

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2016

Bc. LUCIE BLAŽKOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav chemie a biochemie



**Studium vlivu teploty na obsah antioxidantů při
přípravě zelených čajů**

Diplomová práce

Vedoucí práce:

RNDr. Ondřej Zítka, Ph.D.

Konzultant:

Prof. RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Lucie Blažková

Brno 2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Bc. Lucie Blažková**

Studijní program: Chemie a technologie potravin

Obor: Jakost a zdravotní nezávadnost potravin

Konzultant: Prof. RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D.

Název tématu: **Studium vlivu teploty na obsah antioxidantů při přípravě zelených čajů**

Rozsah práce: 60-80

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování literární rešerše na téma výroba, produkce, chemické složení a účinků zeleného čaje na organismus. Charakterizace volných radikálů a antioxidantů. Popis metod používaných pro studium obsahu antioxidantů u rostlinných vzorků. (Listopad 2015 – Prosinec 2015)
2. Optimalizace metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení flavonoidů a fenolů. (Prosinec 2015 – Leden 2016)
3. Navržení a provedení experimentu, analýza získaných výluhů zeleného čaje pomocí metody HPLC-MS a také pomocí vybraných spektrofotometrických metod. (Prosinec 2015 – Březen 2016)
4. Provedení senzorické analýzy u získaných výluhů zeleného čaje. (Březen 2016)
5. Vyhodnocení a grafické zpracování výsledků. Srovnání dosažených výsledků s odbornou literaturou a sepsání diplomové práce. (Březen 2016 – Duben 2016)

Seznam odborné literatury:

1. XU, Z. – HOWARD, L R. Analysis of antioxidant-rich phytochemicals. Chichester, West Sussex, U.K. 2012. ISBN 9781118229293, 9780813823911. URL: http://web2.mendelu.cz/cp_944_navody/Navody/e/Navod%20na%20ebrary-stahovani%20knih.pdf.
2. SMIRNOFF, N. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. 1. vyd. Oxford :: Blackwell, 2005. 302 s. ISBN 978-1-4051-2529-1.
3. KALAČ, P. *Funkční potraviny : kroky ke zdraví*. České Budějovice: DONA, 2003. 130 s. ISBN 80-7322-029-6.
4. CADENAS, E. – PACKER, L. *Handbook of antioxidants*. 2. vyd. New York: Marcel Dekker, 2002. 712 s. Oxidative stress and disease. ISBN 0-8247-0547-5.
5. CE' SPEDES, C L. Natural antioxidants and biocides from wild medicinal plants. Cambridge, MA. 2013. ISBN 9781780642338. URL: <http://dx.doi.org/10.1079/9781780642338.0000>.
6. KVASNÍČKOVÁ, A. *Potravinářství IV: Přírodní antioxidanty v potravinách*. Praha: ÚZPI, 2000. ISBN 80-7271-003-6.
7. STRATIL, P. – KUBÁŇ, V. *Přírodní antioxidanty : stanovení obsahu fenolických sloučenin a jejich antioxidační aktivity v zelenině, ovoci, zrninách a alkoholických nápojích*. Disertační práce. MZLU v Brně, 2005. 150.
8. STRATIL, P. *A B C zdravé výživy – Díl 1*. 1. vyd. Brno: Stratil, 1993. 345 s. ISBN 80-900029-8-6.
9. STRATIL, P. *A B C zdravé výživy – Díl 2*. 1. vyd. Brno: Stratil, 1993. 580 s. ISBN 80-900029-8-6.
10. STRATIL, P. – KLEJDUS, B. – KUBÁŇ, V. Determination of Phenolic Compounds and their Antioxidant Activity in Fruits and Cereals. *Talanta*. 2007. sv. 71, č. 4, s. 1741–1751. ISSN 0039-9140.
11. STRATIL, P. – KLEJDUS, B. – KUBÁŇ, V. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and their Antioxidant Activity in Vegetables – Comparison of Spectrophotometric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006. sv. 54, č. 3, s. 607–616. ISSN 0021-8561.

Datum zadání diplomové práce: listopad 2015

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2016



Bc. Lucie Blažková
Autorka práce



RNDr. Ondřej Zítka, Ph.D.
Vedoucí práce



doc. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.
Vedoucí ústavu



doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.
Děkan AF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci **Studium vlivu teploty na obsah antioxidantů při přípravě zelených čajů** vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne.....

.....

Experimentální část této diplomové práce byla realizována na výzkumné infrastruktuře vybudované v rámci projektu CZ.1.05/2.1.00/03.0072

Centrum senzorických, informačních a komunikačních systémů (SIX)

operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace.

Poděkování:

Chtěla bych velmi poděkovat a vyjádřit vděčnost vedoucímu své diplomové práce RNDr. Ondřeji Zítkovi, Ph.D. a konzultantovi práce Prof. RNDr. Bořivoji Klejdusovi, Ph.D., za jejich cenné rady, připomínky a hlavně trpělivost, kterou mi v průběhu psaní práce a při konzultacích poskytovali. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Ústavu chemie a biochemie, kteří mi pomáhali a podporovali mě při dokončení této kvalifikační práce. Jmenovitě patří velké díky Dr. Ing. Branislavovi Ruttkay-Nedeckému, Mgr. Markétě Vaculovičové, Ph.D. a RNDr. Radimovi Blažkovi, Ph.D., za pomoc a poskytnuté rady. V neposlední řadě chci také poděkovat mé rodině a známým za podporu při mém studiu.

„Čaj hojí duši i tělo.“
asijská lidová moudrost

Abstrakt:

Studium vlivu teploty na obsah antioxidantů při přípravě zelených čajů

Čaj je jedním z nejpoblárnějších nápojů po celém světě. Bylo prokázáno, že tento nápoj, připravovaný luhováním lístků čajovníku čínského (*Camellia sinensis*) v horké vodě, má v mnoha případech pozitivní vliv na lidský organismus. Látky obsažené v zeleném čaji mají antioxidační schopnost a pozitivně působí při prevenci mnohých chorob. Příznivé účinky jsou přisuzovány hlavně rostlinným fenolům, jejichž antioxidační aktivita chrání lidské tělo proti volným radikálům. V práci byl za použití moderních analytických metod stanoven obsah vybraných biologicky aktivních látek ve výluzích sypaných zelených čajů. Byly porovnány stanovené přírodní antioxidanty při různých teplotách přípravy čajového výluhu, a to čajů z Japonska a Číny.

Klíčová slova:

zelený čaj, bioaktivní látky, antioxidanty, teplota, analytické metody

Abstract:

Study of the effect of temperature on the content of antioxidants in the preparation of green tea

Tea is one of the most popular beverages worldwide. It was demonstrated that the beverage prepared by leaching of leaves of *Camellia sinensis* in hot water, has a positive effect on human organism in many cases. The substances found in green tea have antioxidant properties and positive effects on the prevention of many diseases. The beneficial effects are attributed mainly due to plant phenols whose antioxidative activity protects the body against free radicals. In this work the content of selected biologically active compounds in extracts of loose green teas was determined using modern bioanalytical methods. The amount of natural antioxidants determined in tea from Japan and China at different preparation temperatures of the tea extract solution were compared.

Key words:

green tea, bioactive substances, antioxidants, temperature, analytical methods

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	CÍLE PRÁCE.....	12
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
3.1	Zelený čaj	13
3.1.1	Výroba zeleného čaje.....	14
3.1.1.1	Výroba zeleného čaje v Číně.....	15
3.1.1.2	Výroba zeleného čaje v Japonsku.....	16
3.1.2	Produkce čaje.....	16
3.1.3	Chemické složení zeleného čaje.....	17
3.1.3.1	Vybrané bioaktivní látky s antioxidačním účinkem.....	19
3.1.4	Účinky čaje na lidský organismus.....	22
3.2	Volné radikály.....	24
3.2.1	Reaktivní formy kyslíku a dusíku.....	24
3.2.2	Oxidační stres.....	26
3.3	Antioxidanty.....	26
3.3.1	Rozdělení antioxidantů.....	27
3.3.2	Antioxidační ochrana organismu.....	29
3.4	Techniky využívané ke stanovení biologicky aktivních látek.....	31
3.4.1	Vybrané analytické metody.....	31
3.4.1.1	Extrakce.....	31
3.4.1.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	31
3.4.1.3	Plynová chromatografie.....	32
3.4.1.4	Kapilární elektroforéza.....	33
3.4.1.5	Hmotnostní spektrometrie.....	33
3.4.1.6	Absorpční spektrofotometrie v oblasti UV-VIS.....	34
3.4.2	Metody stanovení celkové antioxidační aktivity.....	35
3.4.2.1	Metody založené na eliminaci radikálů.....	36
3.4.2.2	Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek.....	38
3.5	Senzorická analýza	39
3.5.1	Senzorické hodnocení čaje.....	40
4	MATERIÁL A METODIKA.....	41
4.1	Materiál a přístroje	41
4.1.1	Zelené čaje.....	41
4.1.2	Chemikálie.....	44

4.1.3	Přístroje a pomůcky	45
4.2	Metody	46
4.2.1	Příprava vzorků	46
4.2.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	46
4.2.3	Stanovení celkové antioxidační aktivity	47
4.2.4	Kapilární elektroforéza	49
4.2.5	Orientační senzoričká analýza	49
4.2.6	Statistické vyhodnocení získaných dat	50
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	51
5.1	Výsledky analýzy technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie	51
5.1.1	Stanovení fenolických kyselin	51
5.1.2	Stanovení flavonoidních sloučenin	56
5.2	Výsledky stanovení celkové antioxidační aktivity	61
5.2.1	Stanovení celkového obsahu bílkovin	61
5.2.2	Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH	62
5.2.3	Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP	63
5.2.4	Stanovení celkového obsahu fenolů	64
5.3	Výsledky analýzy technikou kapilární elektroforézy	65
5.4	Výsledky orientační senzoričké analýzy	68
5.4.1	Senzoričké hodnocení čajových výluhů	68
5.4.2	Senzoričké hodnocení sypaných čajů	72
6	ZÁVĚR	73
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	74
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	81
9	SEZNAM ZKRATEK	84
10	PŘÍLOHY	86

1 ÚVOD

Od svého objevení před 5000 lety se čaj stal jedním z nejpoblárnějších nápojů po celém světě. Je součástí společenských a kulturních dějin mnoha národů a stal se tak běžnou součástí lidského života. Ročně se spotřebuje a vyrobí asi 4-5 miliard kilogramů čaje v nejrůznějších částech světa. Nápoj je velmi oblíben, a to nejen v Číně a Indii, v zemích s nejvyšší produkcí této užtkové rostliny, ale i v České republice.

Tento nápoj se připravuje ze zpracovaných listů čajovníku čínského (*Camellia sinensis*), a to obvykle luhováním čajových lístků v horké vodě. Existuje několik postupů zpracování sbíraných listů, které určují výsledný druh čaje. Tyto postupy se v každé producentské zemi mírně liší. Listy procházejí různým stupněm zpracování, které určuje výsledný druh čaje. Podle stupně oxidace čaje se při výrobě rozlišuje čaj oxidovaný úplně, částečně nebo neoxidovaný. Zelený čaj patří mezi čaje neoxidované (nefermentované), díky tomu má přirozenou zelenou barvu. Výsledný produkt může být obohacen například o sušené ovoce, či různá aromata, pro zvýraznění chuti a vůně.

Je známo, že zelený čaj má v mnoha případech pozitivní vliv na lidský organismus, zejména pro svůj obsah zdravích prospěšných látek. Bylo prokázáno, že látky obsažené v zeleném čaji mají antioxidační schopnost a pozitivně působí při prevenci řady civilizačních chorob, jako například nemocí srdce a cév (proti mrtvici, trombóze), cukrovce a některým nádorovým onemocněním. Vědci uvedené příznivé účinky a protizánětlivé vlastnosti přisuzují rostlinným fenolům (hlavně flavanolům neboli čajovým katechinům), jejichž antioxidační aktivita chrání lidské tělo proti volným radikálům [1]. Mimo jiné obsahuje mnoho dalších biologicky aktivních látek. Kromě toho má čaj díky obsahu stimulačních látek, jako je kofein, značně povzbuzující účinek, kdy zlepšuje činnost centrální nervové soustavy a odstraňuje únavu. Potenciál léčivých účinků zeleného čaje je opravdu vysoký.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce je stanovení bioaktivních látek v zelených čajích, za použití moderních bioanalytických metod. Zaměřím se na stanovení antioxidantů ve výluzích sypaných zelených čajů. U vzorků čaje pocházejících z Číny a Japonska bude provedeno porovnání obsahu přírodních antioxidantů při třech typech přípravy čaje, a to při zalití vařící vodou o teplotě 100 °C a vodou, která přejde varem a nechá se odstát na teplotu 80 °C a 60 °C. V neposlední řadě bude stanovena celková antioxidační aktivita výluhů čajů a bude provedena orientační sensorická analýza použitých čajových výluhů.

- Příprava čajových výluhů a použití vzorků k analytickým metodám.
- Kvantitativní stanovení látek s antioxidační aktivitou, tedy čajových katechinů a fenolických kyselin technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.
- Stanovení celkové antioxidační aktivity stanovených látek pomocí automatizovaného spektrofotometru BS 200.
- Analýza výluhů technikou kapilární elektroforézy.
- Porovnání výsledků obsahu bioaktivních látek u čajů z Číny a Japonska a porovnání výsledků s ohledem na přípravu čajů (teplota vody).
- Provedení orientační sensorické analýzy jednotlivých výluhů a samotné suroviny.

Práce je rozdělena na teoretickou a experimentální část. Výstupem této studie bude ucelená charakteristika čaje, konkrétně zeleného čaje, jeho obsahových látek a jejich účinků na lidský organismus. V práci nebude chybět popis využívaných metod ke stanovení bioaktivních látek v rostlinách, ale i použitých analytických metod v této studii. Všechny získané výsledky experimentální části budou porovnány s výsledky nalezenými v odborné literatuře a statisticky vyhodnoceny.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Zelený čaj

Zelený čaj je výrobek rostlinného původu sloužící k přípravě oblíbeného nápoje. Pro výrobu čaje se využívají výhonky, listy, pupeny a jemné části zdřevnatělých stonků z čajovníku čínského *Camellia sinensis* (*Theaceae*) [2]. Čajovník je stálezelený keř nebo strom dorůstající výšky 2-15 m, na plantážích se ovšem udržuje ve výšce maximálně 1,2m. Listy má střídavé, 4-20 cm dlouhé, kopinaté nebo eliptické, tuhé, tmavě zelené s pilovitým okrajem [3]. Pro výrobu čaje se sbírají nejmladší vrcholové pupeny větviček, tzv. fleše, a 1-3 listy. Fleše se následně dělí na hrubé, střední a jemné. Přiřazení do kategorie závisí na množství mladých lístků. Nejcennější a nejkvalitnější čaje jsou z nejmladších lístků, tedy z jemného fleše. Tyto lístky jsou označovány jako orange pekoe [4].

Květy mají 6-9 bílých korunních plátků a jsou po 2-3 v úžlabí listů. Plodem je tobolka, podobná muškátovému oříšku. Listy čajovníku jsou bohaté na polyfenoly, zejména katechiny. Zelený čaj vykazuje silnou antioxidační kapacitu, způsobenou zejména polyfenoly a flavonoidy. Podle provedených studií bylo zjištěno, že dnes velmi populární zelené čaje s příměsí ovoce a bylin, mají nižší antioxidační kapacitu než zelené čaje čisté [4]. Čajovníku se nejlépe daří ve slunném a vlhkém prostředí, nejvhodnější teplota je pro něj od 10 do 29,5 °C, roční srážky 2000 až 2280 mm. K největším pěstitelům patří Indie, Čína, Srí Lanka, Japonsko, Indonésie a Keňa [3].

Rozlišujeme tři základní typy čaje, vyráběné z lístků čajovníku, a to čaj zelený (nefermentovaný), oolong (částečně fermentovaný) a čaj černý (plně fermentovaný) [5]. Skupina čajů polozelených neboli žlutozelených, které jsou přechodem mezi zelenými a černými čaji je označována jako oolong. Jedná se o čaje zpracované speciálním postupem, při němž lístky zavádají na prudkém slunci, dochází k oxidaci a následně k rolování lístků. Tyto čaje mají kromě antioxidační schopnosti také schopnost inhibovat prozánětlivé mediátory, čímž působí protizánětlivě [6].

3.1.1 Výroba zeleného čaje

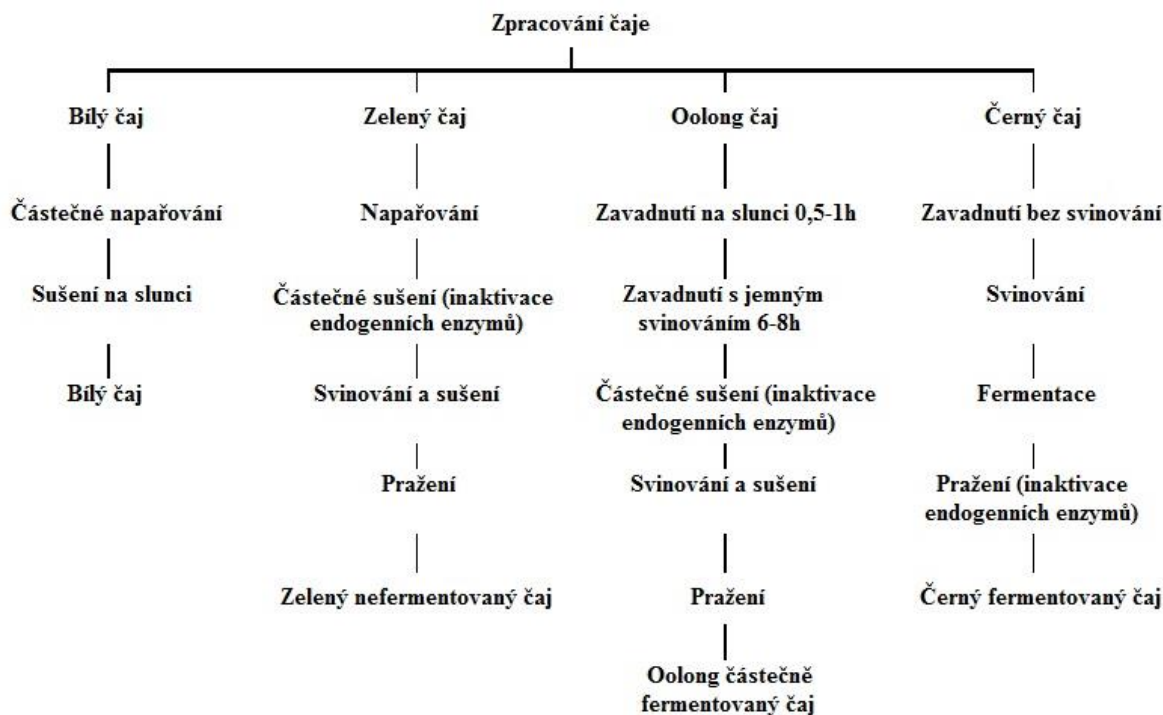
Čaj se těší velké oblibě pro svůj osvěžující, léčivý a mírně povzbuzující účinek. Během jednoho dne se na světě vypije 18 až 20 miliard šálků čaje, to z něj dělá významný ekonomický a sociální artikl [7]. Zelený čaj je oceňován pro svůj vysoký obsah antioxidantů, které pozitivně působí při prevenci mnoha onemocnění, včetně kardiovaskulárních onemocnění a některých druhů rakoviny [8]. Čaj spolu s kávou a kakaem řadíme do skupiny tropických komodit, ze kterých se připravují tzv. tropické nápoje. Pro řadu rozvojových zemí patří čaj mezi nejdůležitější plodinu, která lidem zajišťuje práci a místní ekonomice exportní výnosy. Miliony životů na celém světě jsou závislé na pěstování a zpracování čaje [9].

Při výrobě zeleného čaje se listy hned po sklizni vystaví v tenkých vrstvách na slunci nebo přirozenému teplému vzduchu a nechají se zavadnout. Potom se ihned tepelně ošetří horkou parou (tzv. japonský způsob) nebo na rozpálených kovových pánvích (tzv. čínský způsob). Působením horké páry nebo horkého vzduchu se zamezí nežádoucí oxidaci a dojde k rychlé inaktivaci enzymů. Díky tomu se fenolické látky a chlorofyl mění jen pomalu a zachovává se tak zelená barva listů a vysoký obsah katechinů. I přes tuto úpravu se uvádí, že asi 20-30 % katechinů jsou oxidované polymery katechinů podobné těm, které se nacházejí ve fermentovaném čaji [3,10].

Čajové listy se po zavadnutí a zahřívání dále svinují, dosoušejí a třídí. Zelený čaj, stejně jako čaj černý se někdy obohacuje květy, sušeným ovocem, přídávky bylin, silicemi a aromaty nebo např. vitamínem C. Černý čaj, který se vyrábí fermentací zeleného čaje má oproti němu nižší antioxidační aktivitu [11]. Celý proces sušení má velký vliv na chuť a aroma čaje. Dochází při něm totiž k částečné degradaci původních aromatických látek za vzniku nových aromatických látek, které jsou již charakteristické pro hotový čaj [12]. Čaj je při skladování velmi citlivý na světlo, vlhkost a pachy ostatních potravin. Na světle velmi rychle ztrácí aroma a ve vlhkém prostředí může plesnivět [8]. Zkrácený postup výroby základních typů čajů je znázorněn na obrázku č. 1.

Při následné přípravě čaje koncovým zákazníkem doporučují distributoři použít vodu o teplotě 70-80 °C, aby bylo možné připravit několik nálevů bez zbytečného znehodnocení cenných látek [4]. Neexistuje žádný přesně daný postup přípravy tohoto nápoje, výrobci však uvádí nejčastěji toto: při přípravě zeleného čaje nejprve přivedeme

vodu k varu, poté ji necháme pár minut odstát na 60-80 °C. Pokud by se zelený čaj zalil horkou vodou, do nálevu by se vyloučily i třísloviny a čaj by zhořkl. Na jeden šálek čaje (1,5 dl) připadne jedna lžička sypaného čaje. Zelený čaj ponecháme luhovat 2-3 minuty. Ze zeleného čaje je možné připravit dva až tři nálevy. Nálev ze zeleného čaje je světle zelený až žlutý, na rozdíl od černého čaje, který je červenohnědý [8].



Obrázek 1. Schéma procesu výroby základních typů čaje [13]

3.1.1.1 Výroba zeleného čaje v Číně

Existuje značné množství výrobních metod, tudíž čínských zelených čajů je velké množství. Běžné druhy čajů, které se objevují na trhu, jsou průměrné nebo i nadprůměrně dobré kvality. Zelené čínské čaje mají někdy poměrně nezvyklou chuť, které je třeba přivyknout. Technologický postup výroby zeleného čaje se odlišuje od výroby v Japonsku především ve výrobní fázi vyhřátí listů ke zničení enzymů. V tomto kroku se vyhřátí provádí buď suchým teplem (80-90 °C), přičemž se také odstraní trávovitá zelená vůně (tzv. vypražování zeleně), obvykle nazývaný jako čínský způsob. Vyhřívání suchým teplem, objevené ve 12. století, dává obecně kvalitnější čaje. Velmi kvalitní špičkové zelené čaje jsou v Číně prakticky všechny zpracovány ručně ve velkém, vyhřívaném kovovém kotli (woku) [14].

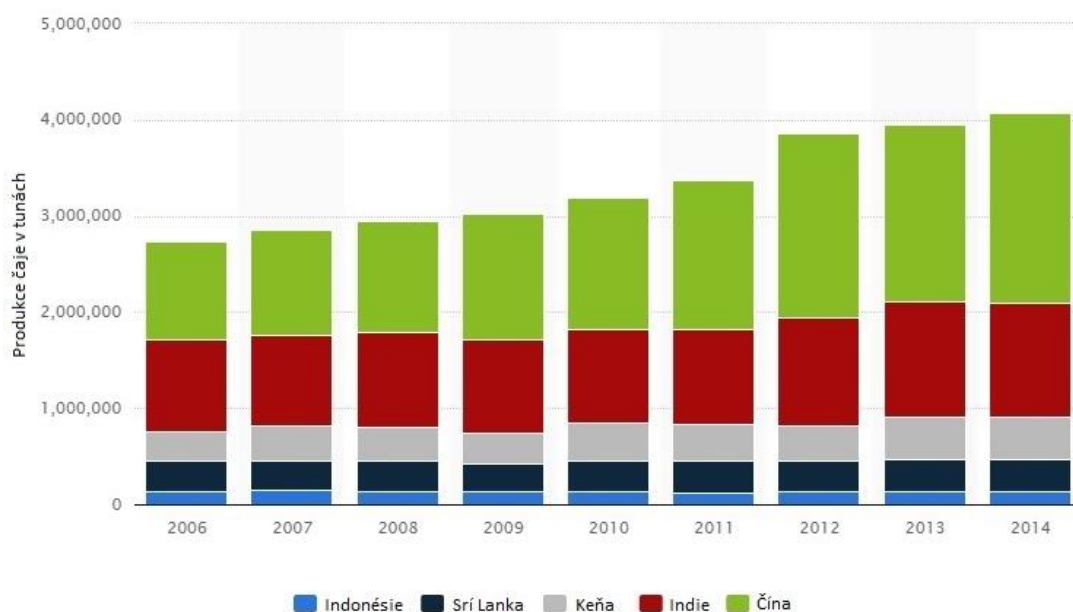
3.1.1.2 Výroba zeleného čaje v Japonsku

Čaj je v Japonsku znám již od 9. století, kdy byl přivezen z Číny. Velmi dobré čaje pocházejí z provincie Kyusu, kde se vyrábějí téměř jen zelené čaje. Velká většina plantáží se sklízí strojově. Sklizené listy se spařují horkou parou (tzv. vypařování zeleně), tento způsob vyhřátí listů je nazývaný jako japonský způsob. Dále se předběžně rolují, suší a výsledný produkt se prodává specializovaným výrobcům. Vyhřívání surového čaje horkou parou bylo původně používáno Číňany, Japonci je pouze převzali a používají jej, až na malou výjimku k výrobě téměř všech svých zelených čajů. Japonské zelené čaje mají vzhledem k ostatním zeleným čajům poněkud odlišný chuťový a vonný profil, který může připomínat až vůni mořských řas. Pro luhování japonských čajů se doporučují zvláště nízké teploty vody, při kterých má čaj květinovou svěží kořenovou vůni. Vzhledem k životní úrovni v Japonsku jsou již běžné zelené čaje relativně drahé [14].

3.1.2 Produkce čaje

V současné době se čaj pěstuje asi ve čtyřiceti zemích světa [15]. Zelený čaj se pěstuje hlavně v Číně, Vietnamu, Indonésii, Srí Lance a Japonsku. Ostatní typy čaje jako oolong jsou pěstovány převážně v Číně a představují pouze zlomek celosvětové produkce čaje. Bílý čaj je produkován jen v nepatrném množství [9]. Převážnou část produkce čaje ve světě drží čaj černý, vyprodukuje se ho asi 78 %, čaje zeleného 20 % a polozeleného neboli oolongu jen 2 % [16].

Světová produkce čaje dosáhla v roce 2012 zhruba 4 milionů tun dle údajů z databáze FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) [17]. Z toho největším producentem byla Čína, dále Indie, Keňa, Srí Lanka a Indonésie, jak je uvedeno na obrázku č. 2. Roční produkce sušených čajových lístků poskytuje 40 litrů čajového nápoje na jednoho obyvatele na světě [18]. Očekává se, že celosvětová spotřeba zeleného čaje bude i nadále stoupat, neboť se šíří informace o jeho léčivých účincích [16,19]. Dle údajů Českého statistického úřadu z roku 2013 je spotřeba čaje (zahrnuje čaj černý, zelený, čajové výtažky a koncentráty) v České republice 0,2 kg na obyvatele/rok. V posledním desetiletí je spotřeba poměrně stálá [20].



