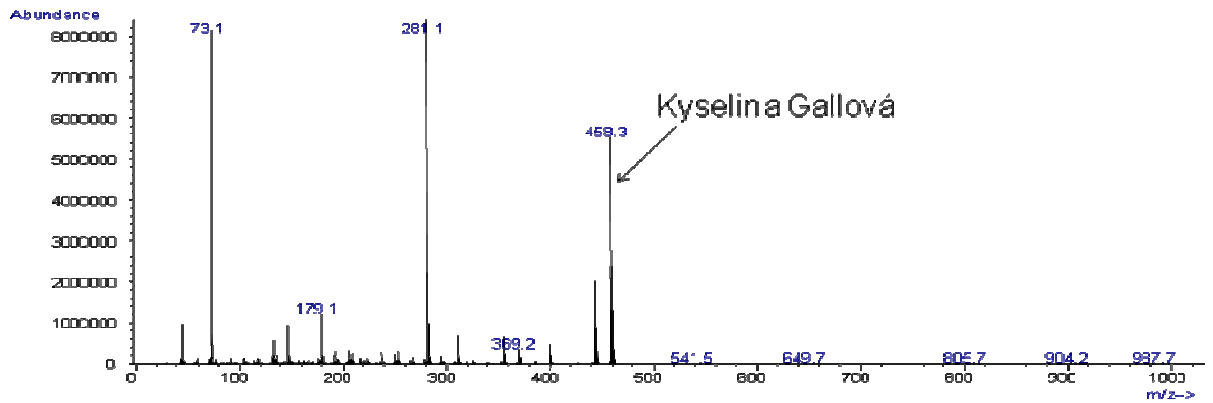
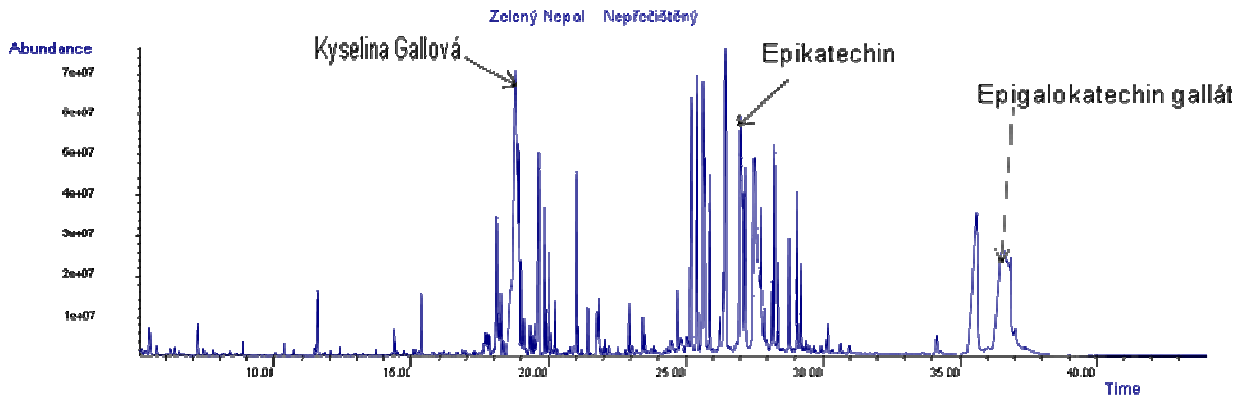
**Obr. 21** Porovnání ploch píků epikatechinu u nepřečištěných a přečištěných extraktů vzorků čaje