Obrázek 2. Produkce čaje v hlavních producentských zemích světa [21]

3.1.3 Chemické složení zeleného čaje

Listy čajovníku obsahují velké množství látek, ovlivňujících barvu, vůni a chuť čajového nálevu. Obsah látek v čaji je úzce spjat s pěstebními podmínkami, ve kterých je čajovník pěstován. Hlavními faktory jsou kultivary čaje, počet slunných dní, srážky, teplota a roční období, kdy je čajovník sklizen [22]. Čerstvý čajový list obsahuje 75-82 % vody [23] a 18-25 % pevných složek. Suché zpracované čajové listy obsahují již jen 4-12 % vody a 88-96 % sušiny. V průběhu zpracování čajových listů jsou vystaveny řadě biochemických procesů, které mají za následek rozdílnou kvalitu čaje a jeho chemického složení [22].

V současnosti jsme schopni popsat asi 400 různých látek, obsažených v čajovém listu. Za hlavní účinné látky zeleného listu se považují:

polyfenoly - flavonoidy (proanthokyanidiny, flavonoly: kvercetin, kempferol, myricetin a jejich glykosidy, katechiny (epigallokatechin gallát, epikatechin gallát, epikatechin, katechin, gallokatechin) a fenolické kyseliny (např. kyselina kávová, chlorogenová), estery kyseliny gallové (gallotaniny), theobromin, theofylin, vitamíny skupiny B, kyselina askorbová, kofein, karoteny, minerály, enzymy, proteiny, aminokyseliny a cukry, tuk a vosk, éterické oleje, terpenické glykosidy, alifatické a aromatické alkoholy [24]. Obsahové složky zeleného čaje jsou přehledně shrnuty v tabulce č. 1.

Komponenty čaje	Množství (%)
Katechiny	30
Theaflaviny	0
Jednoduché polyfenoly	2
Flavonoly	2
Jiné polyfenoly	6
Theanin	3
Aminokyseliny	3
Proteiny	6
Organické kyseliny	2
Cukry	7
Další karbohydráty	4
Lipidy	3
Kofein	3
Další methylxantiny	<1
Draslík	5
Další minerály	5
Aroma	stopy

Tabulka 1. Chemické složení zeleného čaje [25]

Nejznámější obsaženou látkou je alkaloid kofein (2-4 %), který je přítomen ve všech druzích čaje a liší se pouze obsaženým množstvím. Za nejvýznamnější a pro antioxidační účinek rozhodující jsou považovány fenolické látky, kterých čaj obsahuje až 30 % hmotnosti suché drogy [26]. V jednom šálku čaje (cca 150-250 ml) je údajně přítomno 30-400 mg polyfenolických látek [24]. Množství epigallokatechin gallátu v šálku čaje je údajně 30-130 mg, množství flavonoidů je 5-15 mg/šálek [26].

V čaji jsou zastoupeny těkavé sloučeniny jako aldehydy, estery, alkoholy, uhlovodíky a laktony. V množství asi 5 % obsahuje důležité minerální a stopové prvky. Nejvýznamnějším prvkem je fluor, protože čaj je jeho největším rostlinným zdrojem pro člověka. Dále obsahuje vápník, fosfor, hořčík, železité sloučeniny, mangan, síru, hliník, sodík, křemík, zinek, měď a ve stopovém množství draslík, stroncium, nikl, molybden, chrom a kobalt. Obsah prvků je závislý na tom, zda rostlina pochází z půd chudých nebo bohatých na dané přítomné prvky [19,27].

V čajovém listu se přirozeně vyskytují enzymy, které se uplatňují při výrobě (oxidaci) čaje. Hlavním enzymem zapojeným do těchto změn je polyfenoloxidáza [28]. Pro čaj specifická aminokyselina se nazývá theanin a tvoří 50% ze všech aminokyselin v čaji přítomných [5]. Theanin je jedna z chuťově nejvýraznějších složek čaje a také se podílí na biosyntéze polyfenolů [19]. Největší vliv na aroma nápoje má degradace aminokyselin. Dále mají vliv také chlorofyl, karotenoidy, lipidy a těkavé sloučeniny. Z těkavých látek jsou v čaji přítomny terpenoidy, degradační produkty aminokyselin a kyselina linolénová [5]. Další složkou čaje jsou snadno těkavé a termicky labilní silice, proto se zelené čaje nesmí zalévat vařící vodou. Silice také působí antibakteriálně. Tvoří asi 0,01-0,05 % celkové hmotnosti čaje [19].

3.1.3.1 Vybrané bioaktivní látky s antioxidačním účinkem

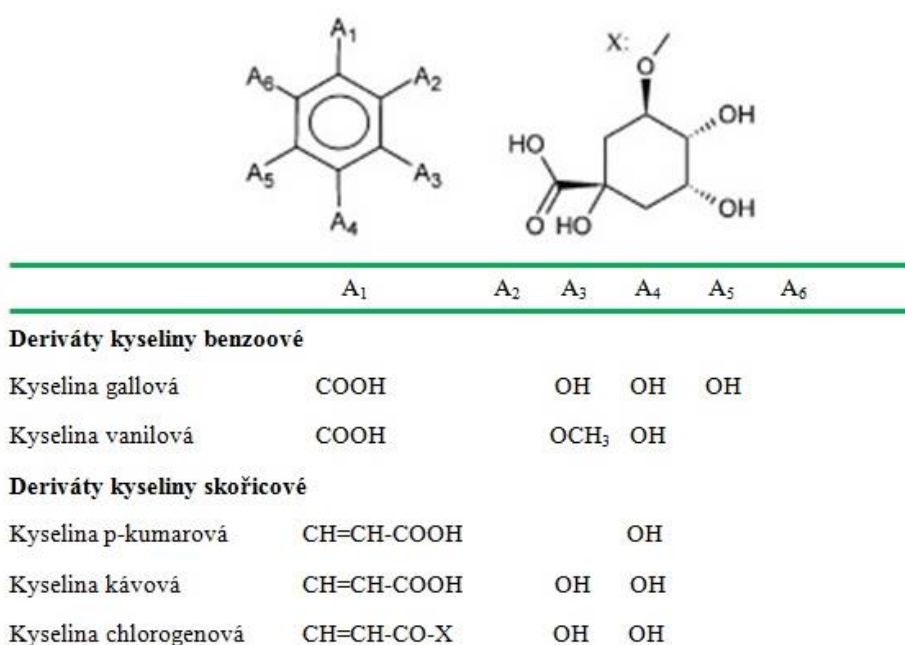
- **polyfenoly**

Polyfenolové sloučeniny představují významnou část sekundárních rostlinných metabolitů, které se běžně vyskytují u vyšších rostlin [29]. Existuje více než 8000 fenolických struktur zahrnující jednoduché molekuly (např. fenolové kyseliny s šesti uhlíkatou kruhovou strukturou) po vysoce polymerní sloučeniny (např. taniny). Vzhledem k jejich širokému rozšíření a vysoké koncentraci v rostlinách jsou běžnou součástí lidské stravy [30]. Charakteristickou hořkost a adstringentní chuť čaje způsobují především třísloviny (taniny), které mají také antioxidační vlastnosti. Jsou to hlavně theaflavin a thearubigen, které vznikají během fermentace z katechinů a dávají černému čaji tmavé zabarvení a charakteristickou chuť. Fermentací se jejich složení mění [19]. Jejich společným znakem je, že obsahují jedno nebo více aromatických jader, která jsou substituována hydroxylovými skupinami. Lze je rozdělit do čtyř skupin: fenolické kyseliny, flavonoidy a stilbeny a lignany. Na celkovém příjmu polyfenolů se flavonoidy podílí asi ze dvou třetin, fenolové kyseliny přibližně jednou třetinou a ostatní polyfenoly (stilbeny a lignany) tvoří minoritní podíl. Některé polyfenoly působí jako prooxidanty, tj. látky, z kterých vnikají volné radikály [30].

- **fenolické kyseliny**

Antioxidační aktivita fenolických látek spočívá v jejich redoxních schopnostech. Hrají důležitou roli při neutralizaci a poutání volných radikálů, při rozkladu peroxidu nebo

vychytávání singletového a tripletového kyslíku [31]. Nacházejí se v rostlinných tkáních, kde slouží jako pigmenty nebo lákadla opylovačů [32]. Fenolické látky mohou být podle stavby uhlíkového řetězce rozděleny na flavonoidy a neflavonoidové sloučeniny. Hlavní podíl neflavonoidních sloučenin představují skořicové kyseliny (kávová, ferulová a kumarová kyselina), benzoové kyseliny (gallová, ellagová, vanilová a swingová kyselina) [33], stilbeny (resveratrol), lignany, ligniny a taniny [34,35]. Fenolové kyseliny se nacházejí v rostlinách, ovoci, zelenině, obilí, ale také v kořeni, kávě a čaji. Fenoly zpomalují oxidační degradaci lipidů, čímž zlepšují kvalitu a nutriční hodnoty potravin [31]. Vybrané fenolické sloučeniny zkoumané v této práci jsou shrnuty v obrázku č. 3.

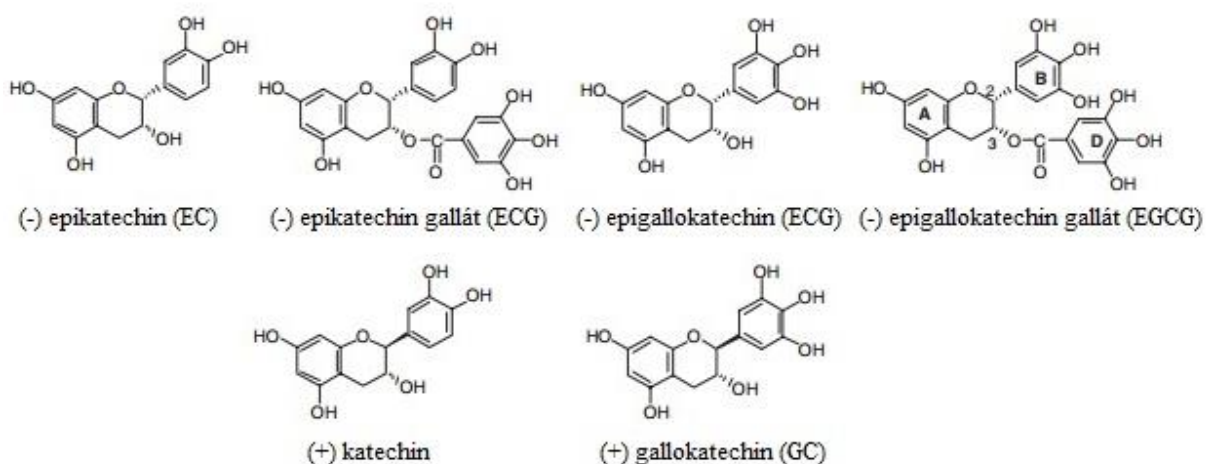


Obrázek 3. Struktura vybraných fenolických sloučenin [36]

- **flavonoidy**

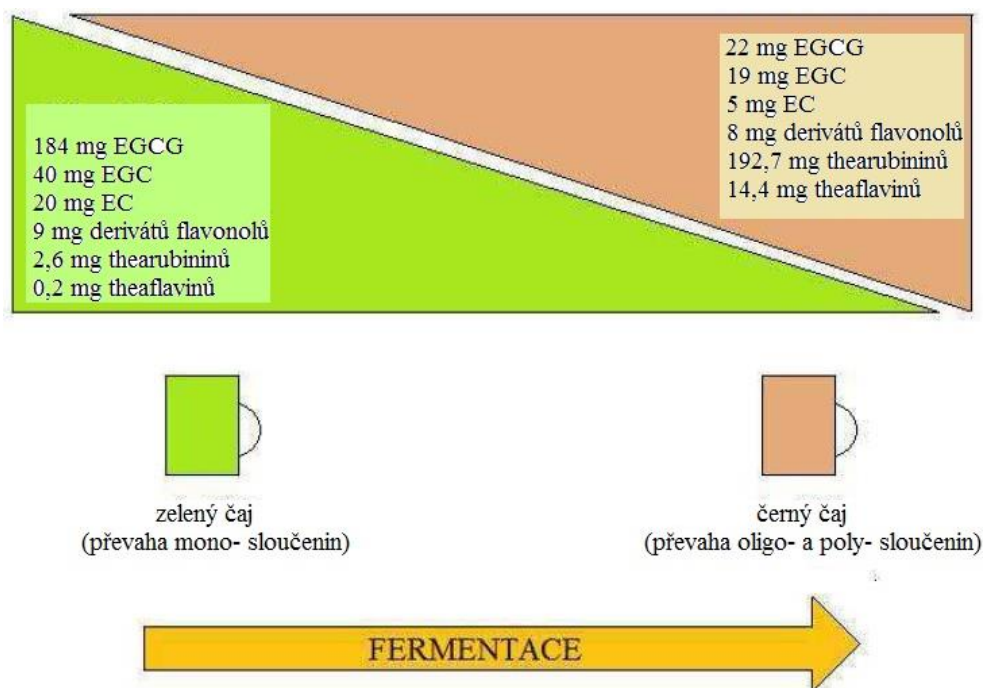
Flavonoidy jsou přírodní fenolické antioxidanty obsažené v lidské stravě. V potravinách udávají danou barvu a chuť, navíc působí jako prevence proti oxidaci tuků a jako ochránce enzymů a vitamínů [37]. Tato rostlinná barviva jsou syntetizována z fenylalaninu a představují velkou skupinu polyfenolických sloučenin [38]. Základními rysy struktury polyfenolů je přítomnost jednoho nebo více hydroxylových benzenových jader s heterocyklickým kruhem obsahujícím ve své struktuře kyslík a další hydroxylové skupiny [37].

Skupina flavonoidů se dále dělí (podle stupně oxidace pyranosového cyklu) na další podskupiny, mezi které patří flavanoly (katechiny a proanthokyanidiny), flavanony, flavony, flavonoly, anthokyanidiny a izoflavonoidy [39]. Flavonoly jsou nejvíce zastoupenými flavonoidy v potravinách, řadí se mezi ně kvercetin, myricetin a kemferol [37]. Anthokyaniny (neboli anthokyaniny) jsou nejrozšířenější a početně velice rozsáhlou skupinou rostlinných barviv. Vyznačují se oranžovými, červenými, fialovými a modrými odstíny. Jedná se o poměrně nestabilní a snadno oxidovatelné látky, které jsou citlivé na mnoho faktorů, jako je pH, teplota a UV záření [40].



Obrázek 4. Struktura hlavních katechinů v zeleném čaji [41]

Hlavní skupinou flavanolů jsou katechiny (obrázek č. 4) a je známo pět základních: katechin (C), epikatechin (EC), epikatechin gallát (ECG), epigallocatechin (EGC) a epigallocatechin gallát (EGCG). Zelený čaj obsahuje 15-20 % katechinů [5,42]. Epigallocatechin gallát je nejrozšířenější katechin v zeleném čaji, ze všech katechinů zaujímá asi 50-80 %, následuje epikatechin gallát, epigallocatechin a epikatechin [43]. Zelený čaj má vyšší obsah katechinů než čaj černý [24,44], jak je názorně vidět na obrázku č. 5. Uvádí se, že konzumace katechinů v množství 250 mg a více za den vykazuje pozitivní účinky na zdravotní stav člověka [45]. Flavonoidy se vyskytují hlavně v zelenině, ovoci, olivách, sójovém oleji, červeném víně, kakaových bobech a čaji [37].



Obrázek 5. Změna množství obsahových látek v důsledku fermentace [28]

3.1.4 Účinky čaje na lidský organismus

Pravidelné užívání zeleného čaje působí v mnoha ohledech pozitivně na dobrý zdravotní stav, věděli to po dlouhá století již čínští přírodní léčitelé. Používání rostlin, které léčí, předchází nemocem, tedy prodlužuje život. Tato znalost byla po staletí předávána z generace na generaci a neustále doplňována. V Evropě byly léčivé účinky čaje zjištěny vědeckým bádáním teprve ve 20. století. Podnětem k tomu byla skutečnost, že Japonci a Číňané, u nichž se pije mnohem více než u nás, trpí podstatně méně rakovinou a ischemickými chorobami než Evropané či Američané [46].

Jedním z nejzajímavějších objevů na poli lékařství je to, že zelený čaj zvyšuje odolnost srdce proti srdečné-cévním (kardiovaskulárním) onemocněním. Častěji se ukazuje, že pití dostatečného množství čaje a konzumace dalších potravin bohatých na specifické polyfenoly, snižuje riziko výskytu infarktu, popřípadě snižuje pravděpodobnost úmrtí, když k infarktu přece jen dojde. Pití čaje rovněž chrání cévy přivádějící krev do srdce a do mozku. Zelený čaj chrání proti kardiovaskulárním nemocem několika způsoby, snižuje celkovou hladinu cholesterolu a napomáhá nastolení příznivějšího poměru hladin cholesterolu v těle (poměr LDL a HDL cholesterolu) [19].

Většina příznivých účinků pití zeleného čaje je přikládána především katechinům a také jejich derivátům [47]. Proto jsou důležité obsahy katechinů, zvláště pak epigallokatechingallátu díky jeho významné antioxidační aktivitě, schopnosti zhášet reaktivní formy kyslíku a dusíku, chelátovat kovy, inhibovat tvorbu volných kyslíkových radikálů a inhibovat enzymy, jejichž aktivita může zvyšovat oxidační stres (NO-syntáza, lipoxygenázy, cyklooxygenázy, xantinoxidázy) a zvyšovat aktivitu antioxidačních enzymů (glutathionperoxidáza, kataláza, superoxiddismuzáza) [3]. K resorpci katechinů ze zeleného čaje dochází především v tenkém a tlustém střevě, částečná resorpce byla zaznamenána již v dutině ústní. Vstřebávání může být sníženo vazbou polyfenolů na bílkoviny a jejich vstřebávání mohou ovlivnit i další složky potravy. Katechiny přecházejí do plazmy (hladina 0,2-2 % v závislosti na vypitém množství čaje, maximální koncentrace byla 1,4-2,4 hod po vypití čaje) [48].

Vzhledem k přítomnosti vysokého množství fenolických látek, u nichž byla v mnoha studiích prokázána antioxidační aktivita, je konzumace zeleného čaje dávána do souvislosti se snížením výskytu závažných onemocnění, jakými jsou kardiovaskulární onemocnění nebo rakovina. Výsledkem podávání zeleného čaje zvířatům s modelovým oxidačním stresem (rakovina, zánět, kardiovaskulární onemocnění, ateroskleróza) byla řada nejrůznějších odpovědí ukazujících, že účinné látky se vstřebávají a aktivně zasahují do buněčných procesů *in vivo*, a to mechanismem vycházejícím z jejich antioxidačního působení. Výsledky pokusů na zvířatech lze všeobecně hodnotit jako velmi slibné. Provedena byla řada epidemiologických studií sledujících vliv konzumace nápoje ze zeleného čaje na zdraví člověka. Studie byly zaměřené na kardioprotektivní, antithrombotické a protizánětlivé působení, dále na ovlivnění hypertenze, rakoviny (gastrointestinálního traktu, plic, prsu), diabetu, obezity či kazivosti zubů [3,49].

Čaj má také díky kofeinu povzbuzující účinek. Působí diureticky, užívá se ke zmírnění lehčích průjmů a také jako doplněk při léčbě obezity [24]. Účinné látky zeleného čaje jsou dobře rozpustné ve vodě. Z látek majících pozitivní dopad na naše zdraví si všimneme zvláště kombinace vitamínu E a B12, jež je nezvyklá (vitamín E se vyskytuje obvykle v semenech olejnin a B12 v mléce a výrobcích z něj) [47]. Zaznamenáno bylo např. snížení výskytu infarktu myokardu, snížení úmrtnosti po infarktu myokardu, zmenšení rizika kardiovaskulárního onemocnění. Pozorováno bylo rovněž snížení

celkového cholesterolu, LDL, triglyceridů, zvýšení hladiny HDL, zlepšení stavu pacientů s nádorovým onemocněním, snížení výskytu aterosklerózy a rakoviny plic u kuřáků [48].

3.2 Volné radikály

Volné radikály jsou vysoce reaktivní a nestabilní molekuly, atomy nebo ionty, které ve své valenční sféře obsahují alespoň jeden nebo více nepárových elektronů [50]. Volné radikály, které vznikají *in vivo*, mají řadu fyziologických funkcí a lidský organismus je umí využívat ke svému užitku. Lze říci, že díky svým funkcím mají pro organismus životně důležitý význam. Jestliže se však jejich množství oproti hladině látek s fyziologickým antioxidačním účinkem v těle dlouhodobě zvýší (tzv. oxidační stres), uplatní se v organismu jejich negativní vliv [51].

Volné radikály se do organismu dostávají zvenčí, velké množství však vzniká i v průběhu metabolismu. Podle toho rozdělujeme příčiny vzniku volných radikálů na exogenní a endogenní. Volné radikály mohou napadnout prakticky kteroukoliv molekulu organismu a způsobit tak její oxidační poškození. Nejzávažnější je poškození fosfolipidů buněčných membrán vedoucí k poruše nukleových kyselin (mutageneze, karcinogeneze, zánik buňky) a bílkovin (inaktivace enzymů a jiných bílkovin s různým biologickým významem) [52]. Důsledkem agresivního působení na buňky způsobují volné radikály různé zdravotní problémy, včetně aterosklerózy, zánětů, srdečně-cévních chorob a některých typů rakoviny [53].

3.2.1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Řada volných radikálů patří mezi reaktivní formy kyslíku a dusíku (tabulka č. 2). Reaktivní formy kyslíku ROS jsou v těle produkovány při metabolických procesech vyžadujících kyslík - při dýchání a při určitých buněčných imunitních funkcích. Zahrnují jak radikálové, tak neradikálové formy. Reaktivní formy dusíku jsou označovány zkratkou RNS [54].

REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU			
Volné radikály		Neradikálové formy	
Superoxid	$O_2^{\cdot -}$	Peroxid vodíku	H_2O_2
Anion	O_2^{2-}	Kyselina chlorná	HClO
Hydroxyl	OH^{\cdot}	Singletový kyslík	1O_2
Hydroperoxyl	HO_2^{\cdot}	Ozón	O_3
Lipid peroxyl	LOO^{\cdot}	Lipid hydroperoxid	LOOH
Peroxyl	ROO^{\cdot}		
Alkoxyyl	RO^{\cdot}		
REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU			
Volné radikály		Neradikálové formy	
Lipid alkoxyyl	LO^{\cdot}	Oxid dusitý	N_2O_3
Oxid dusičitý	NO_2^{\cdot}	Kyselina dusitá	HNO_2
Oxid dusnatý	NO^{\cdot}	Nitryl chlorid	NO_2Cl
Nitroxyl	NO^{\cdot}	Nitroxid	NO
Thiyl	RS^{\cdot}	Oxid dusičitý	NO_2
Protein	P $^{\cdot}$	Kyselina peroxodusitá	ONOOH
Peroxylnitryl	$ONOO^{\cdot}$	Oxid dusný	N_2O
		Nitrosyl	NO^+
		Nitronium	NO_2^+
		Alkylperoxylnitrit	ROONO

Tabulka 2. Reaktivní formy kyslíku a dusíku a neradikálové formy [50,54]

Hlavním producentem reaktivních metabolitů kyslíku v buňkách jsou membránově vázané enzymy, jejichž koenzymy jsou schopné redukovat kyslík pouze jediným elektronem za vzniku superoxidu $O_2^{\cdot -}$. Jedná se o koenzymy s chinoidní nebo flavinovou strukturou, hemové koenzymy nebo koenzymy s mědí v aktivním centru [55]. Nejvýznamnější reaktivním metabolismem kyslíku je superoxidový radikál, který však není příliš reaktivní. Tento radikál je prekurzorem a výchozí látkou pro tvorbu dalších neredukovaných reaktivních forem kyslíku (např. hydroxylového radikálu). Nejvýznamnější reaktivní formou dusíku je oxid dusnatý. Při nízkých koncentracích reaguje pomalu s většinou molekul, včetně kyslíku. Pomalá reakce je způsobena několika faktory: průběžným vychytáváním oxidu dusnatého v erytrocytech za vzniku methemoglobinu, mnohem rychlejší difuzí oxidu dusnatého do krve (proti rychlosti

syntézy oxidu dusnatého), schopnost oxidu dusnatého reagovat *in vivo* dostatečně rychle jen s tranzitními kovy a regulační funkcí oxidu dusnatého v nízkých koncentracích. Oxid dusnatý je za určitých okolností prudce jedovatý [50].

Vědci nyní považují ochranu proti volným radikálům a jejich škodlivému účinku za jeden z klíčových předpokladů k udržení dlouhodobého kvalitního života. Nyní víme, že za dlouhověkostí a životem bez nemocí nestojí jen geny a vědecký pokrok, ale také schopnost organismu chránit se před volnými radikály. Ty mohou způsobovat nemoci srdce, rakovinu, cukrovku, artritidu, nemoci zraku, Alzheimerovu nemoc a předčasné stárnutí [56].

3.2.2 Oxidační stres

Oxidační stres popisuje poškození rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku a reaktivních forem dusíku. ROS jsou v organismu nezbytnou součástí enzymových mechanismů, účastní se uvolňování a přeměny energie potřebné pro život. Za normálních okolností v organismu neškodí, škodí pouze, vymknou-li se kontrole. Oxidační stres může být vyvolán nadměrnou produkcí ROS, či RNS, nedostatečnou funkcí antioxidantního systému nebo spojením obou nedostatků [55]. Oxidační stres je přirozeným průvodním jevem aerobního metabolismu, přímo se podílí na rozvoji řady onemocnění a je významným faktorem přirozeného stárnutí. Oxidační stres vzniká porušením rovnováhy mezi volnými radikály exogenního a endogenního původu a antioxidanty [51].

3.3 Antioxidanty

Žádný živý organismus nepřežije bez účinné ochrany proti volným radikálům. Antioxidanty stojí v první linii boje proti těmto molekulám. Neutralizují a snižují účinek volných radikálů na minimum předáním elektronu, čímž je stabilizují. Stabilní volné radikály tak přestávají být hrozbou pro buňky. Organismus sice umí vytvořit některé antioxidanty sám, ale významnou úlohu v ochraně proti volným radikálům plní i výživa, poněvadž vybrané nízkomolekulární antioxidanty jsou dodávány do organismu výhradně jako součást potravy [56].

Téměř všechny organismy jsou dobře chráněny proti poškození volnými radikály komplexním antioxidantním obranným systémem, jehož součástí jsou enzymy jako

superoxiddismutáza, kataláza, nebo nízkomolekulární látky jako je α -tokoferol, kyselina askorbová, karotenoidy, polyfenoly a glutathion. Vzhledem k tomu, že řada nízkomolekulárních antioxidantů není v lidském organismu syntetizována a musí být přijímána s potravou, je v současné době velká pozornost věnována zdrojům přírodních antioxidantů inhibujících peroxidaci lipidů nebo chránících před škodlivými účinky volných radikálů [57].

Proti nežádoucímu působení reaktivních forem kyslíku a dusíku v organismech existuje řada obranných mechanismů, kterých se zúčastňuje množství antioxidantů, což jsou molekuly, které mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci látek a celých biologických systémů. Jsou přítomny v malých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit [53]. Dokážou snižovat riziko propuknutí řady nemocí a také zabraňují předčasnému stárnutí. Volné radikály poškozují organismus a antioxidanty tyto volné radikály zachytávají a eliminují je. A to tak, že antioxidanty volným radikálům poskytnou vlastní elektron a tím zamezí odběru elektronu z jiných molekul v rostlinných i živočišných buňkách. Po této reakci se z nich stávají také volné radikály, ale existují další antioxidanty, které jim pomohou vrátit se do původního stavu. Jako příklad lze uvést kyselinu α -lipoovou a pyknogenol, které mohou obnovit spotřebovaný vitamín C, a ten je zase schopen regenerovat vyčerpaný vitamín E. Působí-li antioxidanty společně, tedy synergicky, jejich účinek se zesiluje [58]. Míra schopnosti organismu vzdorovat oxidačnímu stresu je určena jednak množstvím přítomných antioxidantů, jednak jejich druhem. Parametr, který poukazuje na schopnost odolávat oxidačnímu stresu, je označován jako antioxidační kapacita a udává celkovou účinnost všech antioxidantů v organismu [53,55].

3.3.1 Rozdělení antioxidantů

Antioxidanty se podle svého výskytu dělí do dvou velkých skupin: **endogenní** (vznikají v organismu) a **exogenní** (organismus si je neumí sám syntetizovat, musí je přijmout např. z potravy). Antioxidanty je možné dělit podle mnoha různých kritérií, např. dělení podle jejich chemické povahy [58].

- **antioxidační enzymy**

Kataláza - rozkládá peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík.

Glutathion - sloučenina s nízkým obsahem síry. Slučuje se s enzymy, které obsahují selen, s glutathionovými peroxidázami, a ty redukuje peroxid vodíku na vodu.

Superoxiddismutáza - vyskytuje se téměř ve všech organismech. Existují dva typy obsahující měď a zinek, nebo mangan. Neutralizují superoxid na peroxid vodíku.

- **antioxidační vitamíny**

Vitamín C (kyselina askorbová) - nejvíce se ho nachází v citrusech, ale i v zelí, špenátu a zelené paprice. Je to jeden z nejdůležitějších antioxidantů. Snižuje výskyt některých druhů rakoviny, vznik očních zákalů, zabraňuje předčasnému stárnutí a má i protizánětlivé účinky.

Vitamín E (tokoferol) - který se vyskytuje v celých obilných zrnech, ořechách, rostlinných olejích, rybím tuku a v meruňkách. Ukládá se ve všech částech buněk, které obsahují tuk (je lipofilní, v tucích rozpustný), v buněčných membránách a lipoproteinech. Snižuje výskyt onemocnění srdce tím, že chrání krevní destičky před poškozením stresem a kouřením.

Vitamín A (retinol) - vyskytuje se pouze v těle živočichů. Ovoce a zelenina obsahují mnoho karotenoidů, které lidské tělo dokáže přeměnit na vitamín A a slouží jako ochrana před UV zářením.

Karotenoidy - se vyskytují ve žlutém, oranžovém a červeném ovoci a zelenině. Nejznámějšími zástupci jsou α -karoten, β -karoten, lutein, zeaxanthin a lykopen. Snižují výskyt některých druhů rakoviny, zvyšují aktivity bílých krvinek (monocytů), chrání zrak před zákalou a pokožku před spálením slunečním zářením.

- **metabolity, kofaktory a hormony**

Koenzym Q_{10} - je schopen na sebe vázat peroxylový a alkoxylový radikál, regeneruje tokoferol. Zvyšuje energetický výkon srdce a posiluje ho. Zabraňuje vzniku některých typů rakoviny a má příznivý vliv na pacienty s AIDS.

Nikotinamid - váže hydroxylový radikál, příznivě působí na ischemická a neurologická onemocnění (napomáhá léčení Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, depresí a chronického stresu).

Melatonin - antioxidační hormon snižující vedlejší účinky po chemoterapii, působí antikarcinogenně a potlačuje záněty v akutních fázích.

Glukóza - je schopná na sebe vázat hydroxylový radikál.

Bilirubin - váže singletový kyslík, superoxid a hydroxylový radikál.

Kyselina močová - váže hydroxylový radikál a singletový kyslík.

- **antioxidační substráty**

Thioly - chrání organismus před volnými radikály, které vznikají ionizačním zářením.

Kyselina lipoová - prodlužuje životnost vitamínu C a zvyšuje plodnost, snižuje hladinu krevního cukru, je důležitá pro léčbu diabetu a pomáhá při otravě muchomůrkou zelenou.

Plazmalogeny - skupina fosfolipidů vyskytujících se v buněčné membráně, které zmírňují oxidační poškození při fotosenzibilizaci.

- **stopové prvky**

Selen - nachází se v celých obilných zrnech, v para ořeších a česneku, je potřebný k produkci glutationové peroxidázy a při léčení kardiovaskulárních chorob a rakoviny.

Zinek - v organismu je jako součást enzymů, snižuje postischemické poškození srdce a syntetizuje proteiny.

- **látky rostlinného původu**

Polyfenoly - nacházejí se v rostlinách a jejich skupina obsahuje několik tisíc zástupců. Jejich společným znakem je, že obsahují jedno nebo více aromatických jader, která jsou substituována hydroxylovými skupinami. Lze je rozdělit do tří skupin: *fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany* [58].

3.3.2 Antioxidační ochrana organismu

Jednou z možností, jak organismus chránit před vlivem exogenních a endogenních volných radikálů, je působení antioxidantů. Molekuly antioxidantu omezují aktivitu kyslíkových radikálů - snižují pravděpodobnost jejich vzniku nebo je převádějí do méně reaktivních nebo nereaktivních stavů. Tím omezují proces oxidace v organismu nebo ve směsích, kde se vyskytují. Z tohoto důvodu se přidávají do potravin, které by byly jinak oxidací nadměrně poškozovány. Konzumovány působí pozitivně na zdraví organismu. Další antioxidanty se vyskytují (nejčastěji ve formě enzymů) v organismu, kde působí podobně, v potravě jsou však bezvýznamné (buďto rychle zanikají nebo nepřežijí trávicí proces). Antioxidanty lze dělit na přirozené (v přírodě nebo dané potravině se přirozeně

vyskytující, byť třeba v menších koncentracích) a syntetické (ve smyslu uměle vytvořené a bez přírodního relevantního výskytu v přírodě) [59].

Obvykle panuje snaha upřednostňovat první skupinu, byť dosavadní výzkumy ukazují na naprostou neškodnost používaných umělých antioxidantů (ovšem zkoumání účinku dlouhodobého, resp. celoživotního užívání nemohlo být u některých z nich zatím z praktických důvodů dokončeno). Odborníci se shodují na tom, že účinnost přirozených antioxidantů přijímaných přirozeně (např. v čaji a ovoci) je výrazně vyšší než u stejné dávky podané v čisté podobě jakožto potravinový doplněk (např. vitamínová tableta). Antioxidanty v rostlinné stravě jsou vázány do pevného vláknitého materiálu a v něm se dostávají do žaludku a tračníku, kde mohou neutralizovat volné radikály. Pilulky bývají tráveny příliš rychle na to, aby mohly působit na tom správném místě. Navíc poslední výzkumy ukazují, že minimálně u některých antioxidantů dochází při dlouhodobém užívání v čistém stavu k tzv. zvratu antioxidantu, kdy se jeho antioxidační účinek změní v prooxidační (tj. vysoce nežádoucí). Tato vlastnost, jejíž mechanismus je dosud nepochopen, byla pozorována u β -karotenu (provitamín A), vitamínu E, vitamínu C a flavonoidů. U antioxidantů přijímaných přirozenou cestou žádný zvrát zaznamenán nebyl [59].

Antioxidační doplňky stravy nebo potrava obsahující antioxidanty může být použita jako prostředek pro ochranu lidského organismu před oxidačním poškozením. Mnoho druhů ovoce, zeleniny, bylin, cereálií a semen bylo v posledních letech zkoumáno pro svoji antioxidační aktivitu. Byliny a koření jsou obecně bezpečnými zdroji přírodních antioxidantů. Antioxidační aktivita rostlinných tkání je přímo spojována s aktivitou enzymů vylučujících volné radikály a s obsahem antioxidačních látek, hlavně fenolických sloučenin, karotenoidů, tokoferolu a kyseliny askorbové [57].

Nejvýznamnější vliv na zdraví člověka mají flavonoidy díky svým antioxidačním a chelatačním schopnostem. Předností jejich antioxidačních vlastností je inhibice tvorby a oxidace LDL, čímž se projevuje jejich kardioprotektivní efekt. Ochranná role flavonoidů v lidské stravě byla také hlavním cílem řady výzkumných studií. Například vysoký příjem flavonoidů předurčuje nižší úmrtnost na choroby koronárních artérií a nižší výskyt infarktu myokardu u starších mužů [60].

3.4 Techniky využívané ke stanovení biologicky aktivních látek

3.4.1 Vybrané analytické metody

Mezi vybrané analytické metody sloužící ke stanovení bioaktivních látek patří příprava vzorku k vlastním analýzám extrakcí a dále se využívají zejména separační metody jako je chromatografie (kapalinová nebo plynová) a kapilární elektroforéza, dále hmotnostní spektrometrie (vysokoúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií) a optické metody (absorpční spektrofotometrie).

3.4.1.1 Extrakce

Proces extrakce chápeme jako přechod složky fázovým rozhraním mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami. V širším analytickém pohledu jsou jako extrakce pojmenovány i mnohé další metody, při nichž je převáděna složka směsi fázovým rozhraním z jedné fáze (plynné, kapalné, pevné) do druhé fáze (kapalné, pevné), i když principiálně jde o absorpci nebo adsorpci. Extrakční soustavy můžeme rozdělit podle skupenství fází, mezi kterými přechází složka (jedná se o extrakci z pevné fáze do kapaliny, extrakci z kapaliny do kapaliny, extrakci z kapaliny na pevnou fázi a extrakci z kapaliny nebo plynu na pevnou fázi) [61].

Rozpuštěné látky lze oddělit extrakcí kapaliny kapalinou. Mnohdy je však třeba oddělit látky přítomné v tuhém vzorku. V tomto případě není možné upravit složky vzorku tak, aby se podpořila nebo potlačila extrakce, jako je tomu u rozpuštěných látek, dělení je pak závislé především na rozpustnosti sloučeniny v určitém rozpouštědle. Extrakce tuhé látky kapalinou se používá nejčastěji pro biologické a přírodní vzorky, ale mohou být takto děleny i anorganické látky. Extrakce tuhých látek je obvykle zdlouhavá, protože difúze extrahované látky tuhou fází je pomalá, proto se dává přednost kontinuální extrakci, např. v Soxhletově extraktoru. Extrakci lze rovněž podpořit mikrovlnným ohřevem rozpouštědel, která jsou v kontaktu s tuhým vzorkem. Extrakci látek z tuhé fáze lze podpořit též ultrazvukem [62].

3.4.1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Chromatografie je separační metoda, při které se oddělují, neboli separují složky obsažené ve vzorku. Svým určením je to především metoda kvalitativní a kvantitativní

analýzy vzorku. V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je naopak pohyblivá. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi. Čas, jaký stráví v jedné nebo druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Během separace se v koloně vytváří a porušuje fázová rovnováha mezi mobilní a stacionární fází [61]. U vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se vysoké účinnosti dosahuje použitím stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem [62].

Systemy se značně sníženou polaritou stacionárních fází a polárními mobilními fázemi se označují jako systémy s obrácenými - reverzními fázemi. RP-HPLC umožňuje separaci velkého počtu organických sloučenin, ale i komplexů elektricky neutrálních, resp. s omezenou polaritou. Stacionární fáze pro kapalinovou chromatografii se plní do trubic různé délky a průměru, zhotovených z nerezové oceli, tvrzeného skla a plastů [63]. Mechanismus separace na reverzních chemicky vázaných fázích je kombinací tří interakcí: interakce solutu s mobilní fází, interakce mobilní fáze se stacionární fází, rozdělování solutu mezi mobilní a stacionární fázi. Rozhodující roli hraje interakce s mobilní fází, která je dána hydrofobními interakcemi a interakcemi namířenými proti nim. Jejich velikost závisí na polaritě solutu, na permitivitě a na povrchovém napětí mobilní fáze [62].

Kapalinový chromatograf se skládá z několika částí: čerpadla, směšovacího zařízení, zásobníků mobilní fáze, dávkovacího zařízení, náplňové kolony a detektoru (např. fotometrický, refraktometrický, fluorescenční, elektrochemický nebo hmotnostní detektor) [61]. Z kolony je eluát veden do detektoru. Signál detektoru se vyhodnocuje počítačem nebo některým jiným vyhodnocovacím zařízením [62]. Pro identifikaci látky je podstatné umístění maxima píku v chromatogramu. Toto umístění lze vyjádřit retenčními daty: retenční čas a retenční objem. Pro kvantitativní analýzu se používá plocha a výška píku, které rostou s obsahem složky ve vzorku [61].

3.4.1.3 Plynová chromatografie

Chromatografických metod je velké množství. Vzhledem ke značné různorodosti se dělí podle několika hledisek: podle skupenství mobilní fáze (kapalinová a plynová

chromatografie), podle uspořádání stacionární fáze (kolonová, papírová, tenkovrstvá chromatografie) a podle povahy děje, který převládá v separaci (rozdělovací, adsorpční, iontově-výměnná, gelová a afinitní chromatografie) [61].

Plynová chromatografie je taková separační metoda, kde je mobilní fází nosný plyn. Plynový chromatograf se skládá z několika částí: zdroje plynu, čistícího zařízení, regulačního systému, dávkovače vzorku, náplňovou nebo kapilární kolonou, termostatem, detektorem a vyhodnocovacím zařízením [61].

3.4.1.4 Kapilární elektroforéza

Elektroforéza spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli (konstantní stejnosměrné napětí mezi elektrodami). U kapilární elektroforézy je kapilára naplněna základním elektrolytem, který vede proud (konce kapiláry jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem, společně s elektrodami z inertního materiálu - Pt). Mezi elektrody se aplikuje vysoké napětí (10 - 30 kV). Malý objem vzorku se dávkuje do konce kapiláry. Ta přechází přes detektor, obvykle fotometrický a záznam závislosti odezvy detektoru na čase se nazývá elektroferogram. Elektroferogram je podobný chromatogramu. Poloha píků určuje kvalitu, plocha nebo výška píků kvantitu [61].

Kapilární elektroforéza (CE) je další běžně užívanou metodou k separaci a kvantifikaci složek čaje. Kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC) a nevodná kapilární elektroforéza (NACE) s UV absorbanční detekcí jsou CE metody uvedené v odborné literatuře ke stanovení obsahu čajových komponent [64-68]

3.4.1.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je fyzikálně chemická metoda určování hmotností atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné a záporné ionty. Při vhodné interpretaci výsledků měření má metoda velmi dobrou vypovídací schopnost o struktuře analyzovaných látek [62]. Tato separační technika převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z . Základními kroky v této technice jsou odpaření vzorku, ionizace, akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru, separace iontů hmotnostním filtrem a detekce iontů. Vysoké

vakuu v zařízení (10^{-4} - 10^{-8} Pa) brání vzájemným kolizím částic v plynné fázi. Ve většině spektrometrů nastane reakce za vzniku iontů a po ní probíhá analýza [61].

Hmotnostní spektrometr má několik základních součástí. Iontový zdroj slouží k převedení analyzované látky do ionizovaného stavu. V prostoru iontového zdroje dochází i k většině fragmentačních reakcí vedoucích k destrukci chemických vazeb vzniklého iontu. Hmotnostní analyzátor slouží jako disperzní prvek a umožňuje rozdělit v prostoru nebo čase směs iontů o různých poměrech hmotnosti k náboji (m/z), produkovanou v iontovém zdroji. Detektor, na který je směřován proud iontů po průchodu hmotnostním analyzátozem, poskytuje analogový signál úměrný počtu dopadajících iontů. Ten je po digitalizaci převeden do počítače a vhodným programem zpracován do formy hmotnostních spekter [62].

MS je všestranná, rychlá a citlivá analytická metoda, která je často využívána ke kvalitativní i kvantitativní chemické analýze, protože poskytuje velké množství informací o vzorku a jeho složení. Přispívá k identifikaci, určení struktury organické látky a určení její relativní molekulové hmotnosti [61]. Těžištěm analytického využití hmotnostní spektrometrie je především stopová analýza organických látek s důrazem na zjištění jejich struktury. Spojení hmotnostního spektrometru se separačními metodami (zejména plynovou a kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou) výrazně zvyšuje selektivitu a umožňuje provádět identifikaci komponent vzorku ve složité matici. Hmotnostní spektrometr zde vystupuje jako strukturně selektivní detektor umožňující kromě obvyklé registrace zón látek eluovaných z kolony provést i jejich identifikaci na základě zaznamenaného hmotnostního spektra [62].

3.4.1.6 Absorpční spektrofotometrie v oblasti UV-VIS

Optické metody jsou fyzikální metody založené na interakci vzorku s elektromagnetickým zářením nebo na vyzařování elektromagnetického záření vzorkem. Tyto metody se rozdělují na nespektrální a spektrální metody. Mezi spektrální metody založené na výměně energie mezi látkou a zářením řadíme metody emisní a metody absorpční, které sledují pohlcování (absorpci) záření vzorkem. Podstatou ultrafialové a viditelné spektrofotometrie je absorpce ultrafialového nebo viditelného záření (200-800 nm) zředěnými roztoky molekul. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů,

keré jsou součástí molekulových orbitalů. Proto molekulová absorpční spektra v UV-VIS oblasti jsou svou podstatou elektronová spektra. Je-li absorpce záření nulová, je nulová i absorbance. S rostoucí absorpcí roste absorbance. Absorpce je přímo úměrná koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy [61].

UV-VIS spektrometr je poměrně jednoduchý přístroj. Paprsek světla z viditelného a/nebo UV záření je rozdělen na dílčí vlnové délky pomocí hranolu nebo difrakční mřížky. Každá vlnová délka je dále rozdělena na dva paprsky o stejné intenzitě pomocí půl zrcadlového zařízení. Jeden paprsek – paprsek vzorku – prochází kyvetou obsahující roztok, který byl studován na transparentním rozpouštědle. Druhý paprsek – referenční paprsek – prochází kyvetou obsahující pouze rozpouštědlo. Intenzity těchto světelných paprsků jsou měřeny elektronickými detektory a následně porovnány. Ultrafialová část se pohybuje v rozmezí 200 až 400 nm a viditelná část v rozmezí 400 až 800 nm. Různé sloučeniny mohou mít velmi odlišné absorpční maxima a absorbance. Látky s intenzivní absorpční musí být měřeny ve zředěném roztoku. Tato metoda vyniká především svojí dostupností, jednoduchostí a relativně nízkou nákladovostí v porovnání s jinými spektrometrickými metodami. Stanovení vzorku o nižší koncentraci bývá ve spojení s touto metodou obtížnější, protože je méně citlivá [69].

Ultrafialová a viditelná spektra se využívají k identifikaci neznámé organické látky a k porovnání změřeného spektra se známými spektry. Tato spektra jsou jednoduchá a poskytují pro identifikaci látky omezené množství informací, proto výsledky nejsou dostatečné k určení závěru o průkaznosti identifikace. Získáme však podklady, které doplňují informace z měření infračervených spekter, nukleární magnetické rezonance a hmotnostních spekter. Měření absorbance hojně využíváme ke kvantitativním analýzám, tedy určení koncentrace sloučenin metodou kalibrační křivky. UV-VIS spektrometrie je využívána v celách detektorů separačních metod [61].

3.4.2 Metody stanovení celkové antioxidační aktivity

Pro charakterizaci souhrnné koncentrace všech látek s antioxidačními účinky ve vzorku používáme termín celková antioxidační aktivita (TAA) [55]. V dnešní době existuje mnoho způsobů chemické analýzy a biologického hodnocení materiálů s antioxidačními vlastnostmi a byly vypracovány četné metody, kterými lze stanovovat celkovou antioxidační aktivitu. Tyto metody se svými principy navzájem odlišují a postupně se

vyvíjejí jejich další modifikace. Hlavním principem těchto metod je určování antioxidační nebo také redukční schopnosti sumy všech antioxidačních látek přítomných ve vzorku [70].

Metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity je mnoho, je to dáno působením různých mechanismů nízkomolekulárních antioxidantů. V metodách pro stanovení antioxidační aktivity se často využívá reakce antioxidantů s radikály či přechodnými kovy. Postupy pro stanovení antioxidační aktivity jsou založeny na různých principech. Obecně mohou být postupy stanovení TAA rozděleny do dvou skupin na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a metody posuzující redoxní vlastnosti látek. Jejich součástí je především spektrofotometrické měření, fluorometrie a chromatografie [53]. Samostatnou skupinou metod jsou metody testování antioxidační aktivity *in vivo* [70].

3.4.2.1 Metody založené na eliminaci radikálů

Metody využívající schopnosti vzorku vylákat volné radikály anebo alespoň zpomalit jejich tvorbu [53,55]. Radikály mohou být v reakční směsi generovány přímo nebo jsou do reakční směsi přidávány. Z chemického hlediska jde o radikály kyslíkové (hydroxyl, peroxy, superoxidový anion-radikál) nebo syntetické stabilní radikály (DPPH, ABTS, galvinoxyl). Zvláštní skupinu tvoří metody testující schopnost inhibovat nebo zpomalovat lipidovou peroxidaci [53,70].

- **Metoda TEAC**

Metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) patří k metodám eliminujícím syntetické radikály. Celková antioxidační aktivita se vztahuje k ekvivalentní koncentraci roztoku troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), což je ve vodě rozpustná látka strukturně podobná vitamínu E. Místo troloxu se používají i jiné standardy, nejčastěji askorbát, gallát a epikatechin. Jako další prekurzor radikálu můžeme použít látku ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)) [70].

- **Metoda DPPH**

DPPH (2,2-diphenyl-1-pikrylhydrazyl-hydrát) je stabilní radikál. Metoda je založena na redukci DPPH antioxidanty přítomnými ve vzorku za vzniku redukované

formy DPPH-H. Sleduje se odbarvení růžovo-fialového roztoku DPPH při jeho redukcí [70]. Výsledek reakce můžeme sledovat různými způsoby, nejčastější jsou měření absorbance - spektrofotometricky, metodou elektronové spinové rezonance a pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Celková antioxidační aktivita vzorků obsahujících směs antioxidantů se jako v předchozí metodě vztahuje k ekvivalentní koncentraci jiné látky, nejčastěji kyseliny askorbové nebo troloxu [70,71].

- **Další metody eliminující syntetické radikály**

Podobných metod může být mnoho, podle počtu použitých stabilních syntetických radikálů. Tyto metody jsou založené na stejném principu jako ty předchozí, a to na reakci stabilního syntetického radikálu s antioxidanty ve vzorku, kdy se redukce radikálu projeví nějakou měřitelnou změnou fyzikálně chemických vlastností roztoku radikálu.

Dalším syntetickým radikálem, který lze použít pro stanovení celkové antioxidační aktivity je například DMPD (dimethylfenylendiamin). Ten je v roztoku působením železité soli převeden na svoji radikálovou formu. Tato forma je stabilní a barevná. Po reakci se vzorkem se roztok radikálu odbarvuje a barevná změna se hodnotí spektrofotometricky [70,71].

- **Metoda ORAC**

Tato metoda (Oxygen Radical Absorbance Capacity) patří mezi metody, kde se pracuje s kyslíkovými radikály. Jejím principem je vytvoření peroxylového radikálu β -fykoeritrinu pomocí oxidačního činidla ABAP (2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid). Radikál reaguje se vzorkem a stanovuje se schopnost vzorku zastavit nebo zpomalit probíhající radikálovou reakci. Reakce se vyhodnocuje fluorimetricky a určuje se rychlost úbytku signálu fluorescence po přidání vzorku.

Při měření antioxidační aktivity v čajích není vhodné používat radikál β -fykoeritrin, protože u něj dochází k omezení fotostability. Je to vlivem polyfenolů, které se v hojně míře v čaji nacházejí. Proto je výhodnější místo něj použít fluorescein [70].

- **Vychytávání OH-radikálů**

Jako standardní antioxidační látka se používá kyselina salicylová, jejíž produkty se stanovují pomocí HPLC a UV detekcí, dále DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrrolin N-oxid),

jehož produkty se stanovují pomocí elektronové spinové rezonance a používá se i deoxyribóza a její produkty se určují pomocí reakce s kyselinou thiobarbiturovou [71].

- **Vychytávání superoxidového anion-radikálu**

K vytvoření superoxidového radikálu slouží reakce systému 5-methylfenazinium-methyl-sulfát (PMS) a nikotinamidadeninindinukleotidu (NADH). NADH může být nahrazen systémem xanthin/xanthinoxidáza. Radikál reaguje se vzorkem a zbytkový nezreagovaný radikál redukuje nitrotetrazoliovou modř. Nitrotetrazoliovou modř je možné nahradit formazanovým barvivem WST-1. Reakce se detekuje spektrofotometricky při 550-560 nm nebo elektronovou spinovou rezonancí [71].

- **Metody lipidově peroxidační**

Tyto metody vychází z toho, že volné radikály v organismu způsobují lipidovou peroxidaci. Přídavek vzorku s antioxidačními látkami se dávkuje k substrátu, v němž probíhá lipidová peroxidace a sleduje se její eliminace [70]. Antioxidační látky mohou reagovat s primárními kyslíkovými radikály, i se sekundárními radikálovými meziproducty nebo chelatují ionty přechodných kovů [71]. Substrátem mohou být jakékoliv tukové materiály od nenasycených mastných kyselin až po homogenáty živočišné tkáně, v kterých se lipidová peroxidace vzbuzuje tetrachlormetanem nebo peroxidem. Výsledná reakce se vyhodnocuje spektrofotometricky [70].

- **Detekce oxidačního poškození organismu**

Při těchto metodách se používají pokusná zvířata, u kterých se vyvolává oxidační stres a současně nebo po určité době se podává testovaná látka. Kritérii oxidačního poškození jsou 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin v moči, TBARS (látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou) v krvi, hydroperoxy a konjugované dieny v krvi, F2-isoprostany a etan + pentan ve vydechaném vzduchu [53,70,71].

3.4.2.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

Neenzymové antioxidanty mohou být charakterizovány jako redukční činidla, která reagují s oxidanty, redukuje je a tím je inaktivují. Z tohoto pohledu lze antioxidační aktivitu posuzovat na základě redukční schopnosti látky [53].

- **Metoda FRAP**

Tato metoda (Ferric Reducting Ability Power) je založena na redukcí železitých komplexů jako je 2,4,6-tripyridyl-S-triazin (TPTZ) s chloridem železitým (FeCl_3). V tomto případě dochází po redukcí k tvorbě barevných komplexů [72]. Metoda spočívá v redukcí železitých komplexů, které jsou skoro bezbarvé, pomocí antioxidantů ze vzorku. Železité komplexy se redukují na železnaté a vytvářejí barevné komplexy. Množství barevných komplexů je ekvivalentní k množství antioxidantních látek. Komplexy se detekují spektrofotometricky. Jako železité komplexy se používají TPTZ a ferrokyanid [70]. Pro měření antioxidantní aktivity čaje není tato metoda moc vhodná, protože polyfenolické látky reagují pomalu a nemusí být kompletně změřeny [71].

- **Cyklická voltametrie**

Tato metoda sleduje schopnost látek odštěpovat elektrony. Na pracovní elektrodu se přivádí určitou rychlostí potenciálový pulz a sledují se proudové odezvy v roztoku vzorku. Výsledkem je cyklický voltamogram. Redukční schopnost antioxidantů se určí z potenciálu anodického oxidačního píku E_A : čím je látka silnější antioxidant, tím je tato hodnota menší. Z píku anodického proudu I_A se zjišťuje množství antioxidantní látky [71].

- **Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí**

Mezi metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek můžeme přiřadit i HPLC s elektrochemickou detekcí [73,74]. Při této vysokoúčinné kapalinové chromatografii se využívají různé typy detektorů, jako jsou amperometrické a coulochemické detektory [53,71]

3.5 Senzorická analýza

Senzorickou analýzou rozumíme hodnocení potravin bezprostředně našimi smysly, včetně zpracování výsledků centrálním nervovým systémem. Analýza probíhá za takových podmínek, kdy je zajištěno objektivní, přesné a reprodukovatelné měření. Osoby, které se aktivně zúčastňují sensorické analýzy, se nazývají hodnotitelé nebo posuzovatelé. Soubor těchto osob se nazývá porota nebo panel. Jako konzument se označuje hodnotitel, který není speciálně odborně vzdělán, takže jeho názory, postoje i výsledky jsou blízké názorům skutečných spotřebitelů. Vlastní analýzy by měly probíhat pouze na specializovaných

pracovištích. Musí být eliminovány negativní vlivy, které by při vlastní analýze mohly působit na hodnotitele [75].

Smyslové hodnocení potravin bylo vždy předmětem zájmu spotřebitelů a nabývalo na významu s rostoucí mírou nasycenosti obyvatelstva. Přístupy ke smyslovému posuzování potravin i jeho metody se postupně vyvíjely až k metodám současným, založených na podrobných znalostech fyziologických principů vnímání, na objektivizaci výběru posuzovatelů, na vytvoření optimálních podmínek pro vlastní senzoricou analýzu a statistickém vyhodnocení senzoricých výroků. Za takových okolností může být senzorická analýza využívána v systémech řízení jakosti a kvality v produkci potravin [76].