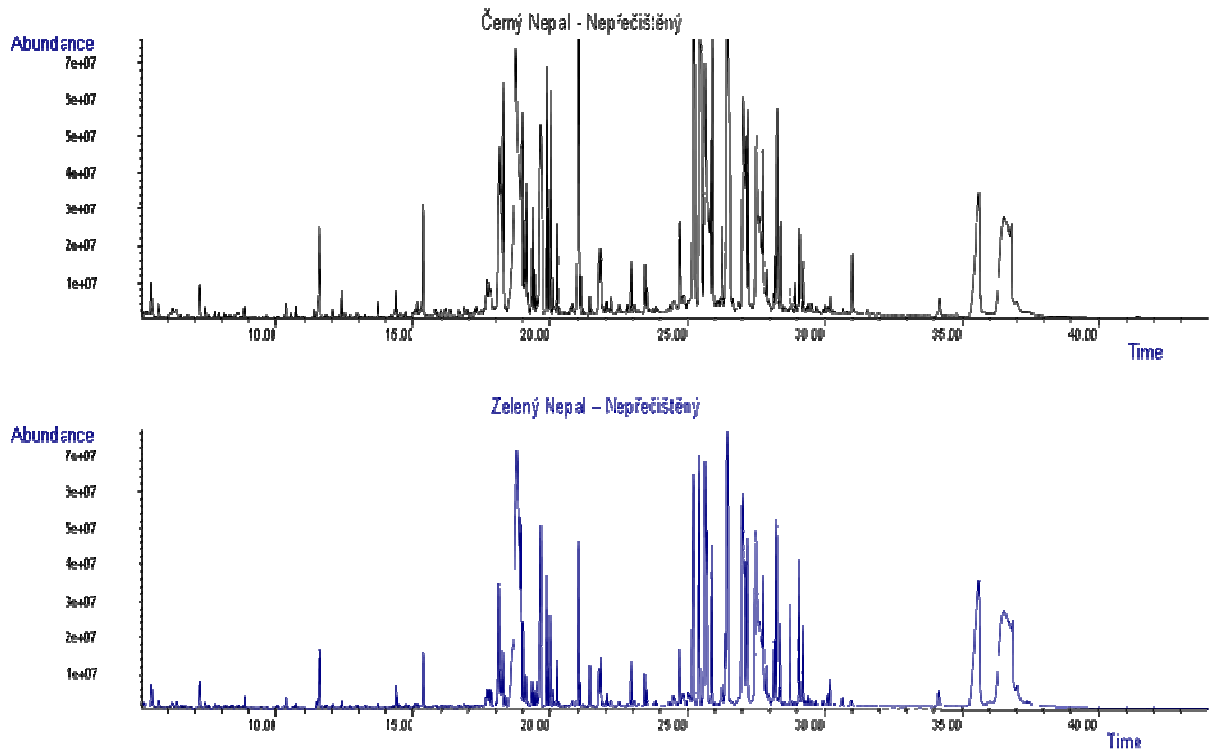
**Obr. 22** Porovnání ploch píků epigalokatechin gallátu u nepřečištěných a přečištěných extraktů vzorků čaje



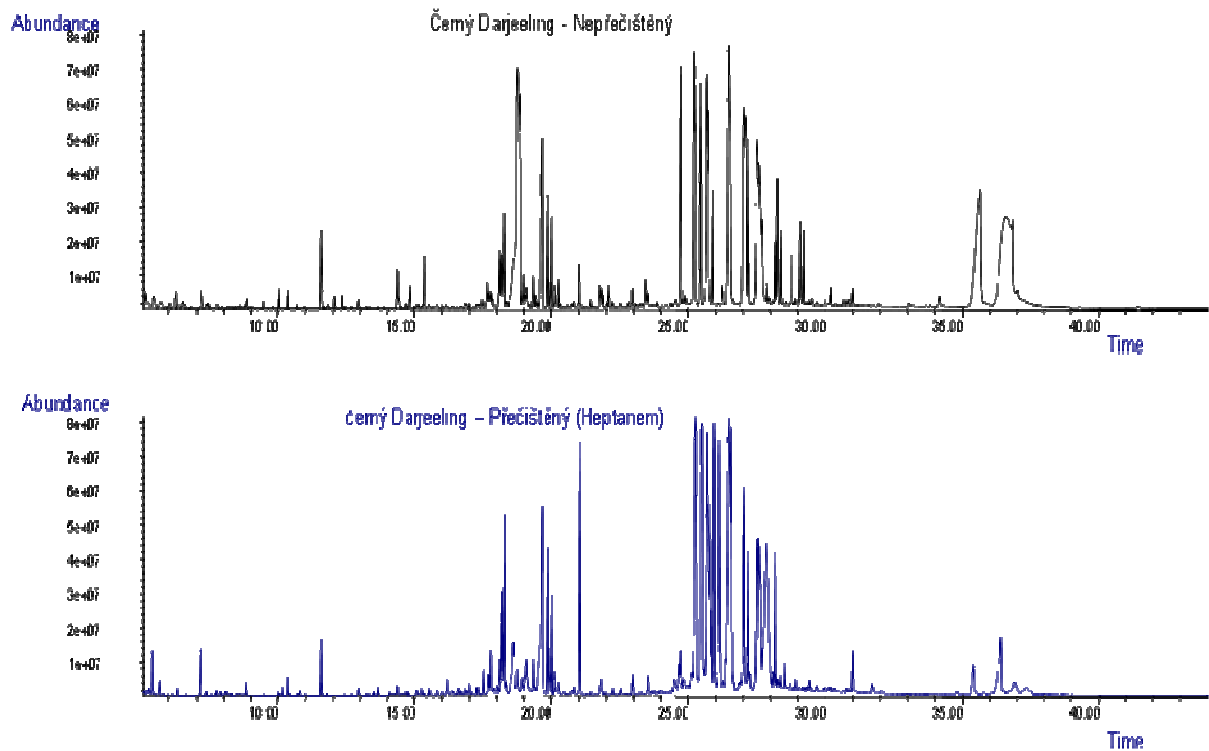
**Obr. 23** Porovnání absorbancí u přečištěných a nepřečištěných extraktů vzorků čaje



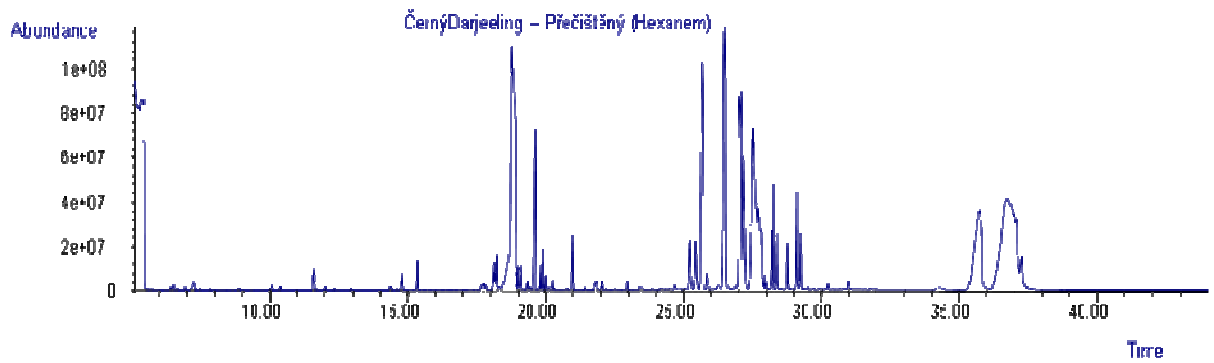
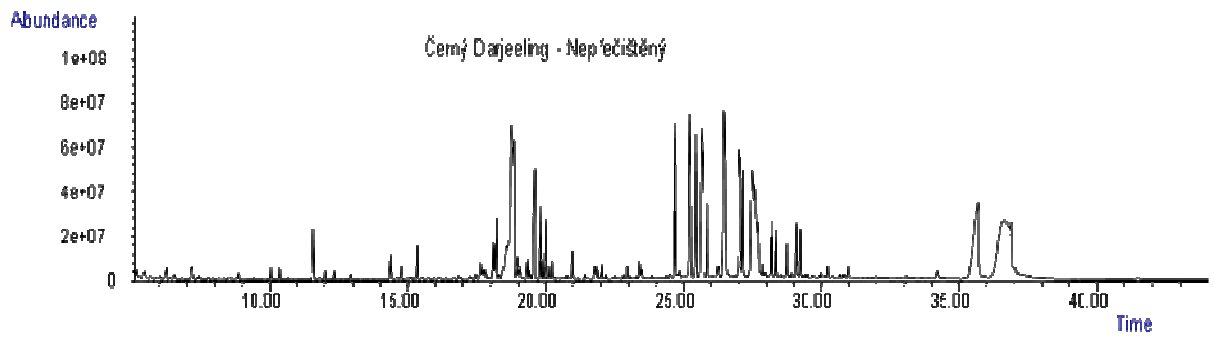
Obr. 24 Chromatogram nepřečištěného vzorku čaje, hmotnostní spektrum cílových analytů