3.5.1 Senzorické hodnocení čaje

Je mnoho druhů čaje a každý vyniká svoji chutí. Některé jsou vysoce hodnoceny pro svoji trpkost, jiné pro svoji sladkost či hořkost a spousta dalších vlastností, které čaj může mít. To ovšem neznamená, že každý čaj je dobrý [77]. Hodnocení jeho kvality vyžaduje značné zkušenosti. Způsob přípravy čajového výluhu spařením listů pro senzorické hodnocení udává ČSN ISO 3103. Vzorky je třeba připravit tak, aby posuzovatelé nebyli informováni o skutečnostech, které by mohly ovlivňovat jejich výsledek [78]. Špatná chuť může být způsobena vlivy, které nesouvisí s jakostí listu, například neodpovídajícím způsobem přípravy nebo použitím nevhodných přísad apod. [77]. Pokud voda obsahuje příliš velké množství minerálních látek, zejména vápníku, hořčíku a železa, projeví se to ztmavnutím a ztupěním barvy [14].

Hodnocení probíhá anonymně a barva výluhu se pomocí zrakového smyslu hodnotí proti bílému pozadí. Hodnotitelé posuzují nejen barvu daného výluhu, ale také intenzitu zabarvení [78]. U zelených čajů přecházejí barevné tóny výluhu od světle zelené po žlutou. Pokud se u nich vyskytne okrová či nahnědlá barva, tak to svědčí o stáří čaje [77].

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál a přístroje

4.1.1 Zelené čaje

Pro stanovení bioaktivních látek s antioxidační schopností bylo vybráno šest druhů sypaných zelených čajů. Vzorky čajů byly zakoupeny ve specializovaných obchodech s čajem. Byly použity čaje ze dvou producentů zemí, tři vzorky zelených sypaných čajů z Číny a tři vzorky zelených sypaných čajů z Japonska. Z každého vzorku byly připraveny tři čajové výluhy ve vodě při teplotě 60, 80 a 100 °C. Připravené vodné extrakty čajů se dále analyzovaly vybranými technikami.

Čínské čaje:

- vzorek č. 1 - Chun Mee „Vzácné obočí“



Obrázek 6. Čínský zelený čaj Chun Mee (Zdroj: Blažková)

Čínský zelený čaj Chun Mee (obrázek č. 6) je charakteristický drobnými lístky svinutými do tvaru „vrabčích jazýčků“ nebo obloučků připomínajících obočí. Barva suchého listu je šedozelená, nálev žlutý a chuť výrazná se sladkými tóny, při delším luhování trpčí. Postup přípravy čaje dle prodejce: luhování 1-2 minuty, teplota vody 85 °C a množství 7 g čaje/0,5 l vody.

- vzorek č. 2 - Gunpowder, Zhu Cha „Perlový čaj“



Obrázek 7. Čínský zelený čaj Gunpowder (Zdroj: Blažková)

Zelený čaj známý na Západě jako Gunpowder, v Číně jako Zhu Cha (obrázek č. 7). Lístky jsou zavinuty do malých granulí, kvůli čemu větší množství čaje připomíná střelný prach. Díky tomu je tento čaj odolný vůči stárnutí a vstřebávání pachů. Nálev má barvu žlutozelenou, chuť velmi silnou a dost trpkou. Postup přípravy čaje dle prodejce: luhování 1-2 minuty, teplota vody 80 °C a množství 7 g čaje/0,5 l vody.

- vzorek č. 3 - En Shi Yu Lu „Vzácná rosa“



Obrázek 8. Čínský zelený čaj En Shi Yu Lu (Zdroj: Blažková)

Tradiční zelený čaj pěstovaný v horách En Shi v provincii Hubei (obrázek č. 8). Svěží lístky jsou sbírány v jarním období. Zlatavý nálev má plnou, jemně kořeněnou chuť. Postup přípravy čaje dle prodejce: luhování 2-3 minuty, teplota vody 70-80 °C a množství 7 g čaje/0,5 l vody.

Japonské čaje:

- vzorek č. 1 - Sencha Kagoshima Yabukita



Obrázek 9. Japonský zelený čaj Sencha Kagoshima Yabukita (Zdroj: Blažková)

Vysoká třída zeleného japonského čaje Sencha z tradičního kultivaru Yabukita, z horských oblastí prefektury Kagoshima (obrázek č. 9). Čaj má upravený vzhled, Jehličkovitý tvar lístků tmavě zelené až smaragdové barvy. V chuti je znát svěžest a tóny čerstvě posečené trávy. Chuť je vyvážená a přechází do dlouhé sladké dochuti. Postup přípravy čaje dle prodejce: luhování 1-1,5 minuty, teplota vody 65-75 °C a množství 7 g čaje/0,5 l vody.

- vzorek č. 2 - Kukicha



Obrázek 10. Japonský zelený čaj Kukicha (Zdroj: Blažková)

Kukicha je zelený japonský čaj (obrázek č. 10), který se vyrábí převážně z řapíků čajových lístků, které nejsou žádoucí u čajů jako je Sencha. Díky minimálnímu použití

lístků se v čaji nevyskytuje téměř žádný kofein. Postup přípravy čaje dle prodejce: luhování 1-2 minuty, teplota vody 80 °C a množství 7 g čaje/0,5 l vody.

- **vzorek č. 3 – Tamaryokucha Mushisei**



Obrázek 11. Japonský zelený čaj Tamaryokucha Mushisei (Zdroj: Blažková)

Tamaryokucha Mushisei (obrázek č. 11) patří do vysoké třídy japonského čaje, který je zpracovaný na „čínský“ způsob. Je rolovaný do tvaru drobných kudrlinek. U tohoto typu čaje je oxidace zastavena napařením. V chuti je čaj spíše svěží a živý, příjemně nasládlý. Postup přípravy čaje dle prodejce: luhování 1-1,5 minuty, teplota vody 65-75 °C a množství 7 g čaje/0,5 l vody.

4.1.2 Chemikálie

- **Chemikálie použité pro přípravu výluhů/vodných extraktů čaje**

Pro přípravu vodných extraktů čaje byla použita demineralizovaná voda (MilliQ voda) vyrobená na přístroji Milli Q RG (Millipore, Massachusetts, USA).

- **Chemikálie použité pro analýzu HPLC**

Všechny použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) a dosahovaly čistoty p. a.. Rozpouštědla použitá jako mobilní fáze měla čistotu HPLC gradient grade. Pro stanovení vybraných fenolických sloučenin byly použity následující standardy: kyselina kávová, kyselina chlorogenová, kyselina gallová, kyselina p-kumarová a kyselina vanilová. Pro stanovení vybraných flavonoidních sloučenin byly použity následující standardy: katechin, epikatechin, epikatechin gallát, epigallokatechin a

epigallokatechin gallát. Dále byl použit acetonitril, methanol, kyselina octová a milliQ voda. MilliQ voda byla vyrobena na přístroji Milli Q RG (Millipore, Massachusetts, USA).

- **Chemikálie použité pro stanovení antioxidační aktivity**

Pokud není uvedeno jinak, byly chemikálie zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pro stanovení obsahu celkových bílkovin Biuretovou metodou byla použita reagensie 1 Biuretovo činidlo, které se skládalo ze 100 mM vinan sodno-draselný, 100 mM hydroxid sodný (NaOH), 15 mM jodid draselný (KI) a 6 mM síran měďnatý (CuSO₄). Pro stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH testu byla použita reagensie 1, která se skládala z 0,190 mM DPPH, 50% DMSO a 10 mM acetátového pufru (pH 4). Pro stanovení antioxidační aktivity pomocí metody FRAP byly použity tři reagensie. Reagensie 1 (10 mM roztok TPTZ, 40 mM kyselina chlorovodíková (HCl)), reagensie 2 (20 mM chlorid železitý (FeCl₃)) a reagensie 3 (20 mM acetátový pufr (pH 3,6)). Pro stanovení obsahu celkových fenolů byla použita reagensie 1 (3,75% Folin-Ciocalteuovo činidlo) a reagensie 2 (10% uhličitan sodný (Na₂CO₃)). MilliQ voda byla vyrobena na přístroji Milli Q RG (Millipore, Massachusetts, USA).

- **Chemikálie použité pro analýzu CE**

Pokud není uvedeno jinak, byly chemikálie zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pro analýzu CE byl použit 150 mM borátový pufr (pH 8,5). Byly použity následující standardy: kyselina gallová a kofein. MilliQ voda byla vyrobena na přístroji Milli Q RG (Millipore, Massachusetts, USA).

4.1.3 Přístroje a pomůcky

V této práci byly použity následující přístroje a pomůcky: Analytická váha EP 240A (Precisa, Česká republika), Milli Q RG (Millipore, Massachusetts, USA), HPLC Agilent Technologies 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, USA), BS 200 (Mindray, Čína), 3D CE (Agilent Technologies, Německo), Automatická pipeta (Biohit, Německo), Mikrozkušavky 1,5 ml (Eppendorf, Německo), Odměrná baňka 100 ml, Odměrný válec 50 ml (VWR, Česká republika), Falconky 50 ml (Eppendorf, Německo), Vialky 400 µl (Chromservis, Česká republika), LUT Syringe filters Nylon 13 mm, 0,45 µm (LABICON, Česká republika).

4.2 Metody

Pro tento experiment bylo použito několik analytických technik a biochemických metod. Jako první byla použita analytická instrumentace – vysokoúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Následovalo stanovení antioxidační aktivity různými biochemickými metodami vyhodnocením absorbančních křivek. Dále byla využita analytická technika kapilární elektroforézy. A na závěr byla provedena senzorická analýza.

4.2.1 Příprava vzorků

Všechny vodné výluhy čajů byly připraveny stejným postupem, bez ohledu na doporučení přípravy výrobcem. Z každého vzorku byly připraveny tři výluhy použitím různých teplot zalévané vody. Z jednotlivých druhů čaje (čaje čínské a čaje japonské) byl navážen do 100 ml odměrné baňky 1 g vzorku (Analytická váha EP 240A, Precisa, Česká republika). Navážené vzorky byly zality 50 ml MiliQ vody o teplotě 60, 80 a 100 °C. Luhování trvalo 5 minut a následně byl výluh slit do připravené 50 ml falkonky. Získaný roztok byl přefiltrován pomocí filtru (LUT Syringe filters Nylon 13 mm, 0,45 µm, LABICON, Česká republika), aby se zabránilo ucpání kolony a další instrumentace. Po zchlazení byly vzorky použity k analýze HPLC (HPLC Agilent Technologies 1200 Series, Agilent Technologies, Palo Alto, USA), biochemické analýze přístrojem BS-200 (Mindray, Čína), analýze CE (3D CE, Agilent Technologies, Německo). Takto připravené výluhy byly také použity k orientační senzorické analýze.

4.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Po vodné extrakci čaje byly připravené vzorky použity k analýze HPLC (HPLC Agilent Technologies 1200 Series, Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Touto technikou byly stanoveny vybrané fenolické a flavonoidní sloučeniny. Výsledek je vyjádřen jako µg vybrané sloučeniny/g navážky čaje.

Systém vysokoúčinné kapalinové chromatografie byl sestaven z následujících částí:

odplyňovač Agilent Technologies 1200 Series (model G1379B), binární pumpa Agilent Technologies 1200 Series (model G1312B), autosampler Agilent Technologies 1200 Series (model G1367D), termostat na kolonu Agilent Technologies 1200 Series (model G1316B), detektor diodového pole Agilent Technologies 1200 Series (model

G1315C), trojitý kvadrupól 6460 Triple Quad LC/MS (model G6460A) a kolona ZORBAX EC 18 o rozměrech 50 x 3,0 mm a velikostí částic 2,7 µm.

1) Separace vybraných fenolických sloučenin

Mobilní fáze se skládala z A: 100% methanolu a B: 0,2% octová kyselina. Byl použit lineární gradient: 0,00 min (85% B), 0,17 min (85% B), 0,50 min (75% B), 1,70 min (70% B), 4,00 min (70% B) a 6,00 min (85% B). Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min a kolona byla termostatována na 45 °C.

Parametry trojitého kvadrupólu: ESI negativní mód, teplota plynu 300 °C, průtok plynu 12 l/min, nebulizer 45 psi, teplota zaostřovacího plynu 250 °C, průtok zaostřovacího plynu 11 l/min, napětí na kapiláře 3500 V.

2) Separace vybraných flavonoidních sloučenin

Mobilní fáze se skládala z A: 100% acetonitril a B: 0,2% octová kyselina. Byl použit lineární gradient: 0.0 min (80%B), 0.3 min (40%B), 1.4 min (0%B), 1.8 min (80%B). Průtok mobilní fáze byl 0.7 ml/min a kolona byla termostatována na 60 °C.

Parametry trojitého kvadrupólu: ESI negativní mód, teplota plynu 350 °C, průtok plynu 12 l/min, nebulizer 45 psi, teplota zaostřovacího plynu 300 °C, průtok zaostřovacího plynu 11 l/min, napětí na kapiláře 3500 V.

4.2.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Ke stanovení celkové antioxidační aktivity z výluhů čajů byl použit přístroj BS 200 automatický analyzátor (Mindray, Čína). Do části reagenční byly nepipetovány veškeré potřebné reagenty a do vzorkové části byly vloženy připravené vzorky výluhů čajů. Jednotky u stanovení celkových bílkovin jsou uvedeny v mg proteinu/g navážky čaje a u stanovení celkových fenolů byl výsledek převeden na ekvivalent kyseliny gallové (GAE) v jednotkách µmol GAE/g navážky čaje. Výsledek antioxidační aktivity byl vyjádřen jako ekvivalent troloxu (TE). Vzorek výluhu měl celkově takový antioxidační potenciál jako ekvivalentní množství kyseliny gallové nebo troloxu. U metody DPPH jsou jednotky uvedeny v mmol TE/g navážky čaje a u metody FRAP jsou jednotky uvedeny v µmol TE/g navážky čaje.

Automatický spektrofotometr se skládá z následujících částí:

kyvetový prostor (temperovaný na $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$), reagenční prostor s karuselem pro reagenzie a přípravu vzorků (temperovaný na $4 \pm 0,1^\circ\text{C}$) a optický detektor.

Zdrojem světla je halogen-wolframová žárovka. Přenos vzorků a reagenzí zabezpečuje robotické rameno s dávkovací jehlou. Obsah kyvet je promíchán automatickým míchadlem ihned po přidání činidla nebo vzorku o objemu 2-45 μl . Kontaminace je minimalizována díky proplachování jak dávkovací jehly, tak míchadla MilliQ vodou. Pro detekci je možné využít vlnových délek: 340, 405, 450, 510, 546, 578, 630, 670 nm. Zařízení je plně kontrolováno softwarem BS 200 (Mindray, Čína).

1) Stanovení celkových bílkovin pomocí Biuretové metody

Efektivitu luhování čaje jsme zjišťovali pomocí stanovení obsahu celkových proteinů ve výluzích. Principem stanovení celkových proteinů pomocí Biuretové metody je reakce peptidové vazby s $\text{Cu}^{(\text{II})}$ v alkalickém prostředí za tvorby modrofialového zbarvení. Do kyvety bylo napipetováno 150 μl Biuretova činidla (100 mM vinan sodno-draselný, 100 mM NaOH, 15 mM KI, 6 mM CuSO_4) a následně bylo napipetováno 3 μl vzorku. Po 5 min inkubace při 37°C byla změřena absorbance při vlnové délce $\lambda = 546$ nm. Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance samotné reagenzie a hodnoty absorbance po 5 minutové inkubaci se vzorkem.

2) Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody DPPH

Metoda je založena na schopnosti stabilního volného radikálu DPPH reagovat s donory vodíku. DPPH^\bullet vykazuje silnou absorpci v UV-VIS spektru. Při tomto testu se po redukci antioxidantem (AH) nebo radikálem (R^\bullet) roztok odbarví dle následující reakce: $\text{DPPH}^\bullet + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^\bullet$, $\text{DPPH}^\bullet + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{DPPH-R}$ [79]. Do plastových kyvet bylo pipetováno 150 μl reagenzie R1 (0,095 mM DPPH, DMSO, acetátový pufr (pH 4)), následně bylo přidáno 15 μl měřeného vzorku. Absorbance byla měřena 5 minut při $\lambda = 510$ nm. Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance před přidáním vzorku (2. minuta měření) a hodnoty absorbance po 7 minutách.

3) Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody FRAP

Metoda FRAP je založena na redukci železitých komplexů TPTZ s chloridem železitým (FeCl_3), které jsou téměř bezbarvé (popř. slabě nahnědlé) a po redukci tvoří

modře zbarvený železnatý komplex. Měření probíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH (3,6). Základem byla příprava roztoku FRAP, který obsahoval 3 reagentie (smíchané v poměru 1:1:10): reagentie 1 (10 mM TPTZ, 40 mM HCl), reagentie 2 (FeCl₃) a reagentie 3 (acetátový pufr (pH 3,6)). Do plastových kyvet bylo pipetováno 150 µl reagentie a následně bylo přidáno 3 µl vzorku. Absorbance byla měřena 5 minut při $\lambda = 578$ nm. Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance před přidáním vzorku (2. minuta měření) a hodnoty absorbance po 7 minutách.

4) Stanovení celkových fenolů

Metoda je založena na oxidaci fenolických látek v alkalickém prostředí, kdy ze žluté fosfowolframové heteropolykyseliny vzniká modrý komplex, jehož maximální absorpce je závislá na kvantitativním a kvalitativním složení fenolických směsí. Folin-Ciocalteuovo činidlo obsahuje sloučeniny, které jsou schopny reagovat s fenolickými sloučeninami. Při reakci dochází k redukcí látky na chromogeny, které jsou měřeny při absorbanci v rozmezí vlnových délek 700 – 760 nm. Do plastových kyvet bylo napipetováno 316 µl reagentie R1, následně bylo přidáno 4 µl měřeného vzorku. Reakce byla odstartována přidáním 80 µl reagentie R2. Absorbance byla měřena 10 minut při $\lambda = 670$ nm. Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance před přidáním vzorku (2. minuta měření) a hodnoty absorbance po 7 minutách.

4.2.4 Kapilární elektroforéza

Analýza pomocí kapilární elektroforézy byla provedena na stroji 3D CE (Agilent Technologies, Německo) v nepokryté křemenné kapiláře s celkovou délkou 58,5 cm, efektivní délkou 50 cm a vnitřním průměrem 75 µm. Fotometrická detekce probíhala při 200 nm. Jako separační elektrolyt byl použit 150 mM borátový pufr (pH 8,5). Separační napětí bylo 20 kV a vzorek byl dávkován tlakem 50 mbar po dobu 5 s.

4.2.5 Orientační sensorická analýza

Byla zvolena vhodná metoda pro sensorické hodnocení a byl sestaven dotazník. Orientační sensorická analýza zeleného čaje byla provedena na skupině nezávisle vybraných laických hodnotitelů. Jednalo se o skupinu hodnotitelů složenou ze zaměstnanců a studentů Ústavu chemie a biochemie Mendelovy univerzity v Brně. Každý konzument obdržel sensorický dotazník, tužku, degustační skleničku. Poté byly postupně

předloženy hodnotitelům jednotlivé vzorky zelených čajů (příprava čajů proběhla stejně jako v předchozích analýzách), které ochutnávali a následně hodnotili jejich vybrané sensorické parametry. Jako neutralizátor bylo zvoleno bílé pečivo. K sensorickým parametrům, které byly hodnoceny podle v praxi nejrozšířenější stupnicové metody, patřily u čajových nálevů: barva, vůně, chuť a intenzita chutí, u hodnocení suroviny to byla barva, vůně a celkový dojem. Pro účely této práce byla využita pěti bodová stupnice se slovním popisem, která vyjadřuje jakost hodnoceného vzorku. Pro větší počet vzorků bylo hodnocení rozděleno nadvakrát, mezi hodnocením byla dána delší přestávka. Dotazníky byly vyhodnoceny a výsledky statisticky zpracovány.

U čajových výluhů, připravovaných při různé teplotě vody (60, 80 a 100 °C), se hodnotily následující deskriptory: barva, vůně, chuť a intenzita chutí. Hodnocení barvy, vůně a chuti čajového výluhu bylo provedeno za použití stupnice od 1 do 5, přičemž jednotlivé stupně hodnocení klesaly od vynikající kvality k nedostačující. Hodnocení intenzity chutí čajového výluhu bylo provedeno za použití stupnice od 1 do 5, přičemž jednotlivé stupně hodnocení klesaly od silně výrazné intenzity k nepatrné intenzitě. U samotné suroviny zeleného čaje se hodnotily deskriptory: barva, vůně a celkový dojem. Vzorky byly hodnoceny stejnou stupnicí jako barva, vůně a chuť čajových výluhů.

4.2.6 Statistické vyhodnocení získaných dat

Výsledky práce byly statisticky zpracovány v programu Microsoft Excel. Výsledky shrnuté v kapitole 5.1, 5.2 a 5.3 jsou výsledkem průměru ze tří opakování. Do sloupcových grafů byly zaneseny reálné chybové úsečky (směrodatná odchylka). Výsledky v kapitole 5.4 jsou průměrem hodnocení od 10-ti hodnotitelů.

Použité statistické pojmy [80]: Aritmetický průměr (\bar{x}), směrodatná odchylka (s_x , SD). U statistického vyhodnocení sensorické analýzy bylo použito navíc i dalších statistických pojmů: Variační koeficient (v_x), medián (\tilde{x}) je hodnota, minimální (MIN) a maximální (MAX) hodnota souboru.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro tuto práci bylo použito několik analytických technik a biochemických metod (analýza HPLC; biochemická analýza obsahu celkových bílkovin a fenolů, stanovení antioxidační aktivity pomocí metod DPPH a FRAP; analýza CE) a na závěr byla provedena senzorická analýza.

Pomocí kvantitativní analýzy HPLC byly stanoveny vybrané přírodní antioxidanty (fenolické a flavonoidní sloučeniny) z vodných extraktů čajů (čaje čínské a čaje japonské). U těchto čajů byla analyzována antioxidační aktivita pomocí výše zmíněných metod. Srovnávány byly elektroferogramy kvantitativní analýzy CE čajů čínských a japonských a u vybraného vzorku byla porovnána odlišná příprava čaje (teplota 60, 80 a 100 °C). Ve všech analýzách byla srovnávána závislost na typu použité teploty při přípravě zeleného čaje.

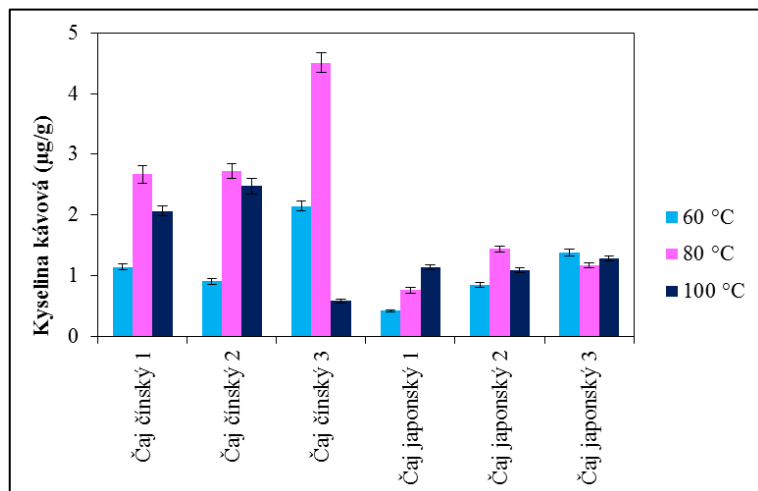
5.1 Výsledky analýzy technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Stanovení přírodních antioxidantů (fenolických a flavonoidních sloučenin) z vodných extraktů sypaných zelených čajů probíhalo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pomocí této analytické techniky byly kvantifikovány obsahy vybraných fenolických sloučenin ve vodných extraktech zelených čajů (kyselina kávová, chlorogenová, gallová, p-kumarová a vanilová) a flavonoidních sloučenin (katechin, epikatechin, epikatechin gallát, epigallokatechin a epigallokatechin gallát). Získané výsledky byly přepočteny na 1 g navážky čaje a směrodatná odchylka u všech stanovení vycházela 3 až 6,7 %. Naměřené koncentrace (průměr ze tří měření) u jednotlivých čajových výluhů pro fenolické a flavonoidní sloučeniny jsou uvedeny v příloze 1.

5.1.1 Stanovení fenolických kyselin

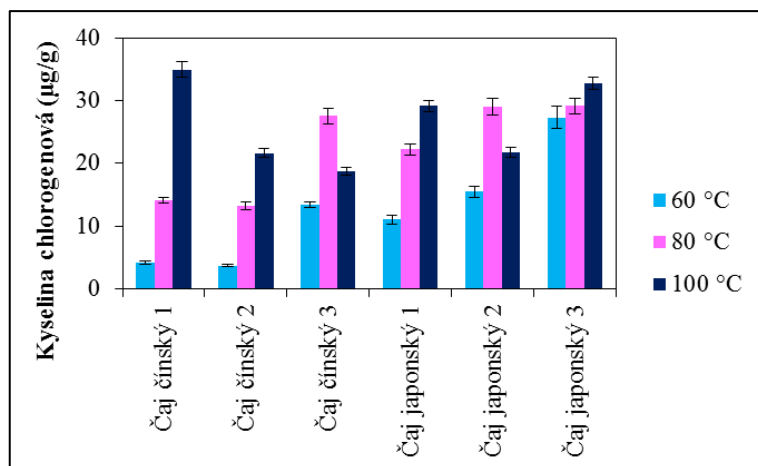
Jak je z obrázku č. 12 patrné, výrazně nejvyšší zastoupení kyseliny kávové (4,51 $\mu\text{g/g}$) se vyskytovalo u výluhu čínského čaje 3 při zalití vodou o teplotě 80 °C. Srovnatelné množství kyseliny kávové se vyskytovalo u čaje čínského 2 (2,72 $\mu\text{g/g}$) a čaje čínského 1 (2,67 $\mu\text{g/g}$). Kromě výluhu čaje japonského 1 a 3 vycházelo nejvyšší množství kyseliny kávové u výluhů připravených teplotou vody 80 °C. Celkově nejnižší naměřené hodnoty

kyseliny kávové vykazovaly výluhy z čaje japonského 1 (0,43 $\mu\text{g/g}$ při teplotě 60 $^{\circ}\text{C}$, 0,76 $\mu\text{g/g}$ při teplotě 80 $^{\circ}\text{C}$ a 1,15 $\mu\text{g/g}$ při teplotě 100 $^{\circ}\text{C}$).



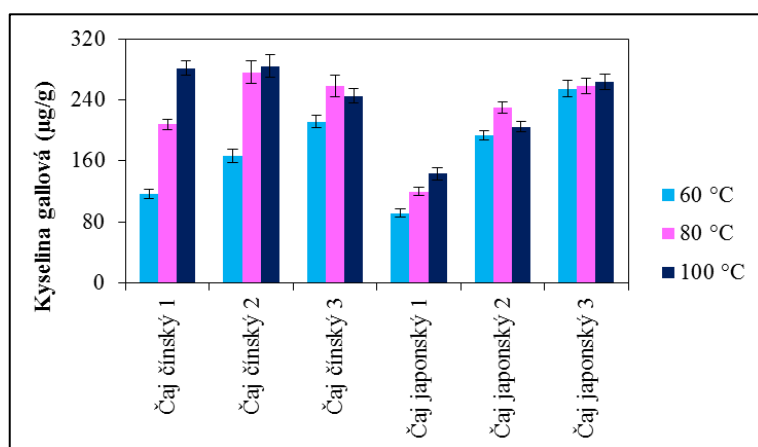
Obrázek 12. Koncentrace kyseliny kávové u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/ g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 $^{\circ}\text{C}$. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.