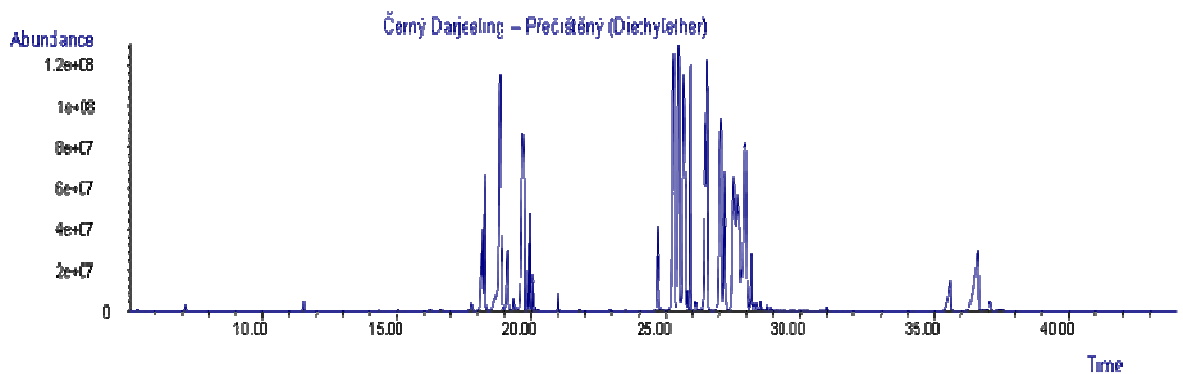
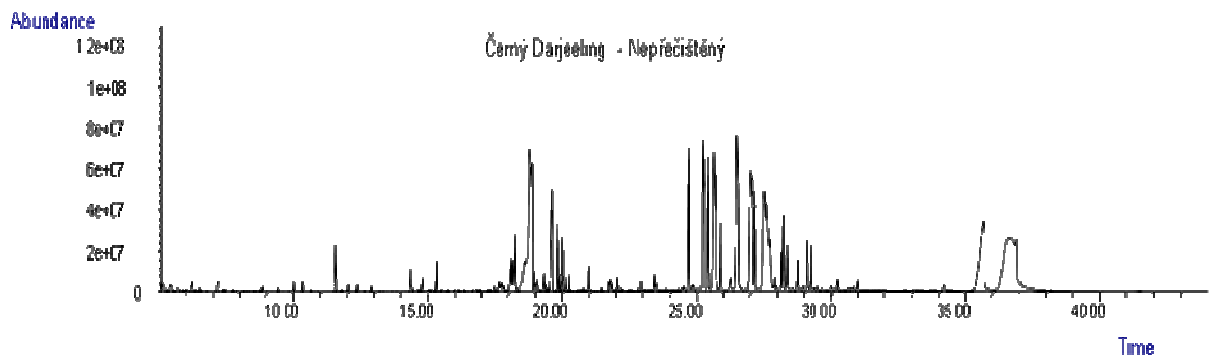
Obr. 25 Chromatogramy nepřečištěných extraktů čaje Nepal