Při stanovení koncentrace kyseliny chlorogenové (obrázek č. 13) vyšly v některých případech i desetinásobně vyšší koncentrace než u koncentrace kyseliny kávové. Celkově vycházely nejvyšší koncentrace u výluhů připravených zalitím vodou o teplotě 100 či 80 $^{\circ}\text{C}$. Nejvyšší koncentrace kyseliny chlorogenové vyšla u výluhu čínského čaje 1 (34,94 $\mu\text{g/g}$), dále u čaje japonského 3 (32,74 $\mu\text{g/g}$), oba připravených zalitím 100 $^{\circ}\text{C}$ vodou. Dalšími hodnotami výrazně vyššími byly u čaje japonského 1 (29,14 $\mu\text{g/g}$) připraveného výluhu zalitím 100 $^{\circ}\text{C}$ vody a u čaje japonského 3 (29,14 $\mu\text{g/g}$) připraveného zalitím 80 $^{\circ}\text{C}$ vody. O něco nižší hodnotu měla koncentrace čaje japonského 2 (29,04 $\mu\text{g/g}$) připraveného vodou o teplotě 80 $^{\circ}\text{C}$. Výrazně nejnižší koncentrace kyseliny chlorogenové byly naměřeny u výluhů připravených zalitím vodou o teplotě 60 $^{\circ}\text{C}$, konkrétně čaj čínský 2 (3,77 $\mu\text{g/g}$) a čaj čínský 1 (4,18 $\mu\text{g/g}$).



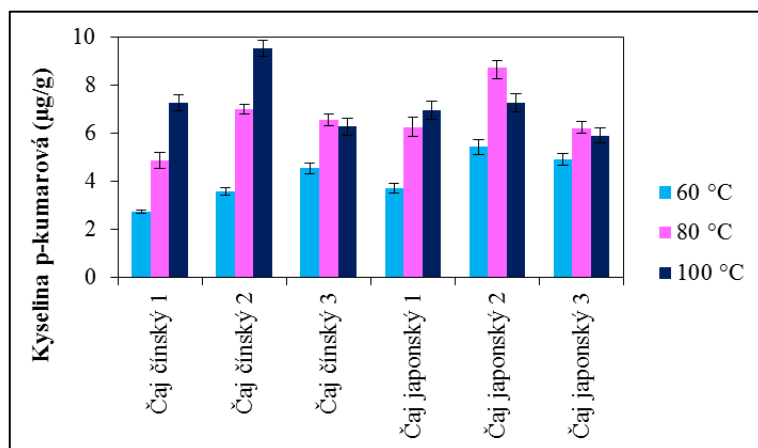
Obrázek 13. Koncentrace kyseliny chlorogenové u výluhů zelených čajů čínských a japonských (µg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření ± SD.

Obrázek č. 14 znázorňuje koncentrace kyseliny gallové ve výluzích zelených čajů. U výluhu čaje čínského 2 (284,27 µg/g) a čaje čínského 1 (281,73 µg/g), dále u výluhu čaje japonského 3 (263,58 µg/g) a čaje japonského 1 (143,02 µg/g), vyšly nejvyšší koncentrace kyseliny gallové u výluhů připravených vodou o teplotě 100 °C oproti dvěma ostatním teplotám přípravy konkrétních čajů. Výrazně nejnižší koncentrace kyseliny gallové vyšly u čaje japonského 1 (91,55 µg/g u teploty vody 60 °C, 119,64 µg/g u teploty 80 °C a 143,02 µg/g u teploty 100 °C).



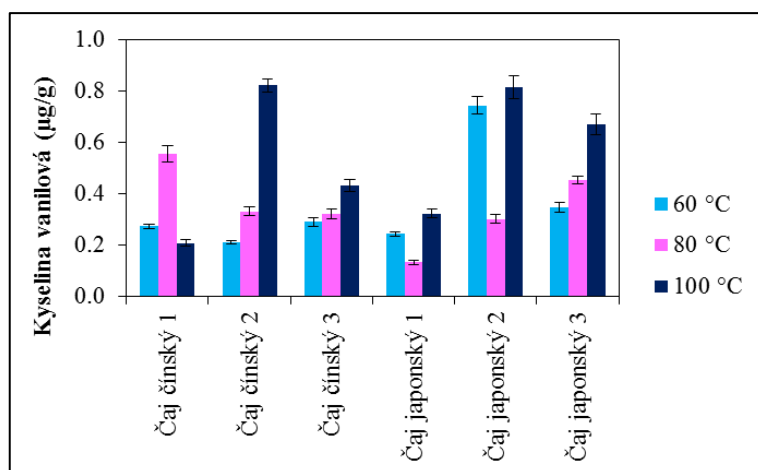
Obrázek 14. Koncentrace kyseliny gallové u výluhů zelených čajů čínských a japonských (µg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření ± SD.

Stanovené hodnoty koncentrací kyseliny p-kumarové je znázorněno na obrázku č. 15. Nejvyšší koncentrace kyseliny p-kumarové byla naměřena u čaje čínského 2 (9,51 $\mu\text{g/g}$) připraveného vodou o teplotě 100 °C. Celkově nejnižší koncentrace kyseliny p-kumarové vycházela u čaje čínského 1 (2,74 $\mu\text{g/g}$). U poloviny vzorků (čaj čínský 1 a 2, čaj japonský 1) vyšla nejvyšší koncentrace kyseliny p-kumarové u výluhů připravených vodou 100 °C. U druhé skupiny čajů (čaj čínský 3, čaj japonský 2 a 3) vyšla nejvyšší koncentrace kyseliny p-kumarové u výluhů připravených zalitím vody o teplotě 80 °C.



Obrázek 15. Koncentrace kyseliny p-kumarové u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.

Na obrázku č. 16 můžeme vidět nejnižší hodnoty naměřené koncentrace ze všech analyzovaných fenolických kyselin, v tomto případě koncentrace kyseliny vanilové. Hodnoty koncentrace kyseliny vanilové nepřesáhly 1 $\mu\text{g/g}$. Výrazně nejvyšší koncentrace této kyseliny byla naměřena u čaje čínského 2 (0,82 $\mu\text{g/g}$) při 100 °C, dále u čaje japonského 2 při 100 °C (0,81 $\mu\text{g/g}$) a u téhož čaje při 60 °C (0,74 $\mu\text{g/g}$). Nejnižší naměřené hodnoty koncentrace kyseliny vanilové byly u čaje japonského 1 (0,13 $\mu\text{g/g}$ u teploty 80 °C).



Obrázek 16. Koncentrace kyseliny vanilové u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.

Souhrnem lze říci, že nejnižší naměřené hodnoty koncentrace fenolických kyselin u čajových výluhů byly naměřeny u kyseliny vanilové (od 0,13 do 0,82 $\mu\text{g/g}$), vyšší byly u kyseliny kávové (od 0,43 do 4,51 $\mu\text{g/g}$), dále u kyseliny p-kumarové (od 2,74 do 9,51 $\mu\text{g/g}$), u kyseliny chlorogenové (od 3,77 do 34,94 $\mu\text{g/g}$) a nejvyšší koncentrace byly naměřeny u kyseliny gallové (od 91,55 do 284,27 $\mu\text{g/g}$). Nebylo pozorováno, že by u všech těchto látek se vzrůstající teplotou vody rostla i jejich koncentrace ve výluzích. Každý vzorek čaje má dle výrobce doporučenou jinou teplotu přípravy, tím mohly být způsobeny právě rozdíly mezi koncentracemi u jednotlivých vzorků. Většinou vycházely nejvyšší koncentrace u výluhů připravovaných teplotou vody 80 nebo 100 °C.

Ve studii [81], která se zabývala stanovením fenolických kyselin u zelených čajů technikou UHPLC, připravili všechny vzorky čaje shodnou teplotou vody 80 °C. U zeleného čaje stanovili koncentraci kyseliny kávové vyšší v porovnání s našimi výsledky výluhu připravených při teplotě 80 °C (150 $\mu\text{g/g}$ s použitím detektoru elektronového záchytu - ECD a 200 $\mu\text{g/g}$ s použitím UV detektoru)(obrázek č. 12). Nejvyšší koncentrace kyseliny kávové v našem experimentu vyšla u čaje čínského 3 (4,51 $\mu\text{g/g}$). Ve stejné studii [81] byly naměřeny nižší koncentrace kyseliny gallové než při našem měření (obrázek č. 14). Jejich výsledky koncentrace kyseliny gallové byly při použití ECD detektoru 150 $\mu\text{g/g}$ a při použití UV detektoru vyšla koncentrace 230 $\mu\text{g/g}$. Naše výsledky vyšly o něco vyšší, a to u čaje čínského 2 (284,27 $\mu\text{g/g}$) při použití teploty vody 100 °C. S použitím teploty

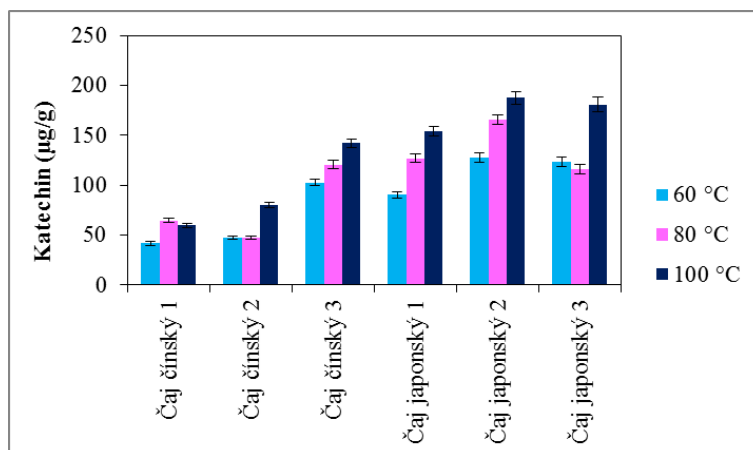
vody 80 °C nám vyšla nejvyšší koncentrace u čaje čínského 2 (276,04 µg/g), tedy opět o něco vyšší koncentrace kyseliny gallové než uvádí uvedená studie.

Ve studii [82] připravili vzorky zeleného čaje k analýze HPLC fingerprint odlišnou metodou, extrakcí za použití 35% methanolu. Průměrná koncentrace kyseliny chlorogenové v zeleném čaji jim vyšla 720 µg/g. Naše nejvyšší naměřená hodnota koncentrace kyseliny chlorogenové (obrázek č. 13) byla u výluhu čaje čínského 1 připraveného za použití teploty vody 100 °C (34,94 µg/g). Naše nejvyšší koncentrace tedy vyšla nižší, než uvádí citovaná studie. Technikou HPLC fingerprint a při přípravě zeleného čaje extrakcí v 35% methanolu [82], vyšla u stejné studie koncentrace kyseliny gallové vyšší (1080 µg/g) než v našem měření (obrázek č. 14). S použitím rozdílné metody extrakce, tedy methanolové extrakce vycházejí všeobecně vyšší hodnoty než u našich vodných výluhů.

Pro srovnání našich výsledků s odbornou literaturou nebyl nalezen vhodný zdroj, ve kterém by bylo uvedeno stanovení kyseliny p-kumarové a vanilové ve vzorcích zeleného čaje. Zároveň nebyla nalezena žádná odborná studie, ve které by porovnávali obsah fenolických kyselin u zelených čajů při různých typech přípravy čajových výluhů.

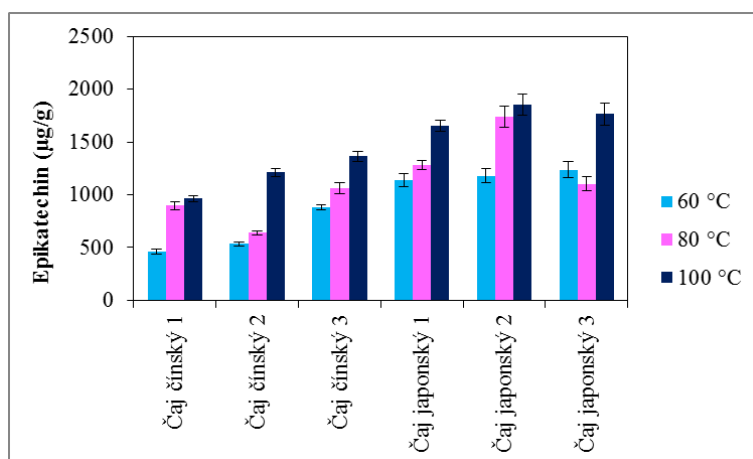
5.1.2 Stanovení flavonoidních sloučenin

Na obrázku č. 17 je patrné, že koncentrace katechinu byla celkově vyšší u čajů japonských. Nejvyšší koncentrace byly u těchto čajů naměřeny ve výluzích připravených teplotou vody 100 °C. Nejvyšší koncentrace dosahoval čaj japonský 2 (187,67 µg/g), dále čaj japonský 3 (180,59 µg/g) a čaj japonský 1 (154,31 µg/g). U čaje japonského 2 byla naměřena nejvyšší koncentrace katechinu i při teplotě vody 80 °C (165,77 µg/g). Čaje čínské obsahovaly nižší koncentrace katechinu, nejméně čaj čínský 1 a za ním následoval čaj čínský 2. Téměř ve všech případech se koncentrace katechinu se zvyšující se teplotou vody zvyšovala, kromě čaje čínského 1 a čaje japonského 3.



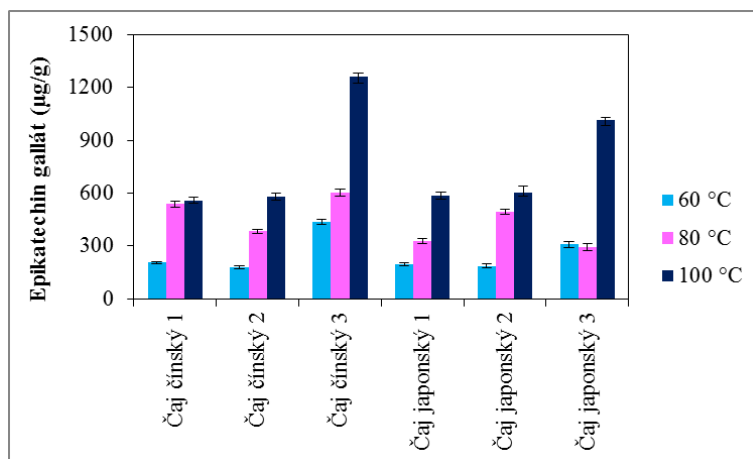
Obrázek 17. Koncentrace katechinu u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.

Při kvantifikaci koncentrace epikatechinu (obrázek č. 18) si můžeme všimnout výrazně vyšších koncentrací ve všech vzorcích, oproti obsahu katechinu v předchozím případě. Je patrné, že nejvyšší naměřené koncentrace epikatechinu byly u výluhů připravených teplotou vody 100 °C. Celkově nejvyšší koncentrace vyšla u čaje japonského 2 (1852,12 $\mu\text{g/g}$), u čaje japonského 3 (1763,34 $\mu\text{g/g}$) a u čaje japonského 1 (1650,33 $\mu\text{g/g}$). Nejnižší naměřené koncentrace epikatechinu vyšly u čaje čínského 1.



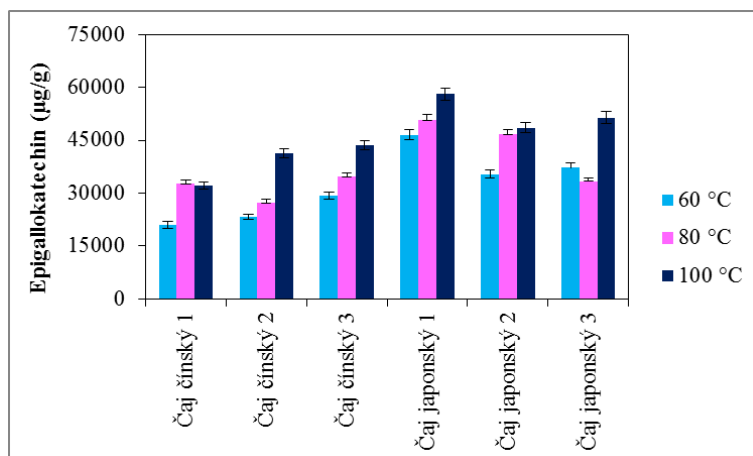
Obrázek 18. Koncentrace epikatechinu u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.

Obrázek č. 19 zobrazuje hodnoty koncentrace epikatechin gallátu ve vzorcích zeleného čaje. Výrazně nejvyšší koncentrace epikatechin gallátu vyšla u čaje čínského 3 (1259,71 $\mu\text{g/g}$) a u čaje japonského 3 (1011,72 $\mu\text{g/g}$). Kromě čaje japonského 3 je u všech vzorků viditelné, že se stoupající teplotou vody při přípravě stoupá i koncentrace epikatechin gallátu v zelených čajích.



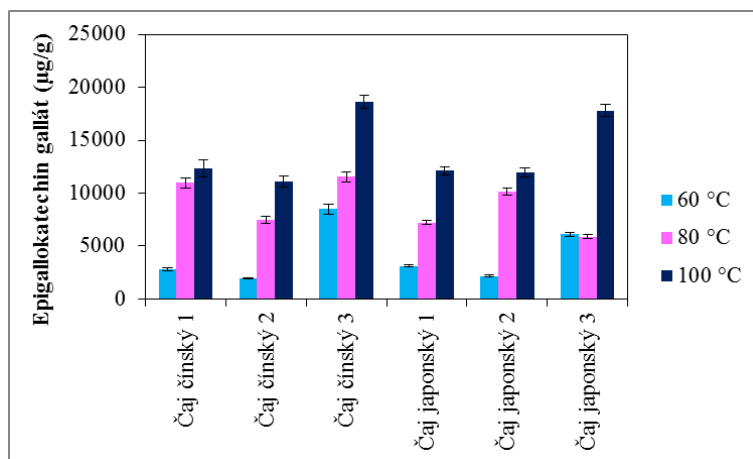
Obrázek 19. Koncentrace epikatechin gallátu u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.

Z celé skupiny katechinů je zastoupení epigallokatechinu v našich vzorcích zeleného čaje výrazně nejvyšší (obrázek č. 20). Kromě prvního vzorku čaje čínského 1, se ve všech případech opět stanovila nejvyšší koncentrace epigallokatechinu ve výluzích čajů připravených za nejvyšší teploty vody. Nejvyšší koncentrace epigallokatechinu byla naměřena u čaje japonského 1 (58075,44 $\mu\text{g/g}$) a dále u čaje japonského 3 (51359,30 $\mu\text{g/g}$). Celkově si můžeme všimnout, že u čajů japonských byl stanoven nejvyšší obsah epigallokatechinu. Čaje čínské obsahovaly této stanovované látky výrazně méně.



Obrázek 20. Koncentrace epigallokatechinu u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.

Poslední vybranou stanovovanou látkou z řady flavonoidů byl epigallokatechin gallát. Naměřené koncentrace můžeme sledovat na obrázku č. 21. Ve všech případech bylo u výluhů čajů připravených teplotou vody 100 °C stanoveno nejvyšší množství epigallokatechin gallátu. Nejvyšší hodnota byla naměřena u čaje čínského 3 (18654,65 $\mu\text{g/g}$) a čaje japonského 3 (17810,84 $\mu\text{g/g}$).



Obrázek 21. Koncentrace epigallokatechin gallátu u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.

Celkově lze říci, že nejnižší naměřené hodnoty koncentrace flavonoidních sloučenin u čajových výluhů byly naměřeny u katechinu (od 41,79 do 187,67 $\mu\text{g/g}$), vyšší byly u epikatechin gallátu (od 180,54 do 1259,71 $\mu\text{g/g}$), dále u epikatechinu (od 463,55 do

1852,12 $\mu\text{g/g}$), u epigallokatechin gallátu (od 1938,90 do 18654,65 $\mu\text{g/g}$) a nejvyšší koncentrace byly naměřeny u epigallokatechinu (od 21057,82 do 58075,44 $\mu\text{g/g}$). U všech sloučenin lze pozorovat stejný trend, kdy se vzrůstající teplotou vody při přípravě, roste i koncentrace flavonoidů ve výluzích. Z výsledných grafů je patrný podobný trend u všech sloučenin, protože spolu všechny funkčně souvisí.

Ve studii [81] použili ke stanovení koncentrace katechinu techniku UHPLC a vzorky zeleného čaje byly připraveny za použití vody o teplotě 80 °C. V porovnání s našimi výsledky (obrázek č. 17) vyšly koncentrace katechinu ve zmíněné studii vyšší. U použitého ECD detektoru vyšla koncentrace katechinu v zeleném čaji 480 $\mu\text{g/g}$ a s použitím UV detektoru jim vyšla koncentrace 550 $\mu\text{g/g}$. Nejvyšší výsledek v naší práci dosahoval výluh připravený teplotou vody 100 °C, konkrétně čaj japonský 2 (187,67 $\mu\text{g/g}$) a ten stejný čaj připravený teplotou vody 80 °C (165,77 $\mu\text{g/g}$) dosahoval taktéž nižších výsledků koncentrace katechinu než porovnávaná studie.

Ve studii [82], kde použili k analýze zeleného čaje techniku HPLC fingerprint, připravili vzorky extrakcí 35% methanolem. Jejich naměřené průměrné výsledky byly u katechinu 1440 $\mu\text{g/g}$, u epikatechinu 6660 $\mu\text{g/g}$, u epikatechin gallátu 12800 $\mu\text{g/g}$, u epigallokatechinu 19040 $\mu\text{g/g}$ a nejvyšší naměřená průměrná koncentrace byla u epigallokatechin gallátu 70550 $\mu\text{g/g}$. V našem experimentu vyšly nejvyšší naměřené koncentrace u stanovení epigallokatechinu (obrázek č. 20), konkrétně u čaje japonského 1 (58075,44 $\mu\text{g/g}$) připraveného teplotou vody 100 °C, což je výrazně vyšší výsledek než uvádí citovaná studie. Naopak nejvyšší výsledek u epigallokatechin gallátu (obrázek č. 21) nám vyšel o poznání nižší oproti uvedené studii, konkrétně u čaje čínského 3 (18654,65 $\mu\text{g/g}$) připraveného taktéž použitím nejvyšší teploty vody. V uvedené studii používali jinou metodu extrakce, s použitím methanolu, proto jejich výsledky nemohou být porovnatelné s našimi vodnými výluhy.

Ve studii [83] porovnávali různé teploty vody (75, 85 a 95 °C) při přípravě tureckého zeleného čaje. Následně porovnávali obsah katechinů a jejich vliv na senzorický dojem z čaje. Katechiny byly analyzovány pomocí techniky HPLC s detektorem diodového pole. Naměřené průměrné hodnoty koncentrace byly u katechinu 2900 $\mu\text{g/g}$, u epikatechinu 1600 $\mu\text{g/g}$, u epikatechin gallátu 21200 $\mu\text{g/g}$, u epigallokatechinu 43400 $\mu\text{g/g}$ a nejvyšší naměřená průměrná koncentrace byla u epigallokatechin gallátu 86900 $\mu\text{g/g}$. Optimální podmínky přípravy tohoto zeleného čaje byly shledány u výluhu připraveného

vodou o teplotě 85 °C, který obsahoval epigallokatechin gallát v množství 50690 µg/g. Nejvyšší výsledek u epigallokatechin gallátu (obrázek č. 21) nám vyšel u čaje čínského 3 (18654,65 µg/g) připraveného použitím teploty vody 100 °C. Při přípravě teplotou vody 80 °C nám vyšel nejvyšší výsledek koncentrace epigallokatechin gallátu u stejného vzorku čaje (11528,96 µg/g). Námi naměřené hodnoty byly nižší, než uvádí citovaná studie.

5.2 Výsledky stanovení celkové antioxidační aktivity

Pro charakterizaci souhrnné koncentrace všech látek s antioxidačními účinky ve vzorku používáme termín celková antioxidační aktivita [55]. V dnešní době existuje mnoho metod, kterými lze stanovovat celkovou antioxidační aktivitu. Hlavním principem těchto metod je určování antioxidační nebo také redukční schopnosti sumy všech antioxidačních látek přítomných ve vzorku [70].

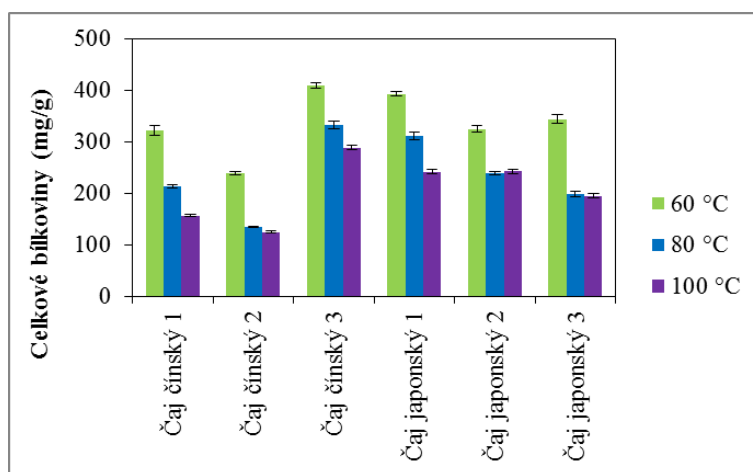
Stanovované antioxidační látky přítomné v zeleném čaji byly v našem případě fenolické a flavonoidní sloučeniny. Ke stanovení antioxidační aktivity u zelených čajů, připravovaných různou teplotou vody při extrakci, bylo použito metod DPPH a FRAP. Celkové proteiny byly stanoveny Biuretovou metodou a celkové fenoly reakcí s Folin-Ciocalteuovým činidlem.

Jednotky u stanovení celkových bílkovin jsou uvedeny v mg proteinu/g navážky čaje a u stanovení celkových fenolů byl výsledek převeden na ekvivalent kyseliny gallové v jednotkách µmol GAE/g navážky čaje. Výsledek antioxidační aktivity byl vyjádřen jako ekvivalent troloxu (TE). V případě stanovení metodou DPPH v jednotkách mmol TE/g navážky a v případě metody FRAP v jednotkách µmol TE/g navážky. Směrodatná odchylka se pohybovala u jednotlivých stanovení v rozmezí 0,5 až 3,2 %. Naměřené koncentrace (průměr ze tří měření) u jednotlivých čajových výluhů pro stanovení celkových bílkovin a fenolů a pro stanovení celkové antioxidační aktivity jsou uvedeny v příloze 2.

5.2.1 Stanovení celkového obsahu bílkovin

Na obrázku č. 22 můžeme pozorovat, že obecně se zvyšující se teplotou docházelo u všech čajů ke snížení obsahu proteinů, které se pravděpodobně vyšší teplotou denaturovaly. V první skupině čajů (čaj čínský 1 a 3, čaj japonský 1) se stoupající teplotou klesalo úměrně množství vyluhovaných proteinů. Například u čaje čínského 1 ze 321,9

mg/g navážky při teplotě 60 °C se množství proteinů snížilo na 213,8 mg/g navážky při teplotě 80 °C (snížení o 33,6 %) a na 156,4 mg/g navážky při 100 °C (snížení o 51,4 %). Podobných výsledků bylo dosaženo u čaje čínského 3 a čaje japonského 1, avšak snížení obsahu proteinů při zvýšení teploty luhování ze 60 °C na 100 °C nebylo až tak dramatické (max. 38,2 %). Nejvyšší množství vyluhovaných proteinů bylo dosaženo při 60 °C u čaje čínského 3 (408,9 mg/g navážky) a čaje japonského 1 (392,7 mg/g navážky). Ve druhé skupině čajů (čaj čínský 2 a čaj japonský 2 a 3) se zvýšením teploty ze 60 na 80 °C došlo ke snížení množství proteinů, avšak při dalším zvýšení teploty na 100 °C se množství vyluhovaných proteinů významně nezměnilo.