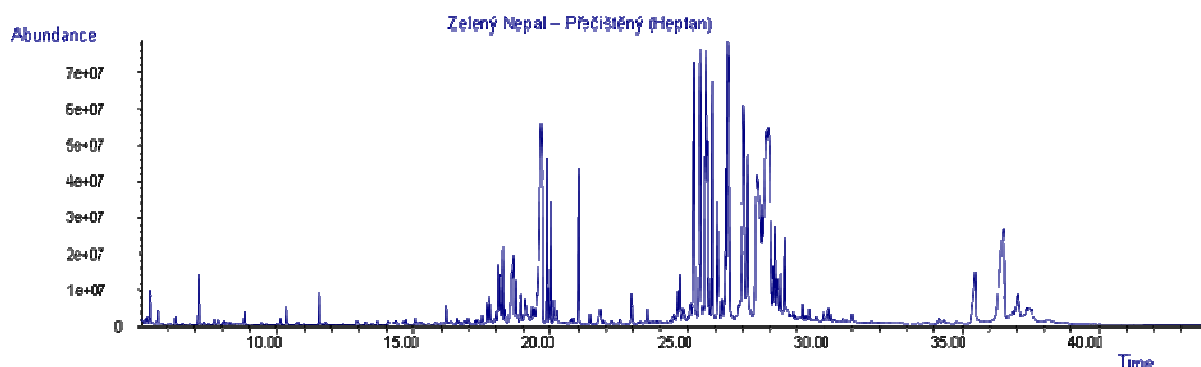
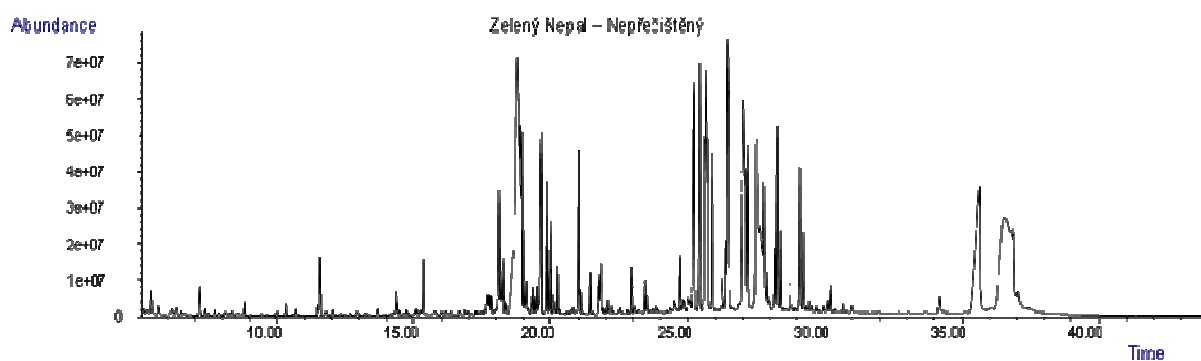
Obr. 26 Porovnání chromatogramů u nepřečištěného a přečištěného černého čaje Darjeeling



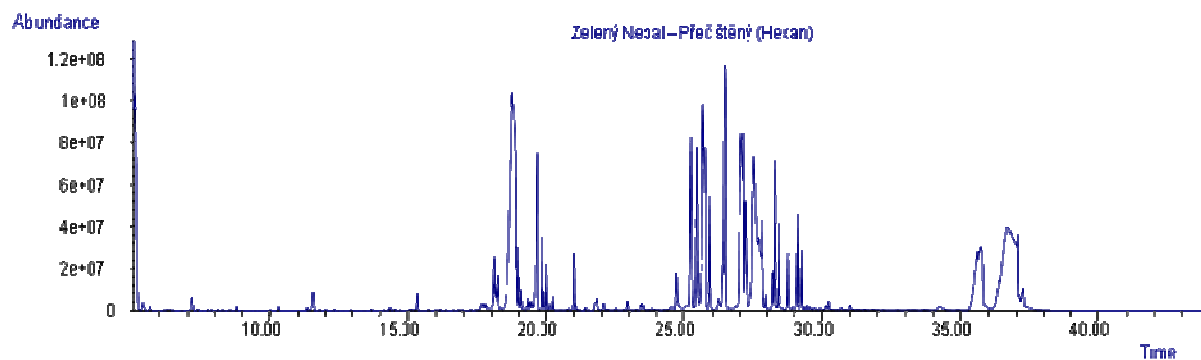
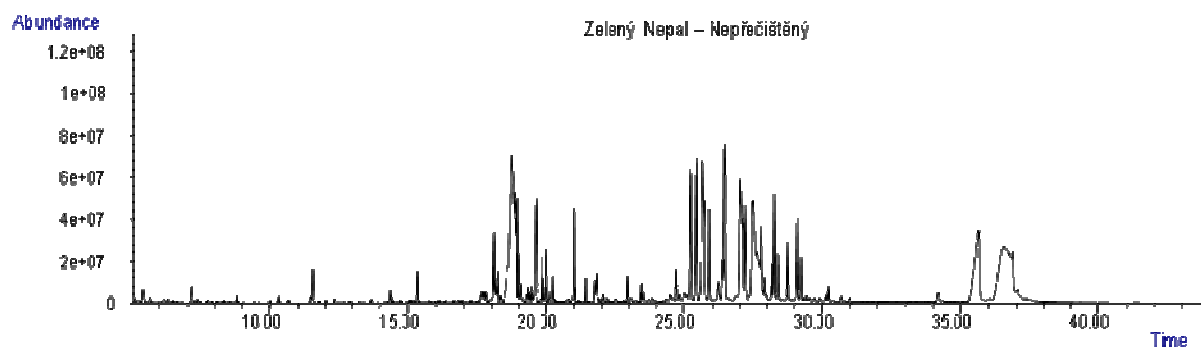
Obr. 27 Porovnání chromatogramů u nepřečištěného a přečištěného černého čaje Darjeeling



Obr. 28 Porovnání chromatogramů u nepřečištěného a přečištěného černého čaje Darjeeling

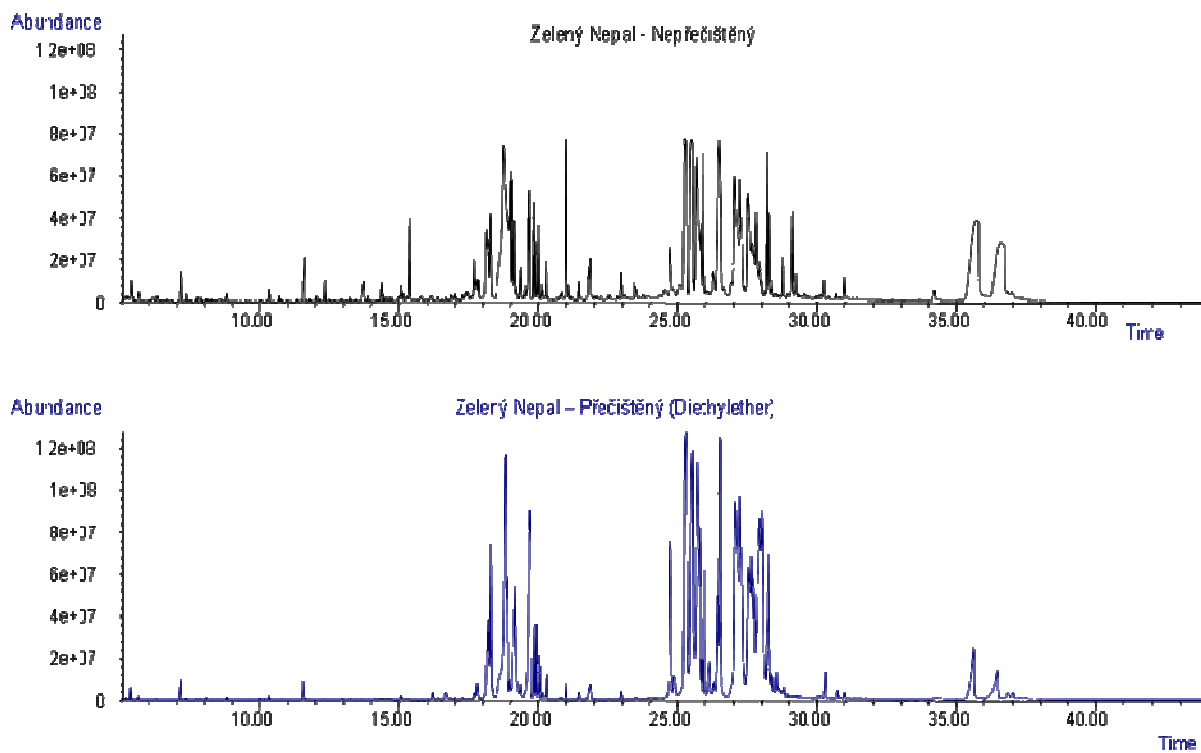


Obr. 29 Porovnání chromatogramů nepřečištěného a přečištěného vzorku zeleného čaje Nepal