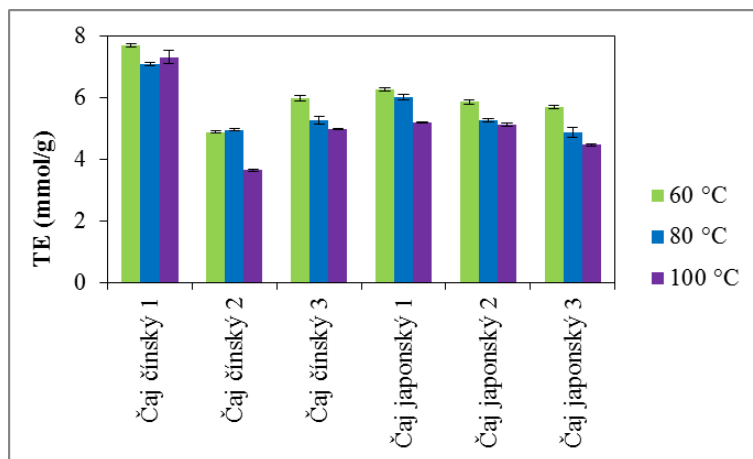
Obrázek 22. Koncentrace celkových bílkovin u výluhů zelených čajů čínských a japonských (mg proteinu/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tři měření ± SD.

V odborné literatuře nebyl nalezen údaj o stanovení celkových bílkovin ve vyluzích zelených čajů, proto nebylo možné námi naměřené hodnoty porovnat. V naší studii je patrné, že se zvyšující se teplotou se vyluhovalo méně celkových bílkovin, kvůli denaturaci. Nejvyšší naměřené koncentrace celkových bílkovin vycházely u výluhů připravených teplotou vody 60 °C.

5.2.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Antioxidační aktivita u výluhů čaje, měřená metodou DPPH, znázorněna na obrázku č. 23, dosahovala nejvyšších hodnot u výluhů čaje připravených při 60 °C. Nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity bylo dosaženo u čínského čaje 1 (7,67 mmol TE/g navážky), dále následoval čaj japonský 1 (6,25 mmol TE/g navážky), čaj čínský 3 (5,97

mmol TE/g navážky) a čaj japonský 2 (5,86 mmol TE/g navážky). Vyšších hodnot bylo dosaženo u čaje japonského 3 (5,69 mmol TE/g navážky). Nejnižší hodnoty bylo dosaženo u čaje čínského 2, kde hodnoty při 80 °C (4,95 mmol TE/g navážky) a 60 °C (4,88 mmol TE/g navážky) byly téměř stejné.



Obrázek 23. Antioxidační aktivita stanovená metodou DPPH u výluhů zelených čajů čínských a japonských (mmol ekvivalentu troloxu/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.

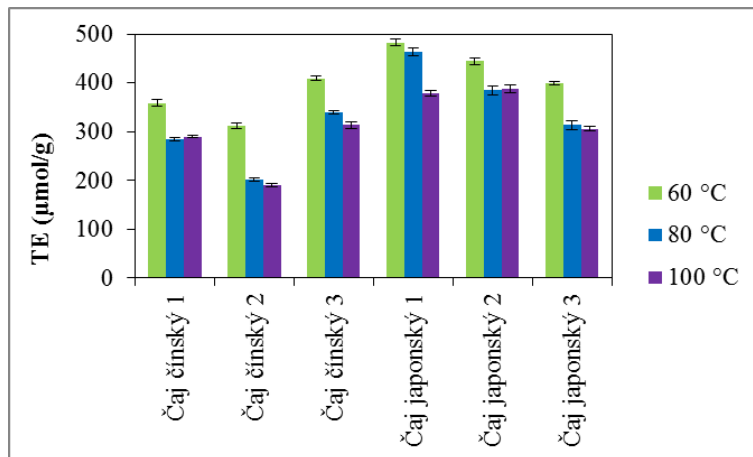
Celkově vycházely vyšší hodnoty antioxidační aktivity u čajových výluhů připravených nejnižší teplotou vody 60 °C. Se zvyšující se teplotou vody se tedy snižuje antioxidační aktivita čajových výluhů.

Výsledky mohou být porovnány s výsledky závěrečné práce [84], která se také zabývala stanovením antioxidační aktivity u zelených čajů. Příprava výluhu proběhla za použití vody o teplotě 80 °C. Vzorky byly analyzovány metodou TEAC, srovnatelnou s námi použitou metodou DPPH (obrázek č. 23). Antioxidační aktivita byla ve výše zmíněné studii stanovena v rozmezí 1,18 až 2,64 mmol TE/g, což jsou hodnoty nižší než námi naměřené. Ve studii [85] byla hodnocena antioxidační aktivita výluhů zelených čajů. Sice nebyla uvedena teplota vody při přípravě čajů, avšak výsledné hodnoty antioxidační aktivity vycházely od 38 do 58 mmol TE/100 ml, jež jsou výsledky vyšší oproti naší studii.

5.2.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP

Při měření antioxidační aktivity metodou FRAP (obrázek č. 24) byl pozorován podobný trend, kde nejvyšších hodnot antioxidační aktivity dosahoval výluh při teplotě 60 °C. Nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity dosahoval čaj japonský 1 (482,1 μ mol TE/g

navážky), za ním následoval čaj japonský 2 (444,5 $\mu\text{mol TE/g}$ navážky) a čaj čínský 3 (408,6 $\mu\text{mol TE/g}$ navážky). Další pořadí bylo následující: čaj japonský 3 (398,9 $\mu\text{mol TE/g}$ navážky), čaj čínský 1 (359,0 $\mu\text{mol TE/g}$ navážky) a čaj čínský 2 (312,0 $\mu\text{mol TE/g}$ navážky).



Obrázek 24. Antioxidační aktivita stanovená metodou FRAP u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μmol ekvivalentu troloxu/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.

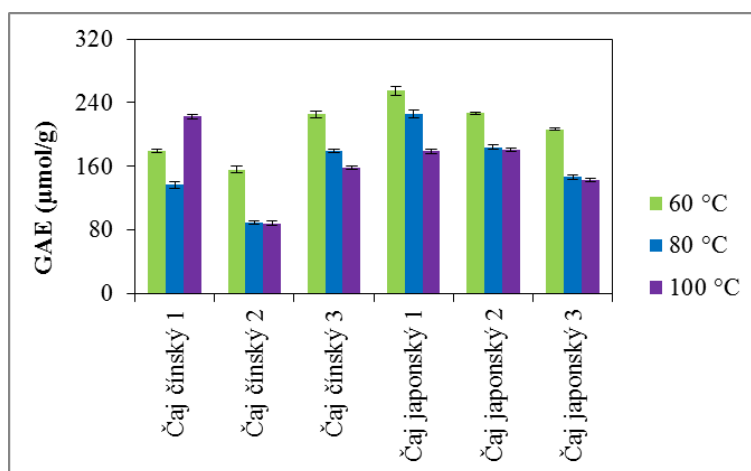
Celkově vycházely vyšší hodnoty antioxidační aktivity u čajových výluhů připravených nejnižší teplotou vody 60 °C. Se zvyšující se teplotou vody se tedy snižuje antioxidační aktivita čajových výluhů.

Ve studii [86] porovnávali různé teploty vody při přípravě čajových výluhů (20 až 90 °C). U připravených výluhů zelených čajů stanovovali antioxidační kapacitu metodou FRAP. V této studii vyšla antioxidační aktivita pětkrát vyšší u výluhů připravených teplotou vody 90 °C než při teplotě vody 20 °C. U teploty 90 °C byla naměřena hodnota 2500 $\mu\text{mol TE/g}$. V porovnání s našimi výsledky (obrázek č. 24) jsou hodnoty v uvedené studii vyšší. Navíc v našem experimentu vycházely nejvyšší hodnoty u výluhů připravených teplotou vody 60 °C.

5.2.4 Stanovení celkového obsahu fenolů

Na obrázku č. 25 můžeme pozorovat, že nejvyšší obsah celkových fenolů byl zjištěn u výluhů čajů při teplotě 60 °C, s výjimkou čaje čínského 1, kde byl nejvyšší obsah celkových fenolů stanoven při teplotě 100 °C. Nejvyšší absolutní hodnoty dosahoval čaj japonský 1 (254,9 $\mu\text{mol GAE/g}$ navážky) při teplotě 60 °C. Za ním následoval čaj

japonský 2 (226,5 $\mu\text{mol GAE/g}$ navážky) a čaj čínský 3 (225,1 $\mu\text{mol GAE/g}$ navážky) při teplotě 60 °C. Zvýšením teploty ze 60 na 100 °C se obsah fenolů snížil u čaje japonského 1 o 30,9 % , čaje japonského 2 o 25,5 % a čaje čínského 3 o 30,2 % .



Obrázek 25. Koncentrace celkových fenolů u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μmol ekvivalentu kyseliny gallové/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.

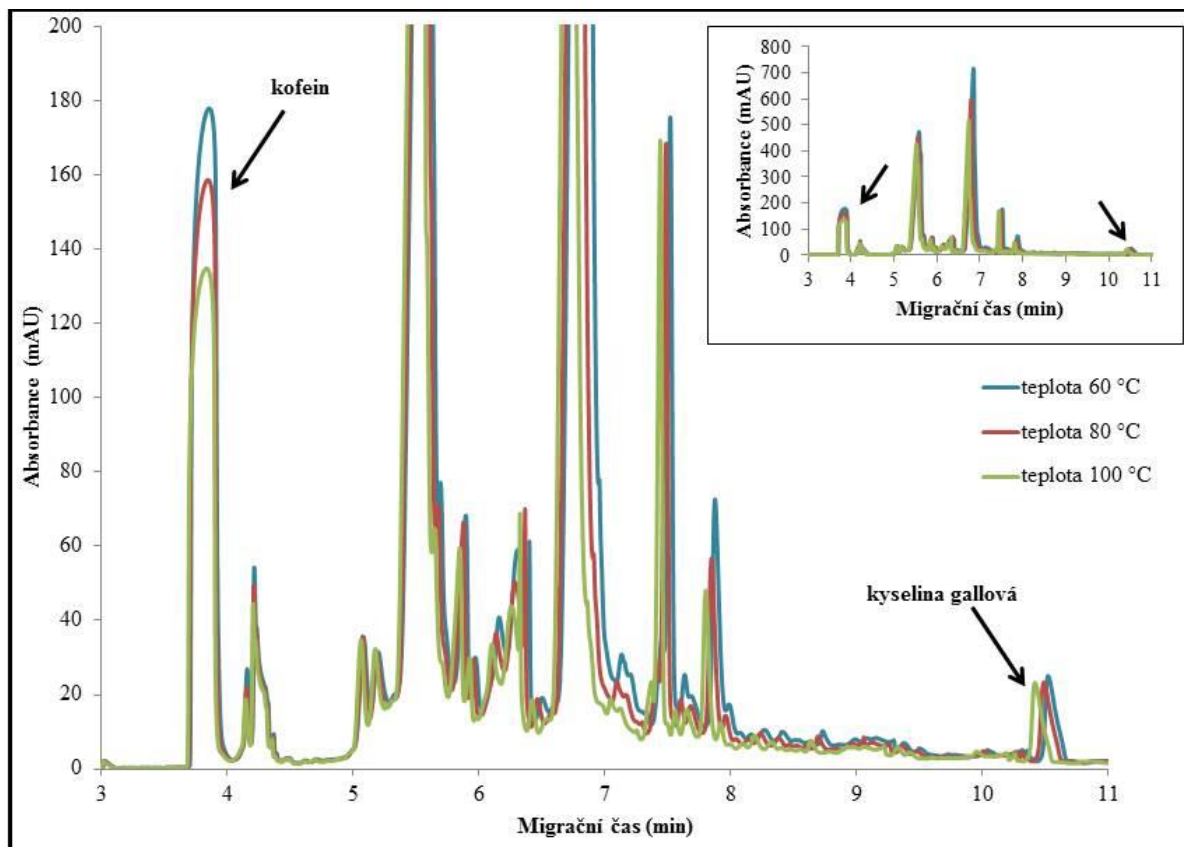
Závěrečná práce [84] se zabývala i stanovením celkových fenolů u zelených čajů. Příprava výluhu proběhla za použití vody o teplotě 80 °C. Vzorby byly analyzovány spektrofotometrickou metodou s pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Stanovené hodnoty koncentrace fenolových sloučenin u zelených čajů se pohybovaly od 480 do 1000 $\mu\text{mol GAE/g}$. V porovnání s našimi výsledky výluhů připravených při 80 °C (obrázek č. 25), které se pohybovaly v rozpětí od 89,04 do 225,52 $\mu\text{mol GAE/g}$, jsou hodnoty v uvedené studii vyšší.

5.3 Výsledky analýzy technikou kapilární elektroforézy

Při analýze výluhů zelených čajů na kapilární elektroforéze, byly ze všech naměřených dat vybrány dva výsledné elektroferogramy výluhů zelených čajů.

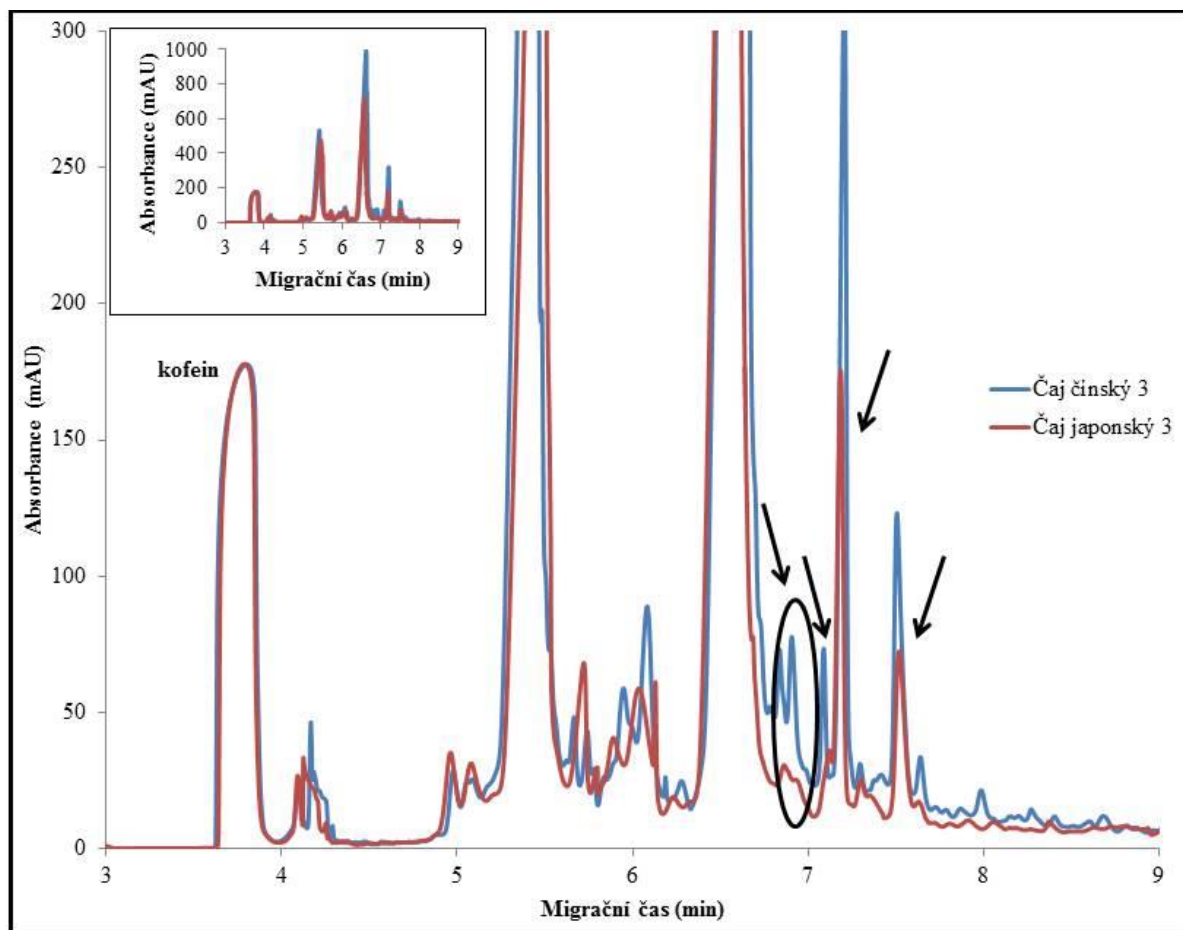
Z typického elektroferogramu zobrazeného na obrázku č. 26 (japonský čaj 3) je patrná přítomnost velkého množství složek ve výluhu. Proložením elektroferogramů získaných pro čaj extrahovaný při různých teplotách je zřejmé, že extrakce některých složek (označeno šipkou) je citlivější na teplotu přípravy. Z důvodu nedostupnosti všech standardů nebylo možno provést identifikaci všech signálů. Nicméně pík s migračním časem 3,8 minuty byl identifikován jako signál kofeinu. Je vidět, že s nárůstem extrakční

teploty o 40 °C se snížil signál kofeinu o 20,9 %, zatímco například signál kyseliny gallové nevykázal žádnou změnu.



Obrázek 26. Elektroferogram výluhu japonského čaje 3 připraveného za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C.

Porovnání čínských a japonských čajů zobrazeného na obrázku č. 27, ukazuje vysokou podobnost jejich složení. Stejně jako v předchozím případě nebylo možné identifikovat všechny složky směsi, ale je patrné, že obsah kofeinu (pík s migračním časem 3,8 min) je v obou porovnávaných vzorcích shodný.



Obrázek 27. Elektroferogram porovnání výluhů čaje čínského 3 a japonského 3 připravených za použití teploty vody 60 °C. Nejmarkantnější rozdíly (jak kvalitativní tak kvantitativní) jsou označeny šipkou.

Naše výsledky analýzy technikou kapilární elektroforézy nebyly kvantifikovány, proto není možné výsledky porovnat s nalezenými odbornými studii a zároveň se žádná studie nezabývala porovnáním zelených čajů připravených různými teplotami vody.

S použitím separační techniky MEEKC (mikroemulzní elektrokinetická chromatografie) ve studii [87] analyzovali vzorky čaje připravené zalitím vodou o teplotě 100 °C (1 g ve 20 ml vody). V této studii však nebylo konkrétně uvedeno, o jaký typ čaje se jedná. Stanovovali koncentraci epigallokatechin gallátu (57,7 µg/ml) a epikatechinu (84,7 µg/ml). Jejich výsledné koncentrace v porovnání s našimi výsledky z analýzy technikou HPLC, byly o poznání nižší. V další studii [88] se zabývali analýzou katechinů v zeleném čaji použitím techniky CD-MEKC. Vzorky připravili luhováním vodou o teplotě 85 °C a porovnávali výsledné koncentrace katechinů v čajích mezi sebou.

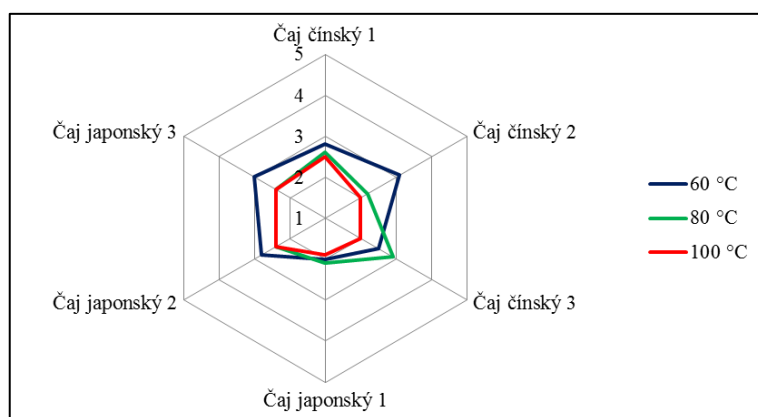
5.4 Výsledky orientační sensorické analýzy

Senzorická analýza byla provedena za účelem monitoringu chuťové přijatelnosti použitých výluhů zelených čajů v předcházejících analýzách. Všichni hodnotitelé ze souboru vyplnili sensorický dotazník (příloha 4) a hodnotili základní parametry 18-ti vzorků čajů, které byly anonymní.

V následujících pavučinových či sloupcových grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty sensorických parametrů od 10-ti hodnotitelů. Výsledná hodnocení sensorické analýzy jsou statisticky vyhodnocena a shrnuta v příloze 3.

5.4.1 Sensorické hodnocení čajových výluhů

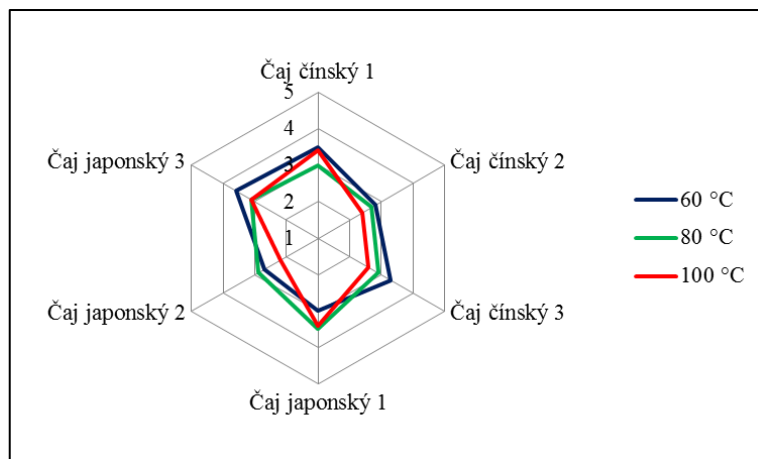
Z pavučinového grafu (obrázek č. 28) vyplývá, že nejlépe a nejvíce vyrovnaně byly z hlediska deskriptoru barvy čajového výluhu hodnoceny čaje připravené zalitím nejvyšší teplotou vody, a to 100 °C. Čaj čínský 2, čaj čínský 3 a čaj japonský 1 měli nejlepší hodnocení (2). Nejhůře hodnoceny byly čaje připravené s vodou o teplotě 60 °C, konkrétně čaj japonský 3 (3) a čaj čínský 2 (3,1). Průměrně byla barva čaje hodnocena jako velmi dobrá (2) až dobrá (3). Nejlépe hodnoceným čajem byl čaj japonský 1 a nejhůře hodnoceným čajem byl čaj čínský 1.



Obrázek 28. Sensorické hodnocení barvy výluhů zelených čajů čínských a japonských. Vzorky byly připraveny za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Stupnice bodového hodnocení byla 1 – vynikající až 5 – nedostačující. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnocení 10-ti hodnotitelů.

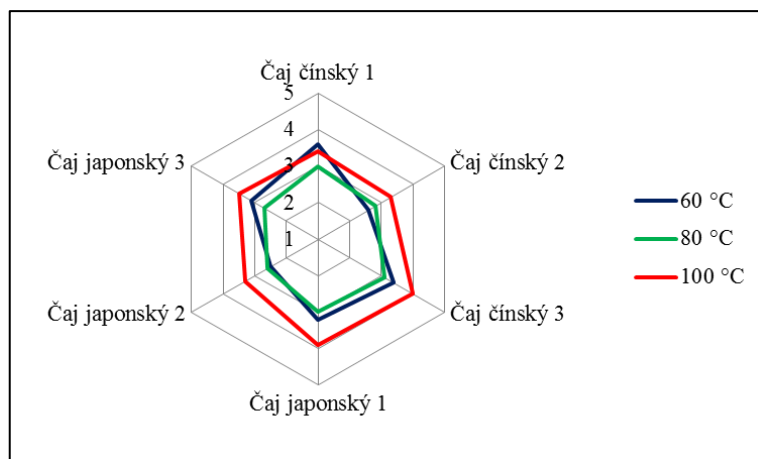
Při sensorickém hodnocení vůně čajových výluhů byly vzorky hodnoceny o něco hůře jako v předcházejícím případě. Z obrázku č. 29 vyplývá, že nejlépe byly z hlediska deskriptoru vůně hodnoceny čaj japonský 2 (2,2), čaj čínský 2 (2,4) a čaj čínský 3 (2,6),

všechny připravené zalitím nejvyšší teplotou vody 100 °C. Nejhůře hodnoceny byly dva čaje připravené s vodou o teplotě 60°C, čaj čínský 1 (3,5) a čaj japonský 3 (3,6) a jeden čaj připravený vodou o teplotě 80 °C, čaj japonský 1 (3,5). Nejhorší hodnocení získal čaj čínský 1 a čaj japonský 1. Nejlépe byla hodnocena vůně čaje japonského 2.



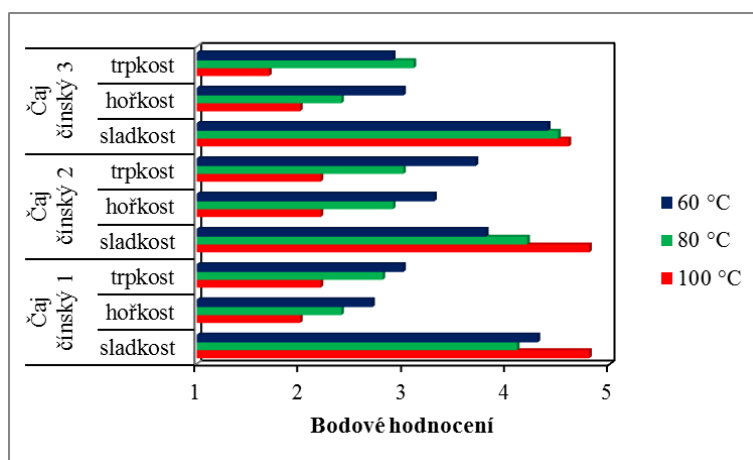
Obrázek 29. Sensorické hodnocení vůně výluhů zelených čajů čínských a japonských. Vzorky byly připraveny za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Stupnice bodového hodnocení byla 1 – vynikající až 5 – nedostačující. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnocení 10-ti hodnotitelů.

Z pavučinového grafu (obrázek č. 30) vyplývá, že nejlépe byl z hlediska deskriptoru chuti hodnocen čaj japonský 2 a naopak čaj čínský 3 byl hodnocen nejhůře. Celkově byla nejhůře hodnocena chuť u čajů připravených 100°C vodou. Nejhůře dopadl čaj čínský 3 (4) a čaj japonský 1 (3,9). Dále byl negativně hodnocen čaj čínský 1, připravený zalitím 60°C vody (3,6). Ze všech vzorků nejlépe dopadl čaj japonský 2, při teplotě vody 60 °C měl průměrné hodnocení 2,5 a při teplotě vody 80 °C měl průměrné hodnocení 2,6. Hodnocení 2,6 bylo také přiřazeno čaji čínskému 2, který byl připraven vodou o 60 °C.



Obrázek 30. Sensorické hodnocení chuti výluhů zelených čajů čínských a japonských. Vzorky byly připraveny za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Stupnice bodového hodnocení byla 1 – vynikající až 5 – nedostačující. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnocení 10-ti hodnotitelů.

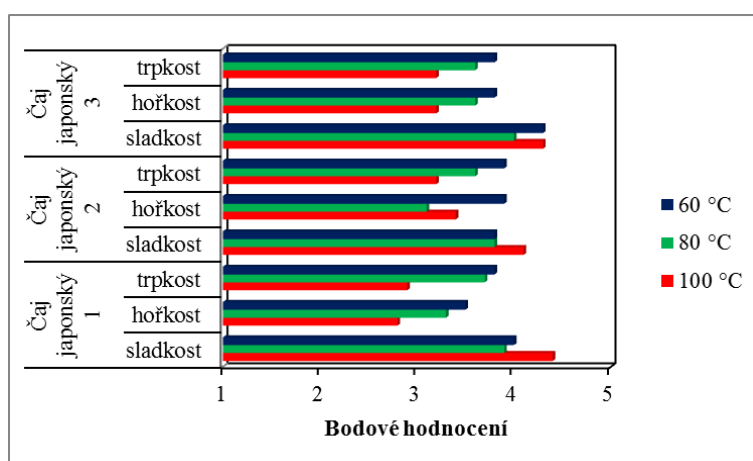
Z následujícího sloupcového grafu (obrázek č. 31) můžeme pozorovat průměrné hodnocení intenzity vybraných chutí (sladkost, hořkost a trpkost) u výluhů čínských čajů a z obrázku 32 můžeme pozorovat totéž, ale pro čaje japonské.



Obrázek 31. Sensorické hodnocení intenzity sladkosti, hořkosti a trpkosti výluhů zelených čajů čínských. Vzorky byly připraveny za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Stupnice bodového hodnocení byla 1 – silně výrazná až 5 – nepatrná. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnocení 10-ti hodnotitelů.