Obr. 30 Porovnání chromatogramů nepřečištěného a přečištěného vzorku zeleného čaje Nepal





**Obr. 31** Porovnání chromatogramů nepřečištěného a přečištěného vzorku zeleného čaje Nepal

## 4. Závěr

Nejprve byla proměřena antioxidační aktivita vzorků čaje za pomoci průtokové coulometrie. Pro přípravu čajových roztoků vzorků byly použity 3 teploty destilované vody (60, 80 a 100 °C). Na základě získaných hodnot můžeme konstatovat, že čaje si zachovávají antioxidanty a látky zdraví prospěšné, když při přípravě čaje použijeme vodu o teplotě 60 °C. Zelené čaje obsahují vyšší obsah antioxidantů než čaje černé. Zelený čaj z oblasti Assam (Indie) obsahoval nejvyšší množství antioxidantů. Dále byl proměřen obsah chlorofylu. Opět se potvrdilo, že zelené čaje obsahují vyšší obsah chlorofylu. Nejvyšší množství chlorofylu bylo nalezeno v zeleném čaji z oblasti Assam (Indie).

Hlavním cílem práce bylo zjistit, které z rozpouštědel dokáže odstranit z extraktů vzorků čaje co největší množství nečistot a zároveň zachovat cílové analyty, v našem případě kyselinu gallovou, epikatechin a epigalokatechin gallát. Byly připraveny čajové extrakty, které byly přečištěny za použití čtyř rozpouštědel: heptan, hexan, diethylether a tetrachlormethan. Vzorky byly proměřeny na plynovém chromatografu a jako srovnávací metoda byla použita UV-VIS spektrometrie. Ve všech případech došlo k částečnému odstranění nečistot. Nejeftektivnější čištění bylo za použití hexanu a diethyletheru.

## 5. Použitá literatura

1. Wachendorf V.: *Čaj*. Slovart, Praha 2007.
2. Chow K. B., Krammer I.: *Všechny čaje Číny*. DharmaGaia, Praha 2002.
3. <http://www.asianflora.com/Theaceae/Camellia-sinensis-2.jpg>, staženo dne 28.3.2014.
4. <http://www.asianflora.com/Theaceae/Camellia-assamica-1.jpg>, staženo dne 28.3.2014.
5. Kocman J. H.: *Čajové minimum*. Sursum, Tišnov 2000.
6. Thomová S., Thoma M., Thoma Z.: *Příběh čaje*. Argo, Praha 2002.
7. Pettigrew J.: *Čaj : Rádce pro znalce*, Slovart, Praha 2001.
8. Arcimovičová J., Valíček P.: *Vůně čaje*. Start, Benešov 2000.
9. Norman J., Edmonds G.: *Čaje a byliny*. Slovart, Praha 2004.
10. Harbowy M. E., Balentine D. A., Davies A. P., Cai Y.: Critical Reviews in Plant Sciences **16**, 415 - 480 (1997).
11. Frei B., Higdon J.V.: The Journal of nutrition **133**, 3275 - 3284 (2003).
12. Wang H., Provan G. J., Helliwell K.: Trends in Food Science & Technology **11**, 152 – 160 (2000).
13. OPEKAR F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Karolinum, Praha 2010.
14. <http://www.celostnimediceina.cz/1-theanin.htm>, staženo dne 18.3.2014.
15. Ošřádalová M., Pažout V., Straka I.: Potravinářstvo **4**, 552 – 557 (2010).
16. Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin 3*. OSSIS, Tábor 2009.
17. Klouda P., *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, Ostrava 2003.
18. Churáček J.: *Analytická separace látek*. Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1990.
19. Carabias-Martínez R., Rodríguez-Gonzalo E., Revilla-Ruiz P., Hernández-Méndez J.: Journal of Chromatography A **1089**, 1-17 (2005).
20. Luthria D., Vinjamoori D., Noel K., Ezzell J.: *Accelerated Solvent Extraction*, str. 25. In: Symposium, Critical issues, current and emerging technologies for determination of crude fat content in food, feed and seeds; Oil extraction and analysis, Ed. AOCS Press, Champaigne 2004.
21. <http://www.cyberlipid.org/extract/extr0009.htm>, staženo dne 29.3.2014.
22. Kurečková K., Ventura K., Eisner A., Adam M.: Chem. Listy **95**, 415 - 419 (2001).