Obrázek č. 31 znázorňuje, že při hodnocení sladkosti vyšel, v porovnání s ostatními vzorky, nejhůře (nejméně intenzivní sladká chuť) čaj čínský 3, dále čaj čínský 1 a nejlépe (intenzivnější chuť) čaj čínský 2. Všechny tyto čaje měly nejhorší (nejméně intenzivní)

hodnocení sladké chuti při teplotě vody 100 °C, čaj čínský 1 (4,8), čaj čínský 2 (4,8) a čaj čínský 3 (4,6). Dále byla hodnocena intenzita hořké chuti u vzorků čajů z Číny. Nejméně intenzivní hořkou chuť měl čaj čínský 2, připravený vodou o teplotě 60 °C (3,3). Nejvíce intenzivní hořkou chuť měl čaj čínský 1 (2) a čaj čínský 3 (2), připravené zalitím 100°C vody. Při hodnocení trpkosti vyšel čaj čínský 3 jako nejtrpčí a čaj čínský 2 jako nejméně trpký. Konkrétně u čaje čínského 3, při zalití nejvyšší teplotou vody 100 °C, byla intenzita trpké chuti hodnocena bodově 1,7. A u čaje čínského 2, při zalití nejnižší teplotou vody 60 °C, byla intenzita trpké chuti hodnocena bodově 3,7 (nejméně intenzivní).

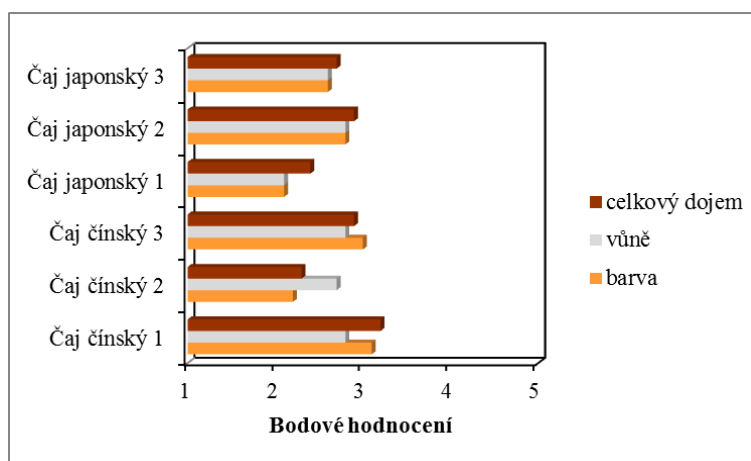


Obrázek 32. Sensorické hodnocení intenzity sladkosti, hořkosti a trpkosti výluhů zelených čajů japonských. Vzorky byly připraveny za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Stupnice bodového hodnocení byla 1 – silně výrazná až 5 – nepatrná. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnocení 10-ti hodnotitelů.

Z obrázku č. 32 je patrné, že u vzorků japonských čajů byly celkově hodnoceny intenzity chutí (sladkost, hořkost, trpkost) jako méně výrazné, čaje japonské měly vyšší bodové hodnocení oproti čajům čínským. Při hodnocení sladké chuti měl čaj japonský 2 nejnižší bodové ohodnocení (3,8), a to při teplotě vody 60 i 80 °C, tudíž vyšel z japonských čajů jako nejsladší. Naopak nejméně intenzivní sladká chuť byla zaznamenána u čaje japonského 1 (4,4) při teplotě vody 100 °C. Celkově vyšel jako nejméně sladký čaj japonský 3. Při hodnocení hořké chuti dosáhl čaj japonský 1 nejintenzivnější hořkosti (2,8) při zalití 100°C vodou. Nejméně intenzivní hořká chuť byla zaznamenána u čaje japonského 2 (3,9) při 60 °C. Při hodnocení intenzity trpkosti byl jako nejvíce trpký označen čaj japonský 1 (2,9) a nejméně trpký čaj japonský 2 (3,6).

5.4.2 Senzorické hodnocení sypaných čajů

Při hodnocení samotné suroviny sypaných zelených čajů je patrné z obrázku č. 33, že nejlépe hodnoceným čajem byl čaj japonský 1 a nejhůře hodnoceným čajem čaj čínský 1. Při hodnocení barvy získal čaj japonský 1 průměrné hodnocení 2,1 a čaj čínský 1 průměrné hodnocení 3,1. Při hodnocení vůně suroviny měl také čaj japonský 1 nejlepší hodnocení 2,1 a čaj čínský 1, 3 a japonský 2 shodné průměrné nejhorší hodnocení 2,8. Při hodnocení celkového dojmu ze suroviny čajů byl čaj čínský 1 stále hodnocen nejvíce negativně (3,2). Nejlepší celkový dojem získat čaj čínský 2 (2,3) a čaj japonský 1 (2,4).



Obrázek 33. Senzorické hodnocení barvy, vůně a celkového dojmu ze suroviny zelených čajů čínských a japonských. Stupnice bodového hodnocení byla 1 – vynikající až 5 – nedostačující. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnocení 10-ti hodnotitelů.

Při senzorické analýze vybraných deskriptorů u čajových výluhů bylo hodnocení subjektivní, ale výsledky ukázaly velký vliv teploty při přípravě čajového výluhu na celkovou chuť a dojem. Ve většině případů byly výluhy připravené teplotou vody 100 °C shledány jako více hořké, což je způsobeno vysokým obsahem vyluhovaných fenolických a flavonoidních sloučenin. Výrobce uvádí nejlepší teplotu pro přípravu vybraných zelených čajů 75-80 °C.

Ve studii [83] porovnávali různé teploty vody při přípravě tureckého zeleného čaje a porovnávali obsah katechinů a jejich vliv na senzorický dojem z čaje. Senzorickými deskriptory byla barva, chuť, aroma a celková přijatelnost výluhu čaje. Bylo pozorováno, že naměřené hodnoty koncentrace katechinů vzrůstají při kratším luhování (pod 5 minut). Při delším luhování a při vyšší teplotě vody byly výluhy tmavé a hořké, nebyly proto hodnoceny pozitivně při senzorické analýze.

6 ZÁVĚR

Cílem této studie bylo stanovení bioaktivních látek s antioxidační aktivitou u sypaných zelených čajů, za použití moderních bioanalytických metod. Bylo provedeno porovnání obsahu přírodních antioxidantů při třech postupech přípravy čaje, a to při zalití vodou o teplotě 60, 80 a 100 °C. Dále byla provedena orientační sensorická analýza sledovaných čajů. Stanovení vybraných přírodních antioxidantů z vodných extraktů čajů probíhalo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Výsledky této analýzy ukázaly, že se zvyšující se teplotou vody se zvyšoval i obsah vybraných sloučenin u čajových výluhů. Z fenolických kyselin byl zaznamenán nejvyšší obsah u kyseliny gallové a z flavonoidních sloučenin u epigallokatechinu. Výsledky analýz antioxidační aktivity v této studii ukázaly nižší hodnoty, než uvádí odborná literatura (při srovnatelné době luhování za teploty 60 °C). Se zvyšující se teplotou vody se snižovala antioxidační aktivita výluhů. Při sensorické analýze vybraných deskriptorů u čajů bylo hodnocení sice subjektivní, ale výsledky ukázaly velký vliv teploty při přípravě čajového výluhu na celkovou chuť a dojem z čaje. Výrobci doporučují zalévat zelené čaje vodou o teplotě 75-80 °C. Čaje připravené teplotou vody 100 °C opravdu nebyly hodnoceny nejlépe. Doporučuje se pít zelený čaj připravený za nižší teploty vody. Takový výluh má současně i vyšší antioxidační aktivitu. Je všeobecně známo, že se právě zelený čaj připravuje při nižší teplotě vody oproti čaji černému.

Stanovované látky v současné studii byly vybrány z důvodu prokázaného pozitivního vlivu na lidský organismus. Zdraví prospěšný účinek zeleného čaje lze zaznamenat při širokém spektru onemocnění včetně několika typů rakoviny, kardiovaskulárních a plicních onemocnění. Léčebné účinky konzumace zeleného čaje a jeho složek při léčbě rakoviny a kardiovaskulárních chorob jsou v současnosti intenzivně studovány [89-91]. Další zaznamenaný přínos požívání zeleného čaje pro lidský organismus mohou mít jeho protizánětlivé [92], antiarthritické [93], antibakteriální [94], antiangiogenní [95], antioxidační [96], antivirové [97], neuroprotektivní účinky [98] a účinky snižující hladinu cholesterolu v krvi [99]. Ze základních složek zeleného čaje má výraznou terapeutickou úlohu v zachování lidském zdraví flavonoidní sloučenina epigallokatechin gallát [1]. V naší studii se ukázaly být koncentrace této sloučeniny relativně vysoké u všech výluhů vybraných zelených čajů, bez ohledu na teplotu přípravy.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CHOWDHURY, A. et al. Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: A perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, sv. 78, s. 50-59. ISSN 0753-3322.
- [2] BEARD, J. J. et al. Travelling with tea: a Tuckerella's tale. *Experimental and Applied Acarology*, 2013, sv. 59, č. 1-2, s. 177-202. ISSN 0168-8162.
- [3] HIGDON, J. V. a FREI, B. Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2003, sv. 43, č. 1, s. 89-143. ISSN 1040-8398.
- [4] SAMANIEGO-SANCHEZ, C. et al. The influence of domestic culinary processes on the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of green tea infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, sv. 24, č. 1, s. 79-86. ISSN 0889-1575.
- [5] HAYAT, K. et al. Tea and Its Consumption: Benefits and Risks. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, sv. 55, č. 7, s. 939-954. ISSN 1040-8398.
- [6] LIN, C. C. et al. ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF LOWER-POLYMERIZED POLYPHENOLS IN OOLONG TEA. *International Journal of Food Properties*, 2014, sv. 17, č. 4, s. 752-764. ISSN 1094-2912.
- [7] KARAK, T. a BHAGAT, R. M. Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. *Food Research International*, 2010, sv. 43, č. 9, s. 2234-2252. ISSN 0963-9969.
- [8] MACRAE, R. et al. *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology, and Nutrition: Spectroscopy-Z*. Academic Press, 1993. s.
- [9] VAN DER WAL, S. et al. *Sustainability Issues in the Tea Sector: A Comparative Analysis of Six Leading Producing Countries*. SOMO, 2008. s. ISBN 9789071284236.
- [10] PETTIGREWOVÁ, J. *Čaj: Rádce pro znalce*. Slovart, 2001. s. ISBN 9788072092123.
- [11] ANISSI, J. et al. A comparative study of the antioxidant scavenging activity of green tea, black tea and coffee extracts: A kinetic approach. *Food Chemistry*, 2014, sv. 150, s. 438-447. ISSN 0308-8146.
- [12] DONALDSON, E. *The story of tea*. Black Cat, 2006. s. ISBN 9788853004673.
- [13] KARORI, S. M. et al. Antioxidant capacity of different types of tea products. *African Journal of Biotechnology*, 2007, sv. 6, č. 19, s. 2287-2296. ISSN 1684-5315.
- [14] VALTER, K. *Vše o čaji pro čajomily*. Granit, 2010. s. ISBN 9788072960729.
- [15] WU, C. D. a WEI, G. X. Tea as a functional food for oral health. *Nutrition*, 2002, sv. 18, č. 5, s. 443-444. ISSN 0899-9007.
- [16] SANG, S. M. et al. The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacological Research*, 2011, sv. 64, č. 2, s. 87-99. ISSN 1043-6618.
- [17] Food and Agriculture Organization of the United Nations. [online]. [cit. Dostupné z: <<http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/tea/tea-meetings/en/>>].

- [18] FANARO, G. B. et al. Evaluation of gamma-radiation on green tea odor volatiles. *Radiation Physics and Chemistry*, 2011, sv. 80, č. 1, s. 85-88. ISSN 0969-806X.
- [19] MITSCHER, L. A. et al. *The Green Tea Book: China's Fountain of Youth*. Avery Publishing Group, 1998. s. ISBN 9780895298072.
- [20] Český statistický úřad. [online]. [cit. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba_potravin_klesa_20131205>.
- [21] The statistics portal. [online]. [cit. Dostupné z: <<http://www.statista.com/statistics/264188/production-of-tea-by-main-producing-countries-since-2006/>>.
- [22] BELITZ, H. D. et al. *Food Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, 2009. s. ISBN 9783540699330.
- [23] NAROTZKI, B. et al. Green tea: A promising natural product in oral health. *Archives of Oral Biology*, 2012, sv. 57, č. 5, s. 429-435. ISSN 0003-9969.
- [24] BRUNETTO, M. D. R. et al. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, 2007, sv. 100, č. 2, s. 459-467. ISSN 0308-8146.
- [25] KIRK-OTHEMER. *Food and Feed Technology, 2 Volume Set*. Wiley, 2007. s. ISBN 9780470174487.
- [26] PACKER, L. *Handbook of Antioxidants*. CRC Press, 2001. s. ISBN 9780203904046.
- [27] HUGEL, H. M. a JACKSON, N. Redox Chemistry of Green Tea Polyphenols: Therapeutic Benefits in Neurodegenerative Diseases. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2012, sv. 12, č. 5, s. 380-387. ISSN 1389-5575.
- [28] PINTO, M. D. Tea: A new perspective on health benefits. *Food Research International*, 2013, sv. 53, č. 2, s. 558-567. ISSN 0963-9969.
- [29] KOLOUCHOVÁ, I. et al. Obsah resveratrolu v zelenine avocí. *Chemické Listy*, 2005, sv. 99, č. 7, s. 492-495. ISSN 0009-2770.
- [30] KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 2002, sv. 113, č. Supplement 9B, s. 71S-88S. ISSN 0002-9343.
- [31] JAVANMARDI, J. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 2003, sv. 83, č. 4, s. 547-550. ISSN 0308-8146.
- [32] LI, H. Y. et al. Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry*, 2012, sv. 130, č. 4, s. 928-936. ISSN 0308-8146.
- [33] KING, A. a YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 1999, sv. 99, č. 2, s. 213-218. ISSN 0002-8223.

- [34] GRANATO, D. et al. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chemistry*, 2011, sv. 129, č. 2, s. 366-373. ISSN 0308-8146.
- [35] SURVESWARAN, S. et al. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 2007, sv. 102, č. 3, s. 938-953. ISSN 0308-8146.
- [36] KLEJDUS, B. et al. Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *Journal of Chromatography A*, 2009, sv. 1216, č. 5, s. 763-771. ISSN 0021-9673.
- [37] YAO, L. H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2004, sv. 59, č. 3, s. 113-122. ISSN 0921-9668.
- [38] GARRIDO, J. a BORGES, F. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective (vol 44, pg 3134, 2011). *Food Research International*, 2013, sv. 54, č. 2, s. 1843-1858. ISSN 0963-9969.
- [39] VELÍŠEK, J. a HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin*. OSSIS, 2009. s. ISBN 9788086659176.
- [40] DE PASCUAL-TERESA, S. a SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews*, 2008, sv. 7, č. 2, s. 281-299. ISSN 1568-7767.
- [41] ZAVERI, N. T. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sciences*, 2006, sv. 78, č. 18, s. 2073-2080. ISSN 0024-3205.
- [42] DONG, J. J. et al. Isolation of antioxidant catechins from green tea and its decaffeination. *Food and Bioproducts Processing*, 2011, sv. 89, č. C1, s. 62-66. ISSN 0960-3085.
- [43] CHOW, H. H. S. a HAKIM, I. A. Pharmacokinetic and chemoprevention studies on tea in humans. *Pharmacological Research*, 2011, sv. 64, č. 2, s. 105-112. ISSN 1043-6618.
- [44] KRIS-ETHERTON, P. M. a KEEN, C. L. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Current Opinion in Lipidology*, 2002, sv. 13, č. 1, s. 41-49. ISSN 0957-9672.
- [45] JOHNSON, R. et al. Green tea and green tea catechin extracts: An overview of the clinical evidence. *Maturitas*, 2012, sv. 73, č. 4, s. 280-287. ISSN 0378-5122.
- [46] HU, H. a ZERBST, M. *Zelený čaj - přírodní lék ; jak využít veškeré léčivé síly: vše o druzích, receptech a přípravě*. Železný, 2001. s. ISBN 9788024019536.
- [47] TSAI, C. F. et al. The in vivo antioxidant and antifibrotic properties of green tea (*Camellia sinensis*, Theaceae). *Food Chemistry*, 2013, sv. 136, č. 3-4, s. 1337-1344. ISSN 0308-8146.
- [48] SUMPIO, B. E. et al. Green tea, the "Asian paradox," and cardiovascular disease. *Journal of the American College of Surgeons*, 2006, sv. 202, č. 5, s. 813-825. ISSN 1072-7515.

- [49] CHENG, T. O. All teas are not created equal - The Chinese green tea and cardiovascular health. *International Journal of Cardiology*, 2006, sv. 108, č. 3, s. 301-308. ISSN 0167-5273.
- [50] HALLIWELL, B. a GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 2007. s. ISBN 9780198568681.
- [51] HOLEČEK, V. et al. Volné radikály a antioxidanty. *Čes. Stomat.*, roč, 2008, sv. 108, s. 20-23.
- [52] RACEK, J. *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. Galén, 2003. s. ISBN 9788072622313.
- [53] PAULOVÁ, H. et al. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK IN VITRO. *Chem. listy*, 2004, sv. 98, s. 174-179.
- [54] GULCIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 2012, sv. 86, č. 3, s. 345-391. ISSN 0340-5761.
- [55] ŠTÍPEK, S. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Praha: Grada, 2000. s. ISBN 8071697044 9788071697046.
- [56] PRATT, S. G. a MATTHEWS, K. *Superpotraviny: 14 potravin, které změni váš život*. Ikar, 2005. s. ISBN 9788024904733.
- [57] CHEN, H. Y. et al. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chemistry*, 2007, sv. 104, č. 4, s. 1418-1424. ISSN 0308-8146.
- [58] PASSWATER, R. A. *The Antioxidants*. McGraw-Hill Companies, Incorporated, 1998. s. ISBN 9780879837877.
- [59] KALÁČ, P. *Funkční potraviny: kroky ke zdraví*. Dona, 2003. s. ISBN 9788073220297.
- [60] HEIM, K. E. et al. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002, sv. 13, č. 10, s. 572-584. ISSN 0955-2863.
- [61] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, 2003. s. ISBN 9788086369075.
- [62] ŠTULÍK, K. *Analytické separační metody*. Karolinum, 2004. s. ISBN 9788024608525.
- [63] SOMMER, L. a BRNĚ, V. U. T. V. *Základy analytické chemie: díl II. 2000. 347 s.* Vutium, 1998. s. ISBN 9788021417427.
- [64] WEISS, D. J. a ANDERTON, C. R. Determination of catechins in matcha green tea by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2003, sv. 1011, č. 1-2, s. 173-180. ISSN 0021-9673.
- [65] WEISS, D. J. et al. Analysis of green tea extract dietary supplements by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2006, sv. 1117, č. 1, s. 103-108. ISSN 0021-9673.
- [66] WRIGHT, L. P. et al. Analysis of black tea theaflavins by non-aqueous capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 2001, sv. 919, č. 1, s. 205-213. ISSN 0021-9673.

- [67] HORIE, H. et al. Simultaneous determination of qualitatively important components in green tea infusions using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1997, sv. 758, č. 2, s. 332-335. ISSN 0021-9673.
- [68] DALLUGE, J. J. a NELSON, B. C. Determination of tea catechins. *Journal of Chromatography A*, 2000, sv. 881, č. 1-2, s. 411-424. ISSN 0021-9673.
- [69] MACIEL, J. V. et al. Simple and Fast Method for Iron Determination in White and Red Wines Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, sv. 62, č. 33, s. 8340-8345. ISSN 0021-8561.
- [70] HUANG, D. J. et al. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, sv. 53, č. 6, s. 1841-1856. ISSN 0021-8561.
- [71] ZLOCH, Z. et al. Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu. *Závěrečná zpráva o plnění výzkumného projektu podpořeného finančně Nadačním fondem Institutu*, 2004.
- [72] ŠULC, M. et al. Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické Listy*, 2007, sv. 101, č. 7, s. 584-591. ISSN 0009-2770.
- [73] ZITKA, O. et al. Electrochemical detection of low molecular mass thiols. *Amino Acids*, 2009, sv. 37, č. 1, s. 87-87. ISSN 0939-4451.
- [74] PISZCZ, P. et al. Comparative Analysis of Antioxidative Activity of Flavonoids Using HPLC-ED and Photometric Assays. *Food Analytical Methods*, 2014, sv. 7, č. 7, s. 1474-1480. ISSN 1936-9751.
- [75] POKORNÝ, J. et al. *Senzorická analýza potravin: Laboratorní cvičení*. Vydavatelství VŠCHT v Praze, 1999. s. ISBN 8070802782.
- [76] INGR, I. et al. *Senzorická analýza potravin*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. s. ISBN 9788073750329.
- [77] THOMA, M. et al. *Příběh čaje*. Praha: Argo, 2002. s. ISBN 8072034472 9788072034475.
- [78] HÁLKOVÁ, J. et al. *Analýza potravin. 2. vyd.. Újezd u Brna: RNDr. Ivan Straka, 2001. Vitamíny*. ISBN 80-86494-02-0,
- [79] PAREJO, L. et al. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH center dot (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2000, sv. 44, č. 3, s. 507-512. ISSN 1056-8719.
- [80] GERYLOVOVÁ, A. a HOLČÍK, J. *Úvod do statistiky. Text pro semináře*. Masarykova univerzita, 2000. s. ISBN 8021023015.
- [81] BARDPHO, C. et al. Ultra-high performance liquid chromatographic determination of antioxidants in teas using inkjet-printed graphene-polyaniline electrode. *Talanta*, 2016, sv. 148, s. 673-679. ISSN 0039-9140.

- [82] HE, X. Y. et al. Chemical fingerprint analysis for quality control and identification of Ziyang green tea by HPLC. *Food Chemistry*, 2015, sv. 171, s. 405-411. ISSN 0308-8146.
- [83] SAKLAR, S. et al. Effects of different brewing conditions on catechin content and sensory acceptance in Turkish green tea infusions. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 2015, sv. 52, č. 10, s. 6639-6646. ISSN 0022-1155.
- [84] MRZENOVA, Š. *Stanovení fenolových látek a antioxidační aktivity v pravých a bylinných komerčních čajích*. Agronomická fakulta. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2011.
- [85] JESZKA-SKOWRON, M. a ZGOLA-GRZESKOWIAK, A. Analysis of Antioxidant Activity, Chlorogenic Acid, and Rutin Content of Camellia sinensis Infusions Using Response Surface Methodology Optimization. *Food Analytical Methods*, 2014, sv. 7, č. 10, s. 2033-2041. ISSN 1936-9751.
- [86] LANGLEY-EVANS, S. C. Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2000, sv. 51, č. 3, s. 181-188. ISSN 0963-7486.
- [87] HUANG, H. Y. a LIEN, W. C. Analyses of phenolic compounds by microemulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 2005, sv. 26, č. 16, s. 3134-3140. ISSN 0173-0835.
- [88] GOTTI, R. et al. Differentiation of green tea samples by chiral CD-MEKC analysis of catechins content. *Electrophoresis*, 2009, sv. 30, č. 16, s. 2922-2930. ISSN 0173-0835.
- [89] MCKAY, D. L. a BLUMBERG, J. B. The Role of Tea in Human Health: An Update. *Journal of the American College of Nutrition*, 2002, sv. 21, č. 1, s. 1-13. ISSN 0731-5724.
- [90] KAVANAGH, K. T. et al. Green tea extracts decrease carcinogen-induced mammary tumor burden in rats and rate of breast cancer cell proliferation in culture. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2001, sv. 82, č. 3, s. 387-398. ISSN 0730-2312.
- [91] SUEOKA, N. et al. A new function of GreenTea: Prevention of lifestyle-related diseases. In PARK, S.C., et al. *Healthy Aging for Functional Longevity: Molecular and Cellular Interactions in Senescence*. New York: New York Acad Sciences, 2001, sv. 928, s. 274-280.
- [92] DONA, M. et al. Neutrophil, restraint by green tea: Inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. *Journal of Immunology*, 2003, sv. 170, č. 8, s. 4335-4341. ISSN 0022-1767.
- [93] HAQQI, T. M. et al. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, sv. 96, č. 8, s. 4524-4529. ISSN 0027-8424.
- [94] SUDANO ROCCARO, A. et al. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2004, sv. 48, č. 6, s. 1968-1973. ISSN 0066-4804.

- [95] SARTIPPOUR, M. R. et al. Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. *Journal of Nutrition*, 2002, sv. 132, č. 8, s. 2307-2311. ISSN 0022-3166.
- [96] OSADA, K. et al. Tea catechins inhibit cholesterol oxidation accompanying oxidation of low density lipoprotein in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 2001, sv. 128, č. 2, s. 153-164. ISSN 1532-0456.
- [97] WEBER, J. M. et al. Inhibition of adenovirus infection and adenain by green tea catechins. *Antiviral Research*, 2003, sv. 58, č. 2, s. 167-173. ISSN 0166-3542.
- [98] WEINREB, O. et al. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2004, sv. 15, č. 9, s. 506-516. ISSN 0955-2863.
- [99] RAEDERSTORFF, D. G. et al. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2003, sv. 14, č. 6, s. 326-332. ISSN 0955-2863.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Schéma procesu výroby základních typů čaje [13]	15
Obrázek 2. Produkce čaje v hlavních producentních zemích světa [21]	17
Obrázek 3. Struktura vybraných fenolických sloučenin [36].....	20
Obrázek 4. Struktura hlavních katechinů v zeleném čaji [41]	21
Obrázek 5. Změna množství obsahových látek v důsledku fermentace [28].....	22
Obrázek 6. Čínský zelený čaj Chun Mee (Zdroj: Blažková)	41
Obrázek 7. Čínský zelený čaj Gunpowder (Zdroj: Blažková)	42
Obrázek 8. Čínský zelený čaj En Shi Yu Lu (Zdroj: Blažková)	42
Obrázek 9. Japonský zelený čaj Sencha Kagoshima Yabukita (Zdroj: Blažková)	43
Obrázek 10. Japonský zelený čaj Kukicha (Zdroj: Blažková)	43
Obrázek 11. Japonský zelený čaj Tamaryokucha Mushisei (Zdroj: Blažková).....	44
Obrázek 12. Koncentrace kyseliny kávové u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření ± SD.....	52
Obrázek 13. Koncentrace kyseliny chlorogenové u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření ± SD.	53
Obrázek 14. Koncentrace kyseliny gallové u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření ± SD.....	53
Obrázek 15. Koncentrace kyseliny p-kumarové u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření ± SD.	54
Obrázek 16. Koncentrace kyseliny vanilové u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření ± SD.	55

Obrázek 17. Koncentrace katechinu u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.....	57
Obrázek 18. Koncentrace epikatechinu u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.....	57
Obrázek 19. Koncentrace epikatechin gallátu u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.	58
Obrázek 20. Koncentrace epigallokatechinu u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.	59
Obrázek 21. Koncentrace epigallokatechin gallátu u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μg analyzované sloučeniny/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.	59
Obrázek 22. Koncentrace celkových bílkovin u výluhů zelených čajů čínských a japonských (mg proteinu/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.....	62
Obrázek 23. Antioxidační aktivita stanovená metodou DPPH u výluhů zelených čajů čínských a japonských (mmol ekvivalentu troloxu/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.....	63
Obrázek 24. Antioxidační aktivita stanovená metodou FRAP u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μmol ekvivalentu troloxu/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.....	64
Obrázek 25. Koncentrace celkových fenolů u výluhů zelených čajů čínských a japonských (μmol ekvivalentu kyseliny gallové/g sušiny čaje) za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ze tří měření \pm SD.....	65
Obrázek 26. Elektroferogram výluhu japonského čaje 3 připraveného za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C.	66

- Obrázek 27.** Elektroferogram porovnání výluhů čaje čínského 3 a japonského 3 připravených za použití teploty vody 60 °C. Nejmarkantnější rozdíly (jak kvalitativní tak kvantitativní) jsou označeny šipkou. 67
- Obrázek 28.** Sensorické hodnocení barvy výluhů zelených čajů čínských a japonských. Vzorky byly připraveny za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Stupnice bodového hodnocení byla 1 – vynikající až 5 – nedostačující. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnocení 10-ti hodnotitelů..... 68
- Obrázek 29.** Sensorické hodnocení vůně výluhů zelených čajů čínských a japonských. Vzorky byly připraveny za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Stupnice bodového hodnocení byla 1 – vynikající až 5 – nedostačující. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnocení 10-ti hodnotitelů..... 69
- Obrázek 30.** Sensorické hodnocení chuti výluhů zelených čajů čínských a japonských. Vzorky byly připraveny za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Stupnice bodového hodnocení byla 1 – vynikající až 5 – nedostačující. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnocení 10-ti hodnotitelů..... 70
- Obrázek 31.** Sensorické hodnocení intenzity sladkosti, hořkosti a trpkosti výluhů zelených čajů čínských. Vzorky byly připraveny za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Stupnice bodového hodnocení byla 1 – silně výrazná až 5 – nepatrná. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnocení 10-ti hodnotitelů. 70
- Obrázek 32.** Sensorické hodnocení intenzity sladkosti, hořkosti a trpkosti výluhů zelených čajů japonských. Vzorky byly připraveny za použití teplot vody 60, 80 a 100 °C. Stupnice bodového hodnocení byla 1 – silně výrazná až 5 – nepatrná. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnocení 10-ti hodnotitelů. 71
- Obrázek 33.** Sensorické hodnocení barvy, vůně a celkového dojmu ze suroviny zelených čajů čínských a japonských. Stupnice bodového hodnocení byla 1 – vynikající až 5 – nedostačující. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr hodnocení 10-ti hodnotitelů..... 72

9 SEZNAM ZKRATEK

ABAP – 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina

C – katechin

CE – capillary electrophoresis

CZE – capillary zone electrophoresis

DMPD – dimethyl fenylen diamin

DMPO – 5,5-dimethyl-1-pyrrolin N-oxid

DMSO – dimethyl sulfoxid

DPPH – 2,2-diphenyl-1-pikrylhydrazyl-hydrát

EC – epikatechin

ECD – electron capture detector

ECG – epikatechin gallát

EGC – epigallokatechin

EGCG – epigallokatechin gallát

FRAP – ferric reducing ability power

GAE – gallic acid equivalent

HDL – high density lipoprotein

HPLC – high performance liquid chromatography

LDL – low density lipoprotein

MEEKC – microemulsion electrokinetic chromatography

MEKC – micellar electrokinetic chromatography

MilliQ – demineralizovaná voda

MS - mass spectrometry

NACE – nonaqueous capillary electrophoresis

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

ORAC – oxygen radical absorbance capacity

PMS – 5-methylfenazinium-methyl-sulfát

RNS – reactive nitrogen species

ROS – reactive oxygen species

RP – reversed phase

SD – směrodatná odchylka

TAA – total antioxidant activity

TBARS – thiobarbituric acid reactive substances

TE – trolox equivalent

TEAC – trolox equivalent antioxidant capacity

TPTZ – 2,4,6-tripyridyl-S-triazin

Trolox – 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina

UHPLC – ultra high performance liquid chromatography

UV-VIS – ultraviolet-visible

10 PŘÍLOHY

Příloha 1: Statistické vyhodnocení naměřených dat získaných pomocí HPLC

- Koncentrace vybraných fenolických kyselin u výluhů zeleného čaje čínského a japonského.
- Koncentrace vybraných flavonoidních sloučenin u výluhů zeleného čaje čínského a japonského.