23. Sapkale G.N., Patil S. M., Surwase U. S., Bhatbhage P. K.: *Int. J. Chem. Sci.* **8**, 729 - 743 (2010).
24. [http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1365\\_s10337-008-0937-3-7](http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1365_s10337-008-0937-3-7), staženo dne 30.3.2014.
25. Majors R.E.: *LC-GC Int* **9**, 638-648 (1996).
26. Wang L., Weller C.L.: *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 300-312 (2006).
27. Piñeiro Z., Palma M., Barroso C. G.: *Journal of chromatography A* **1026**, 19-23 (2004).
28. Xia T., Shi S., Wan X.: *Journal of Food Engineering* **74**, 557-560 (2006).
29. Ridgway K., Lalljie S. P., Smith R. M.: *Journal of Chromatography A* **1153**, 36-53 (2007).
30. Stalikas C. D.: *Journal of separation science* **30**, 3268-3295 (2007).
31. Buldini P. L., Ricci L., Sharma J. L.: *Journal of Chromatography A* **975**, 47-70 (2002).
32. <http://orgchem.colorado.edu/Technique/Procedures/TLC/TLC.html>, staženo dne 7.4.2014
33. <http://orgchem.colorado.edu/Technique/Procedures/Columnchrom/Columnchrom.html>, staženo dne 7.4.2014
34. Dalluge J. J., Nelson B. C.: *Journal of Chromatography A* **881**, 411-424 (2002).
35. Holzbacher Z., Churáček J. a kolektiv: *Analytická chemie*, SNTL, Praha 1987.
36. Bronner W. E., Beecher G. R.: *Journal of chromatography A* **805**, 137-142 (1998).
37. Goto T., Yoshida Y., Kiso M., Nagashima H.: *Journal of Chromatography A* **749**, 295-299 (1996).
38. Wang H., Helliwell K., You, X.: *Food Chemistry* **68**, 115-121 (2000).
39. Zuo Y., Chen H., Deng Y.: *Talanta* **57**, 307-316 (2002).
40. Rahim A. A., Nofrizal S., Saad, B.: *Food chemistry* **147**, 262-268 (2014).
41. Narumi K., Sonoda J. I., Shiotani K., Shigeru M., Shibata M., Kawachi A., Motoya T.: *Journal of Chromatography B* **945**, 147-153 (2014).
42. Pierce A. R., Graham H. N., Glassner S., Madlin H., Gonzalez J. G. (1969): *Analytical Chemistry* **41**, 298-302 (1969).
43. Collier P. D., Mallows R.: *Journal of Chromatography A* **57**, 29-45 (1971).
44. Du L., Li J., Li W., Li Y., Li T., Xiao D.: *Food Research International* **57**, 61-70 (2014).
45. <http://quiz2.chem.arizona.edu/vip/chromatography/GC/apparatus.htm>, staženo dne 9.4.2014
46. <http://www.chempoint.cz/kapilarni-zonova-elektroforeza-cze>, staženo dne 9.4.2014

47. Horie H., Mukai T., Kohata K.: J. Chromatogr. A **758**, 332 – 335 (1997).
48. Arce L., Rios A., Valcarcel M.: J. Chromatogr. A **827**, 113 - 120 (1998).
49. Fidler M., Kolář L.: Chem. Listy **103**, 232-235 (2009).
50. Paulová H., Bochořáková H.: Chem. Listy **98**, 174-179 (2004).
51. Atoui A. K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P.: (2005). Food chemistry **89**, 27-36 (2005).
52. Zloch Z., Čelakovský J., Aujezdská A.: Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu. *Závěrečná zpráva o plnění výzkumného projektu podpořeného finančně Nadačním fondem Institutu*. 2004.
53. Bartošova J.: Stanovení celkové antioxidační aktivity čajových nálevů vybraných druhů čajů. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Ústav chemie potravin a biotechnologii, Brno 2009.