Příloha 2: Statistické vyhodnocení naměřených dat získaných pomocí BS 200

- Koncentrace celkových bílkovin a celkových fenolů, stanovení antioxidační aktivity pomocí metody DPPH a FRAP.

Příloha 3: Statistické vyhodnocení dat získaných senzoricou analýzou

- Senzorické hodnocení barvy, vůně a chuti výluhů zelených čajů čínských a japonských.
- Senzorické hodnocení intenzity vybraných chutí výluhů zelených čajů čínských a japonských.
- Senzorické hodnocení barvy, vůně a celkového dojmu ze suroviny zelených čajů čínských a japonských.

Příloha 4: Orientační senzorický dotazník

Statistické vyhodnocení naměřených dat získaných pomocí HPLC

Tabulka 1: Koncentrace vybraných fenolických kyselin u výluhů zeleného čaje čínského a japonského.

	teplota vody	kyselina kávová			kyselina chlorogenová			kyselina gallová			kyselina p-kumarová			kyselina vanilová		
		c (µg/g)	S _x	RSD (%)	c (µg/g)	S _x	RSD (%)	c (µg/g)	S _x	RSD (%)	c (µg/g)	S _x	RSD (%)	c (µg/g)	S _x	RSD (%)
Čaj čínský 1	100°C	2.07	0.08	3.73	34.94	1.25	3.59	281.73	9.11	3.23	7.26	0.35	4.82	0.21	0.01	6.49
	80°C	2.67	0.14	5.31	14.19	0.47	3.28	207.83	6.29	3.03	4.86	0.32	6.66	0.55	0.03	5.64
	60°C	1.15	0.05	4.44	4.18	0.23	5.48	116.12	6.05	5.21	2.74	0.08	3.07	0.27	0.01	3.23
Čaj čínský 2	100°C	2.48	0.13	5.20	21.67	0.66	3.06	284.27	15.05	5.30	9.51	0.35	3.66	0.82	0.03	3.23
	80°C	2.72	0.13	4.59	13.24	0.65	4.94	276.04	14.74	5.34	7.00	0.21	3.04	0.33	0.02	5.36
	60°C	0.91	0.05	5.74	3.77	0.18	4.86	166.59	8.99	5.40	3.59	0.16	4.37	0.21	0.01	3.37
Čaj čínský 3	100°C	0.59	0.03	5.10	18.72	0.66	3.51	245.15	9.60	3.92	6.26	0.34	5.49	0.43	0.02	5.37
	80°C	4.51	0.16	3.66	27.58	1.25	4.52	258.40	14.53	5.62	6.57	0.24	3.69	0.32	0.02	5.98
	60°C	2.15	0.08	3.56	13.50	0.47	3.45	211.37	8.28	3.92	4.55	0.22	4.87	0.29	0.02	5.67
Čaj japonský 1	100°C	1.15	0.04	3.47	29.14	0.89	3.05	143.02	7.77	5.43	6.95	0.36	5.20	0.32	0.02	5.08
	80°C	0.76	0.05	6.37	22.26	0.89	4.00	119.64	5.34	4.47	6.26	0.39	6.28	0.13	0.01	5.76
	60°C	0.43	0.01	3.32	11.10	0.71	6.36	91.55	5.36	5.86	3.72	0.19	4.99	0.24	0.01	3.05
Čaj japonský 2	100°C	1.09	0.04	3.72	21.76	0.84	3.86	204.91	7.29	3.56	7.25	0.37	5.16	0.81	0.04	5.33
	80°C	1.44	0.05	3.26	29.04	1.41	4.84	230.27	7.29	3.17	8.71	0.48	5.47	0.30	0.02	6.02
	60°C	0.86	0.04	4.53	15.49	0.93	6.01	193.10	6.34	3.29	5.42	0.30	5.48	0.74	0.03	4.67
Čaj japonský 3	100°C	1.29	0.04	3.08	32.74	0.98	3.00	263.58	10.14	3.85	5.90	0.31	5.31	0.67	0.04	5.89
	80°C	1.17	0.04	3.36	29.14	1.28	4.39	258.53	9.88	3.82	6.20	0.23	3.63	0.45	0.01	3.24
	60°C	1.39	0.06	4.22	27.33	1.79	6.56	254.41	10.53	4.14	4.90	0.25	5.10	0.35	0.02	5.60

c (µg/g) ... koncentrace (je uvedena hodnota průměru tří měření)

S_x ... směrodatná odchylka

RSD (%) ... chyba měření

Tabulka 2: Koncentrace vybraných flavonoidních sloučenin u výluhů zeleného čaje čínského a japonského.

	teplota vody	katechin			epikatechin			epikatechin gallát			epigallokatechin			epigallokatechin gallát		
		c (µg/g)	Sx	RSD (%)	c (µg/g)	Sx	RSD (%)	c (µg/g)	Sx	RSD (%)	c (µg/g)	Sx	RSD (%)	c (µg/g)	Sx	RSD (%)
Čaj čínský 1	100°C	59.39	2.06	3.47	965.45	28.96	3.00	559.56	16.98	3.04	32114.66	1057.06	3.29	12333.28	786.70	6.38
	80°C	64.21	2.01	3.13	896.91	39.41	4.39	538.17	17.18	3.19	32673.96	1000.43	3.06	10951.77	438.44	4.00
	60°C	41.79	2.09	5.00	463.55	23.13	4.99	206.58	6.30	3.05	21057.82	1037.33	4.93	2804.26	143.09	5.10
Čaj čínský 2	100°C	79.67	2.76	3.46	1212.21	36.93	3.05	580.10	17.50	3.02	41184.01	1269.73	3.08	11093.64	518.91	4.68
	80°C	47.15	2.01	4.25	639.72	19.29	3.01	384.29	11.92	3.10	27148.39	1111.16	4.09	7492.56	318.44	4.25
	60°C	47.20	1.51	3.19	533.63	17.87	3.35	180.54	8.93	4.95	23163.39	728.00	3.14	1938.90	75.35	3.89
Čaj čínský 3	100°C	141.97	4.27	3.01	1363.74	47.48	3.48	1259.71	38.10	3.02	43601.92	1321.42	3.03	18654.65	607.89	3.26
	80°C	120.58	4.00	3.32	1060.99	48.54	4.58	602.76	18.35	3.04	34617.68	1046.26	3.02	11528.96	499.57	4.33
	60°C	102.52	3.16	3.08	879.62	26.96	3.06	436.84	14.25	3.26	29200.71	971.11	3.33	8477.07	476.11	5.62
Čaj japonský 1	100°C	154.31	4.75	3.08	1650.33	51.86	3.14	585.19	18.02	3.08	58075.44	1782.39	3.07	12100.36	412.78	3.41
	80°C	126.86	3.81	3.00	1281.15	42.58	3.32	327.48	12.72	3.88	50693.69	1554.69	3.07	7231.88	227.26	3.14
	60°C	89.99	3.54	3.93	1139.48	62.30	5.47	194.36	8.02	4.13	46486.40	1397.23	3.01	3132.71	110.46	3.53
Čaj japonský 2	100°C	187.67	6.41	3.41	1852.12	100.64	5.43	603.18	21.01	3.48	48496.53	1488.90	3.07	11945.41	449.97	3.77
	80°C	165.77	5.03	3.04	1736.63	98.49	5.67	493.53	14.85	3.01	46706.41	1407.47	3.01	10182.69	331.18	3.25
	60°C	127.59	4.34	3.40	1180.10	69.37	5.88	187.51	10.98	5.86	35316.95	1114.94	3.16	2168.36	100.56	4.64
Čaj japonský 3	100°C	180.59	7.29	4.04	1763.34	102.98	5.84	1011.72	30.56	3.02	51359.30	1778.87	3.46	17810.84	596.65	3.35
	80°C	115.42	4.72	4.09	1104.33	70.78	6.41	293.40	17.80	6.07	33403.20	1004.58	3.01	5882.31	178.39	3.03
	60°C	123.47	4.71	3.82	1234.29	77.28	6.26	309.83	16.54	5.34	37174.66	1498.31	4.03	6114.60	202.30	3.31

c (µg/g) ... koncentrace (je uvedena hodnota průměru tří měření)

Sx ... směrodatná odchylka

RSD (%) ... chyba měření

Statistické vyhodnocení naměřených dat získaných pomocí BS 200

Tabulka 3: Koncentrace celkových bílkovin a celkových fenolů, stanovení antioxidační aktivity pomocí metody DPPH a FRAP.

	teplota vody	celkové bílkoviny			metoda DPPH			metoda FRAP			celkové fenoly		
		c (mg/g)	Sx	RSD (%)	c (mmol TE/g)	Sx	RSD (%)	c (μmol TE/g)	Sx	RSD (%)	c (μmol GAE/g)	Sx	RSD (%)
Čaj čínský 1	100°C	156.44	2.45	1.57	7.31	0.21	2.81	289.60	1.92	0.66	222.38	3.25	1.46
	80°C	213.82	3.30	1.55	7.07	0.05	0.77	283.59	3.40	1.20	136.49	3.95	2.89
	60°C	321.94	9.78	3.04	7.67	0.06	0.72	359.01	6.84	1.90	179.29	2.56	1.43
Čaj čínský 2	100°C	124.42	2.64	2.12	3.63	0.05	1.35	191.31	3.36	1.76	88.25	2.25	2.55
	80°C	134.36	1.84	1.37	4.95	0.03	0.64	202.66	3.64	1.79	89.04	1.49	1.68
	60°C	238.14	2.68	1.12	4.88	0.05	1.03	312.01	4.85	1.56	155.98	3.94	2.53
Čaj čínský 3	100°C	288.12	3.69	1.28	4.97	0.02	0.50	313.50	6.33	2.02	157.91	2.51	1.59
	80°C	332.07	7.92	2.38	5.26	0.12	2.28	339.13	4.13	1.22	178.99	2.00	1.12
	60°C	408.93	5.58	1.36	5.97	0.09	1.52	408.59	4.72	1.16	225.10	4.30	1.91
Čaj japonský 1	100°C	241.30	4.81	1.99	5.19	0.02	0.48	378.62	4.90	1.29	178.89	2.98	1.67
	80°C	310.40	7.23	2.33	5.99	0.09	1.47	462.77	8.30	1.79	225.52	5.17	2.29
	60°C	392.70	3.23	0.82	6.25	0.05	0.79	482.12	6.65	1.38	254.93	5.83	2.29
Čaj japonský 2	100°C	242.07	3.66	1.51	5.11	0.07	1.32	388.33	8.00	2.06	180.49	1.98	1.10
	80°C	238.20	2.77	1.16	5.26	0.04	0.83	384.73	8.82	2.29	184.03	2.69	1.46
	60°C	324.41	7.18	2.21	5.86	0.07	1.22	444.53	7.14	1.61	226.50	2.02	0.89
Čaj japonský 3	100°C	194.77	3.32	1.71	4.45	0.04	0.97	305.92	5.10	1.67	142.83	2.56	1.79
	80°C	197.20	5.23	2.65	4.87	0.16	3.21	313.46	9.14	2.92	146.30	2.95	2.01
	60°C	343.32	8.00	2.33	5.69	0.05	0.83	398.88	2.73	0.68	206.64	1.71	0.83

c (mg/g), (mmol TE/g), (μmol TE/g), (μmol GAE/g) ... koncentrace (je uvedena hodnota průměrů tří měření)

Sx ... směrodatná odchylka

RSD (%) ... chyba měření

Statistické vyhodnocení dat získaných senzorkou analýzou

Tabulka 4: Senzorické hodnocení barvy, vůně a chuti výluhů zelených čajů čínských a japonských.

	teplota vody	barva výluhu						vůně výluhu						chuť výluhu					
		průměr	Sx	Vx	MIN	MAX	medián	průměr	Sx	Vx	MIN	MAX	medián	průměr	Sx	Vx	MIN	MAX	medián
Čaj čínský 1	100°C	2.5	0.7	0.3	1.0	3.0	3.0	3.4	1.0	0.3	2.0	5.0	3.0	3.4	1.1	0.3	2.0	5.0	4.0
	80°C	2.6	1.0	0.4	1.0	4.0	2.5	3.0	0.7	0.2	2.0	4.0	3.0	3.0	1.2	0.4	1.0	5.0	3.0
	60°C	2.8	1.0	0.4	1.0	4.0	3.0	3.5	1.0	0.3	2.0	5.0	3.0	3.6	0.8	0.2	3.0	5.0	3.0
Čaj čínský 2	100°C	2.0	0.8	0.4	1.0	3.0	2.0	2.4	0.8	0.4	1.0	4.0	2.0	3.3	1.1	0.3	2.0	5.0	3.0
	80°C	2.2	1.0	0.5	1.0	4.0	2.0	2.7	1.2	0.4	1.0	5.0	3.0	2.8	0.6	0.2	2.0	4.0	3.0
	60°C	3.1	0.9	0.3	2.0	4.0	3.0	2.8	0.8	0.3	2.0	4.0	3.0	2.6	1.0	0.4	1.0	4.0	2.5
Čaj čínský 3	100°C	2.0	0.7	0.3	1.0	3.0	2.0	2.6	1.1	0.4	1.0	4.0	3.0	4.0	0.8	0.2	2.0	5.0	4.0
	80°C	2.9	0.7	0.3	2.0	4.0	3.0	2.9	1.0	0.3	1.0	4.0	3.0	3.1	0.7	0.2	2.0	4.0	3.0
	60°C	2.5	1.0	0.4	1.0	4.0	3.0	3.3	1.1	0.3	2.0	5.0	3.5	3.4	1.0	0.3	2.0	5.0	3.0
Čaj japonský 1	100°C	1.9	1.0	0.5	1.0	4.0	2.0	3.4	1.3	0.4	1.0	5.0	3.5	3.9	1.1	0.3	2.0	5.0	4.0
	80°C	2.1	1.0	0.5	1.0	4.0	2.0	3.5	0.7	0.2	3.0	5.0	3.0	3.0	0.8	0.3	2.0	4.0	3.0
	60°C	2.0	1.2	0.6	1.0	4.0	1.5	3.0	1.1	0.4	1.0	4.0	3.0	3.2	0.6	0.2	2.0	4.0	3.0
Čaj japonský 2	100°C	2.4	1.2	0.5	1.0	4.0	2.5	2.2	0.9	0.4	1.0	4.0	2.0	3.3	1.1	0.3	1.0	5.0	3.0
	80°C	2.4	1.1	0.4	1.0	4.0	2.0	2.9	1.1	0.4	1.0	5.0	3.0	2.6	1.1	0.4	1.0	4.0	2.0
	60°C	2.8	1.1	0.4	1.0	4.0	2.5	2.7	0.8	0.3	1.0	4.0	3.0	2.5	0.8	0.3	1.0	4.0	2.5
Čaj japonský 3	100°C	2.4	1.0	0.4	1.0	4.0	2.5	3.1	1.1	0.4	1.0	5.0	3.0	3.5	1.3	0.4	1.0	5.0	4.0
	80°C	2.4	1.3	0.6	1.0	5.0	2.0	3.1	1.1	0.4	1.0	5.0	3.0	2.7	1.2	0.4	1.0	5.0	2.5
	60°C	3.0	1.4	0.5	1.0	5.0	3.0	3.6	1.3	0.4	1.0	5.0	3.5	3.1	1.2	0.4	1.0	5.0	3.0

průměr ... uvedena hodnota průměrů bodového hodnocení 10-ti hodnotitelů

Sx ... směrodatná odchylka; Vx ... variační koeficient

MIN ... minimální hodnota souboru; MAX ... maximální hodnota souboru

medián ... střední hodnota souboru

Tabulka 5: Senzorické hodnocení intenzity vybraných chutí výluhů zelených čajů čínských a japonských.

	teplota vody	intenzita sladkosti						intenzita hořkosti						intenzita trpkosti					
		průměr	Sx	Vx	MIN	MAX	medián	průměr	Sx	Vx	MIN	MAX	medián	průměr	Sx	Vx	MIN	MAX	medián
Čaj čínský 1	100°C	4.8	0.4	0.1	4.0	5.0	5.0	2.0	0.8	0.4	1.0	3.0	2.0	2.2	0.6	0.3	1.0	3.0	2.0
	80°C	4.1	0.7	0.2	3.0	5.0	4.0	2.4	1.0	0.4	1.0	4.0	2.5	2.8	1.5	0.5	1.0	5.0	3.0
	60°C	4.3	0.9	0.2	3.0	5.0	5.0	2.7	1.1	0.4	1.0	4.0	2.5	3.0	1.2	0.4	1.0	5.0	3.5
Čaj čínský 2	100°C	4.8	0.4	0.1	4.0	5.0	5.0	2.2	0.6	0.3	1.0	3.0	2.0	2.2	0.9	0.4	1.0	4.0	2.0
	80°C	4.2	1.1	0.3	2.0	5.0	5.0	2.9	1.1	0.4	1.0	5.0	3.0	3.0	1.2	0.4	1.0	5.0	3.0
	60°C	3.8	1.2	0.3	2.0	5.0	4.0	3.3	0.8	0.2	2.0	4.0	3.5	3.7	1.1	0.3	2.0	5.0	3.0
Čaj čínský 3	100°C	4.6	0.5	0.1	4.0	5.0	5.0	2.0	0.8	0.4	1.0	3.0	2.0	1.7	0.8	0.5	1.0	3.0	2.0
	80°C	4.5	0.8	0.2	3.0	5.0	5.0	2.4	0.7	0.3	2.0	4.0	2.0	3.1	1.2	0.4	1.0	4.0	4.0
	60°C	4.4	0.8	0.2	3.0	5.0	5.0	3.0	1.3	0.4	1.0	5.0	3.0	2.9	1.2	0.4	1.0	4.0	3.5
Čaj japonský 1	100°C	4.4	0.8	0.2	3.0	5.0	5.0	2.8	1.2	0.4	1.0	5.0	2.5	2.9	1.1	0.4	1.0	5.0	3.0
	80°C	3.9	0.9	0.2	3.0	5.0	4.0	3.3	0.8	0.2	2.0	5.0	3.0	3.7	1.1	0.3	2.0	5.0	4.0
	60°C	4.0	0.8	0.2	3.0	5.0	4.0	3.5	0.8	0.2	2.0	5.0	3.5	3.8	0.9	0.2	2.0	5.0	4.0
Čaj japonský 2	100°C	4.1	0.9	0.2	3.0	5.0	4.0	3.4	1.0	0.3	2.0	5.0	3.5	3.2	1.0	0.3	1.0	5.0	3.0
	80°C	3.8	1.2	0.3	2.0	5.0	4.0	3.1	1.1	0.4	1.0	5.0	3.0	3.6	1.2	0.3	1.0	5.0	4.0
	60°C	3.8	0.9	0.2	2.0	5.0	4.0	3.9	0.9	0.2	2.0	5.0	4.0	3.9	1.1	0.3	1.0	5.0	4.0
Čaj japonský 3	100°C	4.3	0.8	0.2	3.0	5.0	4.5	3.2	1.4	0.4	1.0	5.0	3.0	3.2	1.2	0.4	1.0	4.0	4.0
	80°C	4.0	1.2	0.3	2.0	5.0	4.5	3.6	1.2	0.3	1.0	5.0	4.0	3.6	1.3	0.4	1.0	5.0	4.0
	60°C	4.3	0.8	0.2	3.0	5.0	4.5	3.8	1.2	0.3	1.0	5.0	4.0	3.8	1.0	0.3	2.0	5.0	4.0

průměr ... uvedena hodnota průměrů bodového hodnocení 10-ti hodnotitelů

Sx ... směrodatná odchylka

Vx ... variační koeficient

MIN ... minimální hodnota souboru; MAX ... maximální hodnota souboru

medián ... střední hodnota souboru

Tabulka 6: Senzorické hodnocení barvy, vůně a celkového dojmu ze suroviny zelených čajů čínských a japonských.

	barva suroviny						vůně suroviny						celkový dojem ze suroviny					
	průměr	Sx	Vx	MIN	MAX	medián	průměr	Sx	Vx	MIN	MAX	medián	průměr	Sx	Vx	MIN	MAX	medián
Čaj čínský 1	3.1	1.0	0.3	1.0	4.0	3.0	2.8	1.2	0.4	1.0	5.0	3.0	3.2	0.8	0.2	2.0	4.0	3.0
Čaj čínský 2	2.2	1.0	0.5	1.0	4.0	2.0	2.7	1.2	0.4	1.0	4.0	2.0	2.3	0.8	0.4	1.0	3.0	2.5
Čaj čínský 3	3.0	0.9	0.3	1.0	4.0	3.0	2.8	0.9	0.3	2.0	4.0	2.5	2.9	0.7	0.3	2.0	4.0	3.0
Čaj japonský 1	2.1	0.9	0.4	1.0	3.0	2.0	2.1	1.2	0.6	1.0	4.0	2.0	2.4	0.7	0.3	1.0	3.0	2.5
Čaj japonský 2	2.8	1.0	0.4	1.0	5.0	3.0	2.8	1.2	0.4	1.0	4.0	3.0	2.9	1.0	0.3	1.0	4.0	3.0
Čaj japonský 3	2.6	1.1	0.4	1.0	4.0	3.0	2.6	1.2	0.5	1.0	5.0	3.0	2.7	1.1	0.4	1.0	4.0	3.0

průměr ... uvedena hodnota průměrů bodového hodnocení 10-ti hodnotitelů

Sx ... směrodatná odchylka

Vx ... variační koeficient

MIN ... minimální hodnota souboru

MAX ... maximální hodnota souboru

medián ... střední hodnota souboru

Orientační senzorický dotazník

věk:

pohlaví:

kuřák:

Hodnot'te předložené vzorky v pořadí, jak je uvedeno níže: barva, vůně a na závěr chuť a intenzita chutí, dále bude hodnocena samotná surovina - sypané zelené čaje. Při hodnocení používejte jako neutralizátor chuti bílé pečivo. Barvu hodnot'te proti bílému podkladu.

Senzorické hodnocení zelených čajů

Ohodnot'te jednotlivé vzorky čaje a přiřaďte každému vzorku hodnocení podle následující bodové stupnice (1 - vynikající až 5 - nedostačující):

1 - vynikající**2 - velmi dobrá****3 - dobrá****4 - dostačující****5 - nedostačující**

A) Barva čajového nálevu (nálev zeleného čaje má být průzračný, barva jasná, čirá, žlutozelená)

Označení vzorku	A	B	C	D	E	F	G	H	CH
Bodové hodnocení									
Označení vzorku	I	J	K	L	M	N	O	P	R
Bodové hodnocení									

B) Vůně čajového nálevu (vůně zeleného čaje má být čistá, ryzí, bez vedlejších zápachů s tóny zelenými, květinovými, ovocnými. Vůně sena, zatuchliny či žádná vůně jsou znaky nekvalitní jakosti)

Označení vzorku	A	B	C	D	E	F	G	H	CH
Bodové hodnocení									
Označení vzorku	I	J	K	L	M	N	O	P	R
Bodové hodnocení									

C) Chut' čajového nálevu (chut' zeleného čaje je typická, nasládlá, nemá být mdlá nebo naopak svíravá, příliš trpká a hořká či obsahovat další pachutě)

Označení vzorku	A	B	C	D	E	F	G	H	CH
Bodové hodnocení									
Označení vzorku	I	J	K	L	M	N	O	P	R
Bodové hodnocení									

Intenzita chutí čajového nálevu

Ochutnejte jednotlivé vzorky čaje a přiřaďte každému vzorku hodnocení podle následující bodové stupnice (1 - nepatrná až 5 - silně výrazná):

- 1 - silně výrazná**
- 2 - dosti výrazná**
- 3 - průměrná**
- 4 - velmi slabá**
- 5 - nepatrná**

Označení vzorku	A	B	C	D	E	F	G	H	CH
Sladkost									
Kyselost									
Slanost									
Hořkost									
Trpkost									
Označení vzorku	I	J	K	L	M	N	O	P	R
Sladkost									
Kyselost									
Slanost									
Hořkost									
Trpkost									

Senzorické hodnocení suroviny - sypaných zelených čajů

Ohodnoťte jednotlivé vzorky čaje a přiřaďte každému vzorku hodnocení podle následující bodové stupnice (1 - vynikající až 5 - nedostačující):

1 - vynikající

2 - velmi dobrá

3 - dobrá

4 - dostačující

5 - nedostačující

Barva suroviny (barevné tóny zelené)

Označení vzorku	1	2	3	4	5	6
Bodové hodnocení						

Vůně suroviny (vůně sladká, sladce zelená, kořeněná, nežádoucí – př. plesnivá, připálená)

Označení vzorku	1	2	3	4	5	6
Bodové hodnocení						

Celkový dojem (přibližně stejné lístky nebo úlomky stejné velikosti a barvy, nemá obsahovat cizí částice – př. písek, kamínky)

Označení vzorku	1	2	3	4	5	6
Bodové hodnocení						

Poznámky: