



**Studium vlivu požití zeleného čaje na antioxidační stav
organismu**
Bakalářská práce

Vedoucí práce:

Ing. Pavlína Adam, PhD.

Konzultant:

RNDr. Ondřej Zítka, PhD.

Ing. Žaneta Buchtová

Vypracovala:

Veronika Papanová

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci:

Studium vlivu požití zeleného čaje na antioxidační stav organismu

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 a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou *Směrnicí 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:

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych ráda poděkovala mé konzultantce Ing. Žanetě Buchtové, za užitečné a cenné rady, trpělivost, ochotu a snahu vždy vyjít vstříc. Dále bych chtěla poděkovat mému konzultantovi RNDr. Ondřeji Zítkovi, Ph.D., za pomoc nejen při zpracovávání praktické části, vedoucí práce Ing. Pavlíně Adam, Ph.D. za všechny připomínky při vypracování a všem z Ústavu chemie a biochemie za poskytnutí pomoci a podpory při tvorbě a dokončení této práce. V neposlední řadě patří můj dík rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce na téma „*Studium vlivu požití zeleného čaje na antioxidační stav organismu*“ je rozdělena na dvě části, a to teoretickou a praktickou. Teoretická část práce se zabývá surovinami pro výrobu zeleného čaje a samotnou výrobou. Dále pak chemickým složením, zdravotními účinky a vlivem na organismus člověka při jeho užívání. Praktická část pojednává o provedeném experimentu ze vzorků kapilární krve pomocí Ellmanovy metody, Bradfordovy metody a HPLC vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí. V praktické části je zahrnut také orientační sensorický dotazník. Z výsledků vyplývá, že zelený čaj je schopen zvyšovat látky s antioxidačním účinkem v krvi. Hodnoty z Ellmanovy metody a HPLC – ED analýzy jsou srovnatelné a je pozorován nárůst thiolových skupin a redukovaného glutathionu v průběhu užívání. Dle výsledků z Bradfordovy metody nemá zelený čaj zřejmě žádný účinek na obsah bílkovin v krvi. Celkový dojem čaje ze sensorické analýzy je uspokojivý – 73,8 bodů.

Klíčová slova: antioxidant, zelený čaj, spektrofotometrie, Ellmanova metoda, Bradfordova metoda, HPLC – ED, GSH

ABSTRACT

This bachelor's thesis „*Study of green tea ingestion on antioxidant status of the organism*“ is divided into two parts – theoretical and practical. The theoretical part deals with materials for the production of green tea and its production, chemical composition, health effect and the impact on the human organism during use. The practical part is about experiment with capillary blood samples using Ellman's method, Bradford assay and High performance liquid chromatography with electrochemical detection. The practical part also including the sensory questionnaire. The results show that green tea is able to increase the substances with antioxidant effect in blood. Values of Ellman's method and HPLC – ED analysis are comparable and thiol groups and reduced glutathione growth is observed. According the result of the Bradford assay it seems that green tea has no effect on the protein content in blood. The overall impression of the sensory analysis is satisfactory – 73,8 points.

Key words: antioxidant, green tea, spectrophotometry, Ellman's method, Bradford assay, HPLC – ED, GSH

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	CÍLE PRÁCE	9
3	ZELENÝ ČAJ	10
3.1	Historie.....	10
3.2	Druhy čajovníku.....	11
3.3	Charakteristika zeleného čaje.....	11
3.3.1	Chemické složení	11
3.3.2	Požadavky na jakost.....	14
3.4	Výroba zeleného čaje	16
3.4.1	Suroviny pro výrobu	16
3.4.2	Pěstování čajovníku	17
3.4.3	Sběr	17
3.4.4	Výroba	18
3.5	Produkce čaje a spotřeba	19
3.6	Účinky zeleného čaje na zdraví.....	19
3.7	Zelený čaj v legislativě.....	20
4	VOLNÉ RADIKÁLY A OXIDATIVNÍ STRES	21
5	ANTIOXIDANTY	22
5.1	Klasifikace antioxidantů.....	22
5.2	Zástupci antioxidantů	24
5.2.1	Syntetické antioxidanty.....	24
5.2.2	Přírodní antioxidanty	24
5.2.2.1	Rostlinné fenoly	24
5.2.2.2	Karotenoidy	26
5.2.2.3	Tokoferoly	27
5.2.2.4	Kyselina askorbová	28
5.2.2.5	Glutathion.....	28
5.3	Antioxidanty v legislativě	29
6	MATERIÁL A METODIKA	31
6.1	Materiál	31
6.2	Přístroje a pomůcky.....	31
6.3	Ellmanova metoda stanovení thiolových skupin.....	32
6.4	Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové	33

6.5	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC – ED	33
6.6	Orientační senzoričká analýza.....	34
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	35
7.1	Vyhodnocení Ellmanovy metody.....	35
7.2	Vyhodnocení Bradfordovy metody.....	37
7.3	Vyhodnocení HPLC – ED analýzy	39
7.4	Vyhodnocení senzoričké analýzy.....	42
8	ZÁVĚR.....	44
9	POUŽITÁ LITERATURA.....	45
10	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	51
11	SEZNAM ZKRATEK.....	52
12	PŘÍLOHY	53

1 ÚVOD

Zelený čaj se pije ve světě již více než 5 000 let a těší se čím dál větší oblibě. Jedná se pravděpodobně o druhý nejrozšířenější nápoj hned po vodě. Již v době vlády faraonů, bylo známo, že zelený čaj dodává tělu potřebnou energii a má také nespočet zdravotních výhod. Od nepaměti byl tedy tento nápoj využíván k medicínským účelům. Dnes je již potvrzeno, že zelený čaj pomáhá snižovat krevní tlak a působí jako prevence proti diabetu, používá se k léčení ran a zástavě krvácení, posiluje zuby a působí protirakovinotvorně. Japonští vědci dokonce tvrdí, že při zvýšené konzumaci zeleného čaje působí tento nápoj redukčně a lidské tělo je tak schopné spalovat více kalorií [1].

Pozitivní efekt zeleného čaje je dán především tím, jak se vyrábí – působením páry, či jiných vysokých teplot, které zabraňují oxidaci. Tím jsou zachovány obsažené antioxidanty, zejména polyfenolické sloučeniny, které mají ony prospěšné účinky na lidský organismus.

Antioxidanty jsou dnes ceněny zejména proto, že dokáží vychytávat volné radikály, které způsobují oxidační stres organismu. Pokud je v těle nevyvážený poměr antioxidantů a volných radikálů, může docházet k negativním účinkům na zdraví. Jsou spouštěny mutace DNA a posléze vznikají tumory, dochází k onemocněním, jako je diabetes, či kardiovaskulární choroby. Kromě esenciálních antioxidantů existují i takové, které je člověk schopen si sám vyprodukovat. Sem patří například tripeptid glutathion, syntetizovaný z aminokyseliny cysteinu. Jedná se o nejsilnější endogenní antioxidant vůbec. Glutathion však sám o sobě nedokáže vychytávat veškeré volné reaktivní radikály a jeho obsah se mění například se stářím organismu, proto je potřeba vnitřní antioxidační systém doplnit také o vnější zdroje těchto látek.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo vytvořit literární rešerši na téma zelený čaj a antioxidanty. Bylo potřeba zaměřit se především na charakteristiku volných radikálů a antioxidantů, výrobu, složení, jakost a zdravotní účinky zeleného čaje. V praktické části bylo cílem provést stanovení celkových thiolových skupin pomocí Ellmanovy metody, stanovení množství proteinů pomocí Bradfordovy metody a stanovení redukovaného glutathionu pomocí HPLC vysokotlaké kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí ze vzorků kapilární krve zkoumané skupiny lidí. Následně byly výsledky graficky zpracovány a vyhodnoceny. V neposlední řadě byla provedena orientační senzorická analýza.

3 ZELENÝ ČAJ

3.1 Historie

Čajovník je rostlina, o které se dochovalo mnoho legend a má dlouholetou tradici. Nejstarší zmínka o pití čaje pochází z 3. století našeho letopočtu, avšak objev samotné rostliny se datuje ještě mnohem dříve, až 3 tisíce let před naším letopočtem [2]. Nejznámější legenda vypráví o čínském vládcí Shen – Nungovi, který seděl pod stromem a vařil vodu, aby se očistila. Vítr mu do ní zavál pár lístků z čajovníku, a po pár minutách ucítil z misky vůni čaje. Vládce ochutnal a přikázal čajovníky pěstovat na svém dvoře. Příběh se datuje do období 2737 – 2697 před naším letopočtem [3]. Z Číny také pochází první herbář starý 1500 let, ve kterém se objevují záznamy o čaji [2].

V historii byl čaj vnímán jako medicína, potravina a pomůcka k obětním rituálům. Zprvu se čaj vyráběl pouze v kláštorech, kde sloužil mnichům jako stimulant a napomáhal při meditaci. V 8. století také právě v klášteře vzniká první kniha, která se zabývá čajem – Kniha o čaji. V 10. až 13. století došlo k největšímu rozmachu čaje a již se nepodával jen na císařských dvorech, ale i obyčejným lidem. V této době už se jednalo o čaj, jaký je znám dnes, nicméně vývoz do zahraničních zemí začal až v 17. století [4].

Nejen v Číně je čaj jedním z nejoblíbenějších a nejkonzumovanějších nápojů. Stejně tak je na tom také Japonsko [4].

Do Evropy se čaj dostal až během 16. století, díky misionářům a obchodníkům. Zprvu se však tento nápoj rozšířil jen do Portugalska, Francie, Nizozemí a Itálie. V polovině 17. století se čaj dostal i do Anglie, kde se posléze stal národním nápojem, kterým zůstal dodnes. Dopomohly k tomu vhodné klimatické podmínky kolonizovaných území a také historická událost „Bostonské pití čaje“, kdy Spojené státy bojovaly za svou nezávislost [4]. Britové patří dnes k jedněm z největších konzumentů čaje se spotřebou až 5 kg na osobu za rok. Rovněž jsou označováni za největší dovozce [2].

I české země mají svůj podíl na historii čaje. V 17. století brněnský botanik Joseph Georg Kamel při své cestě na Filipínách vytvořil herbář, ve kterém byly popsány rostliny rodu *Camellia*. V herbáři nesly označení Kamel, takže se předpokládá, že název čajovníku se dochoval právě z těchto dob. Nicméně oficiálně byl čajovník objeven a pojmenován v roce 1753 Carlem Linném [5]. První zmínky o čaji v českých zemích vedou do

18. století, kdy jistý kupec Jan Alois Svatojánský prodával čaj v Praze. Tehdy se jednalo o velmi ceněné zboží [6].

3.2 Druhy čajovníku

Čajovník je řazen pod botanický rod *Camellia*, který v sobě zahrnuje více než 50 druhů čajovníků, a to zejména keřovité formy. Jedná se konkrétně o tyto dva – *Camellia sinensis* (Čajovník čínský) a *Camellia assamica* (Čajovník ásámský) [5]. I přesto, že oficiální botanický název zní *Camellia sinensis*, v literatuře se nachází i jiná označení, jako například *Thea sinensis*, *Thea bohea*, *Camellia thea* a další [7]. Méně známým druhem je Čajovník indočínský neboli kambodžský [2].

Čajovník je stále zelený keř, má malé aromatické bílé květy [7]. Listy mají různou délku 3 – 25 centimetrů, dospělé listy jsou tlusté, kožovité a hladké na povrchu, mladé listí je potaženo bílým chmýřím [4]. Čajovník může být podle okolností strom, nebo keř. Divoké formy čajovníku jsou stromovitého tvaru, naproti tomu kulturní druhy jsou udržovány v keřovité formě [7].

Čajovník čínský je chladuvzdorný keř s malými listy na rozvětvených stoncích. Dorůstá výšky 1 – 3 metrů. Malé lístky produkují vynikající čaj. Ve svém přirozeném prostředí v horách může přežívat stovky let. Čajovník ásámský produkuje lístky, které po úpravě dávají velmi aromatický silný čaj. Jedná se o malý strom s velkými a širokými listy. V divočině může dorůst výšky až 20 metrů a plodí až 40 let [8].

Kromě těchto tradičních čajovníků existují také rostlinné směsice. Jedná se o výsledek křížení jednotlivých druhů, který je označován jako hybrid. Křížit mezi sebou můžeme čajovník čínský s ásámským, nebo jeden druh z různých provincií. Cílem je vložit všechny pozitivní vlastnosti jednotlivých rostlin do jedné a vytvořit odolnou a přizpůsobivou rostlinu [9].

3.3 Charakteristika zeleného čaje

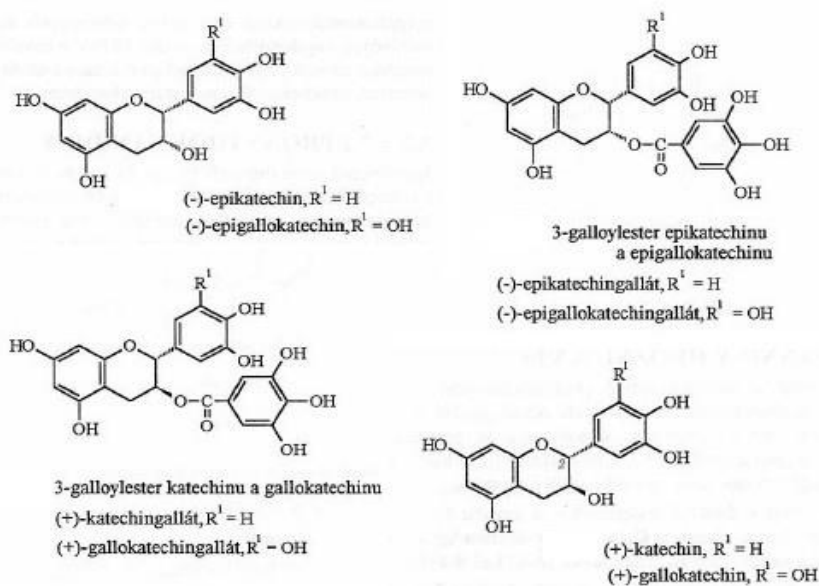
3.3.1 Chemické složení

Chemické složení zeleného čaje se mění se stářím. Čím je čaj starší, tím méně účinných látek obsahuje [9]. Z biochemického hlediska obsahují čerstvé lístky zeleného čaje vodu,

třísloviny, kofein, silice, bílkoviny, sacharidy (monosacharidy, polysacharidy a sacharózu), vlákninu, pigmenty, enzymy, éterické oleje, vitaminy (zejména skupiny B a vitamin C), minerálie a karoteny [10].

Z látek zabraňujících oxidaci jsou zde nejvíce obsaženy polyfenolové antioxidanty – flavanoly, flavanoidy, flavonoidy a fenolové kyseliny. Tyto katechiny ovlivňují chuť a barvu konečného produktu a nachází se až v jedné třetině suchých listů. Na barvu listů mají vliv také přítomné chlorofilní a karotenoidní barviva a další pigmenty [4]. Nejvíce zastoupeným polyfenolem je epigallokatechin gallát (EGCG), který dokáže nejen inhibovat rakovinné buňky, ale dokonce je i účinně odstraňuje pryč z organismu. Také ovlivňuje hladinu LDL cholesterolu a zabraňuje vzniku krevních sraženin a následné trombóze [11].

Polyfenolové látky v čaji byly dříve označovány jako taniny. Vyznačují se velmi pronikavou chutí a v suchém listí se nachází z 15 – 30 %. V čerstvém listí najdeme skupinu těchto látek pod jednotným názvem katechiny. Patří sem gallokatechin (GC), epigallokatechin (EGC), epikatechin (EC), epigallokatechin gallát (EGCG) a epikatechin gallát (ECG) [1]. Nejvíce zastoupen je již zmiňovaný EGCG, a nejvyšší obsah je hlavně v prvních lístcích, kde je to 15 – 30 %, ve druhém a třetím lístku je také velké množství katechinů. Katechiny se dělí na dvě skupiny, a to na volné a esterifikované. Esterifikované katechiny se vyznačují svíravou hořkou chutí, volné katechiny nejsou tolik dráždivé a mají sladkou dochuť [12].

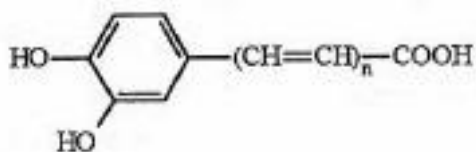


Obr. č. 1: Strukturální vzorce katechinů [13]

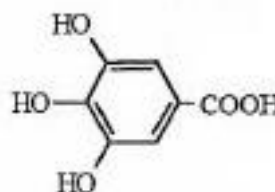
Kromě výše uvedených katechinů obsahuje zelený čaj také kyselinu gallovou. Dále obsahuje kyselinu chlorogenovou a kávovou, které patří mezi fenolové kyseliny. Ze zástupců flavonolů můžeme uvést myricetin a quercetin [14].

Z minerálních látek se zde nachází vápník, železo, draslík, hořčík, fosfor, sodík, zinek, chlor a fluoridy. Železo napomáhá rozvodu kyslíku po těle, fluoridy a vápník chrání zuby a kosti, draslík chrání nervové buňky před stresem a zinek napomáhá v boji proti nemocem. Zelený čaj je rovněž bohatý na vitaminy. Kromě nejtypičtějšího vitamínu C (kyselina askorbová), se zde nachází také tokoferol (vitamin E), který je rozpustný v tucích, thiamin (vitamin B₁) a riboflavin (vitamin B₂), retinol (vitamin A) a vitamin K. Tyto vitaminy jsou důležité pro imunitní systém, posilují zrak a paměť, ovlivňují celkový metabolismus a některé působí antioxidačně [4,9].

V čaji je také obsaženo velké množství tříslovin a kofeinu. Kofein v čaji se dříve označoval jako tein, avšak zjistilo se, že chemické složení těchto látek je totožné, jen se čajový kofein uvolňuje do těla pomaleji. Pomalejší uvolňování je právě díky tříslovinám, na které je navázán. Ty také způsobují, že účinky kofeinu trvají delší dobu [15]. Kofein stimuluje centrální nervovou soustavu a tím zvyšuje výkonnost a snižuje únavu. Podporuje také látkovou výměnu, vyměšování žaludečních šťáv, prokrvuje organismus a zrychluje dech. U některých jedinců může kofein působit i opačně a cítí se tedy po požití čaje či kávy ospalí [9]. Kromě kofeinu se v čaji vyskytují i další purinové alkaloidy – theofylin a theobromin [2].



3,4-dihydroxybenzoové a skořicové kyseliny
 protokatechuová kyselina, $n = 0$
 kávová kyselina, $n = 1$



gallová kyselina

Obr. č. 2: Strukturní vzorce kyseliny gallové a kyseliny kávové [13]

3.3.2 Požadavky na jakost

Podle rozdílné technologie výroby čaje se výsledné produkty dělí na černý čaj, ve kterém došlo k fermentaci, zelený čaj, který neprošel procesem řízené oxidace a polofermentovaný čaj, zvaný oolong [16]. Zvláštností je bílý čaj, který se však vyrábí pouze omezeně [17].

Kvalitně vyrobený zelený čaj má mít svěží vůni, která připomíná seno. Jednotlivé lístky by neměly být hnědé, ale zelené, měly by být matné, suché a pevné. Pokud došlo k nežádoucí fermentaci, na listech se objeví hnědé skvrny [15].

Doba louhování čaje by neměla přesáhnout dvě minuty, neboť dochází k vyluhování tříslovin a čaj získává hořkou chuť. Rovněž by se čaj neměl zalévat vroucí vodou, protože dojde ke ztrátě antioxidantů, které mají v tomto případě velký význam [15]. Ideální teplota je pro nenáročné druhy zeleného čaje 75 – 90 °C, pro jemné květinové druhy je to pouze 60 – 75 °C [9]. Čaj by se měl podávat neochucený, bez cukru, mléka, citronu a dalších přísad [5].

Vliv na výslednou chuť mají také plantáže, na kterých se čajovníky pěstují. Japonský zelený čaj má chuť po trávě, čaj vypěstovaný na Srí Lance má vůni citrónu. Počasí také ovlivňuje výsledný produkt. Důležitý je správný poměr slunečních paprsků, deště a dlouhodobý růst, který zaručují horské oblasti, proto je čaj z těchto míst také nejaromatictější a nejkvalitnější [9].

Čaj se po procesu výroby třídí do různých tříd, podle porušení listů. Existují kategorie pro celé neporušené listy, zlámané listy a jemný prach. Celé listy se používají pro nejkvalitnější čaj, zlomky a prach slouží pro výrobu čaje v sáčku [7]. Některé čajové lístky se mohou i míchat dohromady. Dělá se to proto, že kvalita čaje je odvislá od roku či sezóny a zabraňuje se tím zhoršení jakosti produktu [8].

Podle chuti se rozdělují čaje do tří skupin. Do první skupiny se řadí čaje s jemnou květinovou chutí, do druhé patří čaje s kořeněnou květinovou chutí a do poslední čaje s čerstvou a osvěžující chutí. Čínský zelený čaj má bledě zelenou barvu, některé druhy mohou mít lehce kouřové aroma. Na druhou stranu japonský čaj má barvu sytě zelenou a příchut' trávovou [9].

Tabulka č. 1: Členění druhů čaje na skupiny a podskupiny [18]

Druh	Skupina
čaj pravý	zelený čaj
	polofermentovaný čaj
	černý čaj
ochucený čaj	
bylinný čaj	
ovocný čaj	
výrobky z čaje	čajový extrakt
	instantní čaj

Tabulka č. 2: Fyzikální a chemické požadavky na jakost čaje [18]

Znak	Čaj černý	Instantní
celkový popel % hmotnosti nejvýše	8,0	20
vlhkost % hmotnosti nejvýše	-	6,0
vodní extrakt % hmotnosti nejméně	25	-
úbytek hmotnosti sušením při 103 °C % hmotnosti nejvýše	10,0	-

Tabulka č. 3: Smyslové požadavky na jakost čaje [18]

	Vzhled	Barva	Vůně a chuť
čaj pravý			
před spařením	svinuté čajové listy, nebo jejich části a části stonku u ochucených a aromatizovaných čajů s částmi rostlin jiných než z čajovníku	podle druhu čaje světle zelená s odstíny šedé u zeleného čaje, hnědá až černá u čaje fermentovaného, u čaje aromatizovaného nebo ochuceného s částmi rostlin jiné barvy	typické pro surovinu, čisté bez cizích pachů, případně ovlivněná použitou částí jiných rostlin
po spaření	nálev čirý, nebo s mírnou opalescencí až mírným zákalem	barva světle zelená s odstíny žluté, červené až tmavě hnědé v závislosti na použitém druhu čaje	charakteristická, mírně natrpklá

3.4 Výroba zeleného čaje

3.4.1 Suroviny pro výrobu

Čaj se vyrábí z listů stromů či keřů čajovníku *Camellia sinensis*. Po úpravě výhonků, listů, pupenů vzniká aromatický nápoj. Sběr probíhá až pětkrát ročně a cílem je získat nejmladší část větvíček, kterým se říká fleše. Pod tento pojem spadá část větvičky s vrcholovým listovým pupenem a se dvěma až třemi prvními lístky. Čím je fleš mladší, tím je výsledný produkt aromatictější a jemnější [4].

3.4.2 Pěstování čajovníku

Čajovníky rostou jako divoké stromy a keře v Ásámu, Barmě, Zadní Indii a jižní Číně. Průmyslové pěstování čajovníků je situováno do Indie, Číny, Japonska, Indonésie, Tchaj-wanu a na Srí Lanku. Nejvhodnější je sázet čajovníky do oblastí s monzunovým klimatem, protože potřebují dostatek srážek, a do subtropického a tropického pásma. Nejvyšší jsou čaje z horských oblastí, byť jejich výnosy jsou naopak nejnižší [2]. Ideální teplota pro růst je 10 – 24 °C a srážky by měly být ročně v průměru 200 – 230 cm [8].

Keře čajovníku se pravidelně každé dva až čtyři roky prořezávají a tím se udržují vysoké asi 1 metr. Upravuje se také šířka, která není přesně stanovená [7].

Rozmnožování čajovníků probíhá několika způsoby. Dnes se upřednostňuje vysazování sazenic. V minulosti se vysévala jednotlivá semena, nebo se sadily odnože [15]. Řízkování je dnes nejrozšířenější metoda rozmnožování čajovníku. Řízky se uchovávají 12 – 15 měsíců před vysazením ve speciálních školkách a až pak jsou přemístěny do zahrad. Tam se nechají vyrůst do jednoho metru a pak se seříznou na výšku pár stop a vytvoří se tak písmeno V [7].

3.4.3 Sběr

Tradiční sběr probíhá ručně a provádí jej proškolené sběračky [17]. Kromě ručního sběru existuje také mechanizovaný. Způsob sběru má vliv na konečnou kvalitu produktu – ruční sběr poskytuje kvalitnější výrobek [19]. V teplém klimatu jsou nové čajovníky připraveny na sběr po 2 – 4 letech a získávají se velmi kvalitní produkty. V chladnějším podnebí trvá růst a zrání déle, čajovníky jsou vyzrálé až po více než 5 letech a výsledný čaj je jemnější [7]. Velmi ceněné jsou přírodní, tzv. „divoké“ čajovníky, ze kterých se ročně sklídí asi jen 40 – 80 kg [15].

Čajové lístky se sbírají dle „sběrových formulí“, které určují, jaké části větvičky se mají sklídit [4]. Nejčastěji se sbírají první dva až tři lísky a pupen, u kvalitnějších čajů je to pouze pupen s jedním lístkem, nebo dokonce jen pupen. V některých částech Japonska se sbírají záměrně i lístky, které nějakou dobu rostou v zastínění [19].

Hlavní sběr probíhá většinou 3 – 5x, ale je možné provádět sběr až 30x ročně, a to zejména v tropických oblastech, kde lístky zrají rychleji. První a druhý sběr na jaře bývá ten nejkvalitnější a nejvyšší jakosti [6].

Podle doby sklizně se čaje člení do těchto skupin [4]:

- *First Flush*, sklizené v březnu a první polovině dubna;
- *In between*, sklizené od dubna do první poloviny května;
- *Second Flush*, sklizené od května do června;
- *Autumnal*, sklizené v říjnu a listopadu.

3.4.4 Výroba

Každý čajový mistr, stejně jako vinař, má svou vlastní technologii výroby čaje, avšak hlavní kroky jsou vždy stejné. Jedná se o vadnutí, rolování, oxidaci, sušení a dosoušení, třídění a balení [7]. Čajové lístky se musí co nejrychleji dopravit do továrny na zpracování čaje. Ty se nacházejí v bezprostřední blízkosti čajových plantáží, aby výroba proběhla rychle, nejlépe do 12 hodin od sběru [17].

U zeleného čaje jako jediného neprobíhá fermentace a zůstávají zde zachovány velmi cenné přírodní polyfenolické látky. Označení fermentace je poněkud klamavé, jelikož se nejedná o kvašení, nýbrž o řízenou oxidaci [20]. Lístky se po otrhání nechají jen zavadnout, případně se ihned deenzymují (deaktivuje se enzym polyfenol – oxidáza). Zpracování probíhá několika způsoby – na pánvi, propařováním, nebo pečením. Takto připravené listy jsou tvarovány a suší na bambusových platech [6]. Je důležitý důkladný proces sušení, aby nedošlo k plesnivění, nebo nežádoucí fermentaci [9].

Dle způsobu sušení jsou známy dvě metody – napařovací a pražicí. V Číně jsou typické metody sušení na přímém slunci, nebo nad ohněm, či na pánvích. Po zaschnutí se praží v bubnech s proudícím horkým vzduchem o teplotě 90 °C. Jedná se o pražicí metodu, kterou se vyrábí čaj zvaný *Panroasting tea*. V Japonsku se upřednostňuje sušení horkou vodní párou. Touto metodou (napařovací) je vyráběn čaj zvaný *Steaming tea* [15].

3.5 Produkce čaje a spotřeba

Největší producenti čaje jsou zejména Čína, Indie, Srí Lanka, Vietnam, Indonésie, Keňa a Malawi. Tyto země pokrývají třetinu světové produkce čaje, přičemž jen Čína a Indie vyprodukují zhruba polovinu celosvětové produkce [17]. V Evropě se čajovníky pěstují velmi málo, najdeme je jen v Azorách [15].

Za posledních 20 let stoupla produkce čaje o 51 %. Pouze 27 % této produkce však spadá na zelený čaj, i když je velmi oblíbený v Číně, Indonésii a Vietnamu. V USA, Velké Británii a Holandsku se preferuje pití čaje v čajových sáčkích [17].

Co se spotřeby týče, celosvětově bylo v roce 2013 zkonsumováno celkem 5 milionů tun čaje. V Evropě patří mezi největší konzumenty Velká Británie, se spotřebou 116 tisíc tun ročně. Co se týče největšího konzumenta čaje vůbec, sem patří bezpochyby Čína, se spotřebou 1,6 milionů tun ročně. Hned za Čínou se umístila Indie, kde se zkonsumuje 1 milion tun čaje ročně. Na třetím místě je Turecko, se spotřebou 228 tisíc tun. Naopak nejméně konzumován je čaj například v Polsku, kde je to 15 tisíc tun [21].

3.6 Účinky zeleného čaje na zdraví

Více než 4000 let používají obyvatelé Číny zelený čaj pro léčbu nejrůznějších nemocí, od bolesti hlavy až po deprese [11]. Nejdůležitějšími pozitivními účinky na zdraví organismu jsou: vysoká antioxidační schopnost, ochrana před vznikem rakoviny, snižování cholesterolu a krevního tlaku, antimikrobní a antibakteriální účinky, redukce hladiny krevního cukru [1]. Je všeobecně známo že zelený čaj má lepší efekt na zdraví než čaj černý, a to díky většímu množství polyfenolických látek [14].

Studie prokázaly, že lidé, kteří konzumují zelený čaj delší dobu, mají nižší riziko výskytu několika majoritních chorob, které by mohly způsobit smrt. Může mezi ně být řazena například vysoká hladina cholesterolu, obezita, vysoký krevní tlak a jiná kardiovaskulární onemocnění, ale také rakovina či AIDS [22].

Je nutno zmínit pozitivní vliv na prevenci rakoviny, a to hlavně žaludku, ústní dutiny, jícnu a plic. Zelený čaj působí nejen jako prevence před vznikem rakoviny, ale při jejím vzniku také omezuje růst nádorových buněk [16]. Polyfenolické látky ochraňují mozkové buňky proti Alzheimerově chorobě a tein podporuje činnost centrální nervové soustavy.

Theaniny a katechiny působí jako prevence před druhou fází Alzheimerovy choroby – demencí [22].

Zelený čaj také dokáže zlepšovat náladu. Je to významný termoregulátor, takže v zimě zahřeje a v létě naopak ochladí. Má schopnost měnit tělesnou teplotu až o 1 °C [5]. Podstatné jsou jeho účinky na fyzickou i psychickou kondici a ovlivnění kvality spánku [23]. Co se spánku týče, u některých jedinců může zelený čaj negativně ovlivnit jeho kvalitu. Může se dostavit nespavost, kterou doprovází rychlý sled myšlenek [2].

Pití zeleného čaje pomáhá ve spalování kalorií, takže se hodí k redukčním dietám. Je to způsobeno tím, že zelený čaj dokáže správně rozložit v těle množství dodané energie a podporuje tak správný metabolismus jedince. Působí také jako prevence proti zubnímu kazu a má schopnost ničit bakterie, takže se používá při otravách jídlem [11]. Dokáže zastavit množení bakterií *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, či *Clostridium botulinum* a eliminuje průjemová onemocnění a zvracení [9]. Epidemiologické studie také prokázaly, že pravidelná konzumace zeleného čaje brání rozvoji a postupu chronické paradentózy [14].

Při konzumaci po jídle zabraňuje překyselování žaludku, protože je sám o sobě zásaditá potravina a pomáhá tak redukovat vznik onemocnění dny. S účinkem zeleného čaje na trávicí soustavu souvisí také to, že čaj podporuje léčbu onemocnění jater a žlučníku a snižuje pálení žáhy po konzumaci pokrmů podporujících vylučování žaludečních kyselin [9].

3.7 Zelený čaj v legislativě

Čajem se zabývá Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 330/1997 Sb., která spadá pod zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích. Tato vyhláška pojednává přímo o čaji, kávě a kávovinách [18].

Čajem se rozumí výrobek rostlinného původu, který slouží k přípravě nápoje k přímé spotřebě, nebo nápoj vyrobený z tohoto výrobku. Zeleným čajem se rozumí pravý čaj, ve kterém neproběhla fermentace. Pravý čaj je označení pro produkt vyrobený z listů, výhonků, pupenů nebo jemných částí zdřevnatělého stonku čajovníku *Camellia sinensis* [18].

4 VOLNÉ RADIKÁLY A OXIDATIVNÍ STRES

Pod pojmem radikál se ukrývá v podstatě každá sloučenina, která obsahuje jeden či více volných nepárových elektronů. Jedná se o velmi nestabilní sloučeniny, které agresivně přijímají elektrony do páru a tím poškozují buněčné membrány, či strukturu DNA a způsobují stárnutí buněk. Radikály jsou odpovědné za vznik nádorových onemocnění, ale také aterosklerózy, nebo cukrovky 2. typu [24]. Čajové polyfenoly mají silnou schopnost vychytávat tyto volné radikály, a tím snižují riziko závažných onemocnění [22]. Nejznámější radikál je kyslíkový, ale existuje také dusíkový, či chlorný. Redoxní aktivitu vykazují i některé kovy, jako je železo, kobalt a chrom a také se podílí na tvorbě reaktivních radikálů [25].

Oxidativní stres vzniká, když jsou v těle přítomny volné kyslíkové radikály ve velkém množství. Ty vznikají v každém těle, neboť kyslík je dennodenně přijímán dýcháním, zářením a tvoří také část organických sloučenin (léčiva, pesticidy, rozpouštědla). Největší část těchto radikálů je však přijata kouřením. Jedná se o toxické sloučeniny a patří sem například hydroxylový radikál či superoxid [24,26].

Tělo dokáže volné radikály v určitém množství inhibovat enzymatickými systémy, avšak je důležité tyto systémy podporovat i přijímanou potravou. Ta by měla být bohatá na antioxidanty, které mají schopnost volné radikály vychytávat [24]. Antioxidační mechanismy v organismu se dělí na endogenní a exogenní. Endogenní antioxidační systémy se dále dělí na enzymatické a neenzymatické. Do enzymatických endogenních systémů se řadí například cytochrom c, kataláza, či glutathion peroxidáza, do neenzymatických patří vitaminy C, A, E a K a koenzym Q10. Významnou roli hrají také minerálie ve formě stopových prvků, jako je zinek, selen, měď a mangan [26].

Odstranění volných radikálů může probíhat i jiným způsobem než pomocí antioxidantů, i když jejich neutralizace a následné odstranění je poněkud obtížné. Radikály mohou být odstraněny zachycením na jiné molekuly a tím se zneškodní. Také mohou reagovat mezi sebou navzájem. Tím dojde ke sdílení volných elektronů a radikály zaniknou. Poslední možností je vyloučení z těla například stolicí, močí, nebo hnisem [27].

Oxidativní stres je v posledních letech spojován především se vznikem rakoviny a cukrovky, s onemocněním kardiovaskulárního systému, poruchami jater, ledvin, plic a

zrakového ústrojí [26]. Z látek obsažených v zeleném čaji mají schopnost omezovat oxidativní stres zejména katechiny, které inhibují oxidativní toxiny [22].

5 ANTIOXIDANTY

Antioxidant je jakákoli látka, která je přítomna v substrátu i v nízkých koncentracích a zpomaluje nebo brání oxidaci tohoto substrátu. Oxidovatelný substrát je termín, který zahrnuje téměř vše, kromě vody, co se nachází v potravinách a živých tkáních a obsahuje bílkoviny, lipidy a DNA [28]. Antioxidační kapacita je pak definována jako schopnost inhibovat oxidaci lipidů, bílkovin a DNA, či jiné molekuly. K oxidaci dochází vlivem blokování některého z kroků při řetězové reakci [29].

Z potravinářského hlediska jsou to aditivní látky, kterými se může zvýšit trvanlivost potravin [30]. Vůbec první použití antioxidantů v potravinářském průmyslu bylo před druhou světovou válkou. Jednalo se o přírodní směsi, které sloužily ke konzervaci [25]. Dnes je hlavní použití antioxidantů v potravinářství zejména pro prevenci žluknutí, vzniku pachutí a podobných jevů. Tyto vlastnosti jsou spojeny s oxidací lipidů. V lidském gastrointestinálním traktu a tělesných tkáních je stejně důležitá oxidace lipidů, jako oxidace DNA a proteinů [28].

5.1 Klasifikace antioxidantů

Dělení podle mechanismu působení proti oxidačním procesům

Antioxidanty se dělí na primární, které vychytávají volné radikály přímo, a sekundární, které brání tvorbě radikálů nepřímo [29]. Oxidaci se může zabránit také navázáním kovů do komplexů, kdy kov zde působí jako katalyzátor, či přímou reakcí při které se vyloučí přítomný kyslík [30].

Dělení podle původu

Dle původu se antioxidanty dělí na přírodní a syntetické. K přírodním antioxidantům se řadí například kyselina askorbová, tokoferoly, lecitin, kyselina vinná a octová. Některé koření a byliny rovněž vykazují antioxidační aktivitu. Jedná se zejména o rozmarýn,

vanilku či zázvor. Mezi syntetické antioxidanty patří propylgallát, oktylgallát, dodecylgallát, butylhydroxyanizol či butylhydroxytoluen [31].

Dělení podle způsobu vstupu do organismu

Antioxidanty se mohou tvořit v organismu, mluvíme tedy o endogenních antioxidantech. Pokud se tvoří mimo tělo člověka, jedná se o exogenní antioxidanty [32].

Dělení podle lokalizace v organismu

Pokud se daný antioxidant nachází uvnitř buňky, jedná se o intracelulární látku. Extracelulární antioxidanty se nachází mimo buňku. Intracelulární antioxidanty jsou důležitější v prevenci před volnými radikály [32].

Dělení podle rozpustnosti

Dle rozpustnosti ve vodě se antioxidanty dělí na hydrofilní, lipofilní a amfofilní. Hydrofilní antioxidanty jsou rozpustné ve vodě, lipofilní se ve vodě nerozpouští, rozpouští se v tucích. Amfofilní mají vlastnosti obou zmiňovaných skupin [32]. Hydrofilní antioxidanty se nachází převážně v extracelulárních prostorech, zatímco lipofilní mohou pronikat před buněčnou membránu a působit i intracelulárně. Jejich účinek se však projevuje s mírným zpožděním [33].

Dělení podle struktury

Podle struktury se antioxidanty dělí na fenolové antioxidanty, endioly a jiné látky. Mezi fenolové antioxidanty patří například již zmiňované tokoferoly, k endiolům řadíme například kyselinu askorbovou a její deriváty a soli [30].

Dělení podle enzymatických vlastností

Podle toho, zda vykazují enzymatickou aktivitu, se antioxidanty dělí na enzymatické a neenzymatické. Mezi enzymatické řadíme například superoxid dismutázu, katalázu, glutathion reduktázu, glutathion peroxidázu a další. Neenzymatickými antioxidanty pak jsou například alkaloidy, fenoly, tokoferoly a kyselina askorbová [25].

5.2 Zástupci antioxidantů

5.2.1 Syntetické antioxidanty

Pro zamezení oxidace lipidů v potravinách výrobci používají namísto přírodních syntetické látky s antioxidačními účinky. Jedná se zejména o butylhydroxyanizol (BHA), butylhydroxytoluen (BHT) a butylhydrochinon (TBHQ). Z ekonomického hlediska je to pro ně výhodnější, tyto látky jsou levnější, chemicky stabilní a relativně dostupné. Co se však týká bezpečnosti, existují pochybnosti. Díky tomu je použití syntetických antioxidantů omezeno vládními předpisy, které se v každé zemi liší. Například TBHQ je povolen ve Spojených státech, zatímco v Evropské unii nikoli [34].

K syntetickým antioxidantům se řadí i přirozené látky, které podlehly chemické modifikaci, aby dosáhly požadovaných vlastností. Takto pozměněná může být například kyselina askorbová, vyráběná z jednoduchých cukrů. Změna způsobí lepší rozpustnost v tučích, zabránění jejich oxidace a lepší pronikání buněčnou membránou [35].

5.2.2 Přírodní antioxidanty

V rostlinách jsou obsaženy vysoké koncentrace antioxidantů. Řadí se sem fenoly, karotenoidy, tokoferoly, tokotrienoly, kyselina askorbová a enzymy s antioxidační aktivitou, které nás chrání před oxidativním poškozením. Mezi přírodní fenoly patří také antioxidanty pocházející z řas, hub a některých mikroorganismů [25].

5.2.2.1 Rostlinné fenoly

Nejvyšší zastoupení, jak již napovídá název, je v rostlinách a rostlinných potravinách. Jedná se převážně o sekundární metabolity rostlin. Řadí se sem více než 8 000 různých struktur. Největším zdrojem je cibule, kakao, hroznová semena, čaj, jablka, červené víno, citrusové plody, bobuloviny a sója. Zdravotní význam mají rostlinné fenoly rovněž velký – mají antikarcinogenní, antimutagenní, antiaterosklerotickou, antibakteriální a antivirovou aktivitu [25].

Fenolové kyseliny

Mezi fenolové kyseliny se řadí deriváty kyseliny benzoové a skořicové. Obecně se dělí na hydroxybenzoovou kyselinu (HBA) a její deriváty a hydroxyskořicovou kyselinu

(HCA) a její deriváty. Díky karboxylové skupině, kterou obsahují ve své molekule, vykazují kyselý charakter. Fenolové kyseliny se většinou nenachází ve své volné formě, ale jako vázané, nejčastěji ve vakuolách nebo buněčných stěnách. Jejich kumulace závisí na genetickém pozadí, stádiu vývoje rostliny a podmínkách životního prostředí [36].

Antioxidační vlastnosti spočívají v obraně mechanismů biologického systému jedince. Mohou přímo či nepřímo ovlivňovat barvu, hořkost, trpkost a aroma potraviny [36].

V přírodě se nachází také estery fenolových kyselin, glykosidy a amidy. Jako zástupce esteru můžeme uvést kyselinu kávovou a chlorogenovou, které se nachází v zelené i pražené kávě a čaji. Také se hojně vyskytují ve vínech a vinných mošttech. Mezi glykosidy patří sinapiny, které se vyskytují v čeledi brukvovitých. Sinapiny se vyznačují svou svíravou hořkou chutí, která se podobá chuti kofeinu. Mezi typické zástupce amidů patří pálivé látky papriky kapsaicin a dihydroxykapsaicin a amidy odvozené od alkaloidu piperinu [30].

Flavonoidy

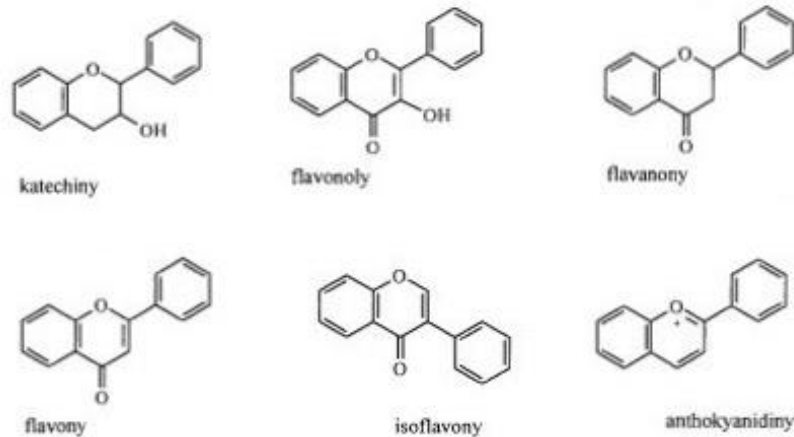
Jedná se o sloučeniny patřící mezi nízkomolekulární fenolické látky. Obsahují více hydroxylových skupin, a tím se také zvyšuje jejich antioxidační aktivita [29]. Jedná se o různorodou skupinu fytochemikálií, která se nachází téměř ve všech druzích ovoce a zeleniny, jako sekundární metabolit. Spolu s karotenoidy odpovídají za barvu těchto poživatin [37]. Flavonoidy se konzumují každý den a nebyly prokázány žádné významné vedlejší účinky [38].

Podporují imunitní systém a mají protizánětlivý účinek, působí preventivně proti kardiovaskulárním onemocněním a snižují krevní tlak. Potraviny bohaté na flavonoidy jsou například cibule, jahody, kapusta, citrusové plody a některé druhy koření [37]. Najdeme je i v nápojích, jako je káva, čaj, pivo, a především červené víno [38].

Flavonoidy se dělí na [38]:

- Flavony – luteolin, apigenin;
- Anthokyanidiny – kyanidin, delfinidin;
- Izoflavony – genistein, diadzein;
- Flavonoly – quercetin, myricetin, kamferol;
- Flavany – katechin, epikatechin;

- Flavanony – hesperetin, naringenin;
- Glykosidy flavonoidů – astragalín, rutin.



Obr. č. 3: Strukturální vzorce flavonoidů [30]

5.2.2.2 Karotenoidy

Skupina látek s podobnou strukturou, která se nachází v rostlinách, řasách, houbách, bakteriích a kvasinkách. Systém konjugovaných dvojných vazeb dává karotenoidům červenou, oranžovou a žlutou barvu. Hlavními zdroji těchto látek jsou ovoce a zelenina. Nejvýznamnějšími zástupci jsou α -karoten, β -karoten, lykopen, lutein a zeaxantin, avšak existuje až 600 typů karotenoidů [28].

Podle chemického složení se karotenoidy dělí na karoteny a xantofyly. Karoteny ve své molekule obsahují pouze vodík a uhlík a mají obvykle červenou barvu. Xantofyly obsahují v molekule kromě vodíku a uhlíku alespoň jeden kyslík. Mohou se také jinak nazývat oxykarotenoidy. Obvykle mají žlutou barvu [25].

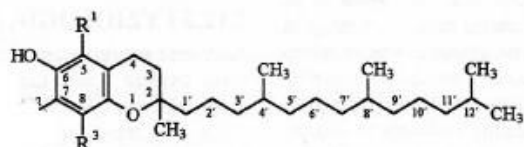
Karotenoidy pomáhají rostlinám při fotosyntéze, v organismu člověka působí protirakovinotvorně. Některé karoteny jsou schopny se v těle přeměnit na vitamin A, který je potřebný pro normální růst a vývoj jedince. Xantofyly tuto schopnost postrádají, proto nejsou tak nutričně významné, avšak ze zdravotního hlediska mají vliv na zdraví očí, a to zejména lutein a zeaxantin. S přibývajícím věkem dochází k degradaci těchto látek a může nastat slepota [39].

5.2.2.3 Tokoferoly

Jedná se o skupinu 8 sloučenin, které se vyskytují v přírodě. Jsou to α -, β -, γ -, δ -tokoferol a tokotrienoly, jinak též označovány jako vitamin E. α -tokoferol vykazuje nejvyšší biologickou aktivitu ze všech zmiňovaných [28]. Tokotrienoly se po chemické stránce liší přítomností tří dvojných vazeb v uhlíkovém řetězci [40].

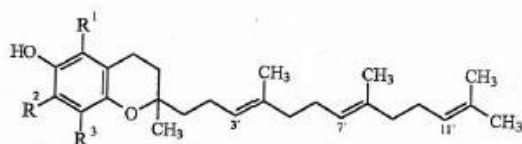
Vitamin E je jeden z hlavních antioxidantů, který v tělesných tkáních brání oxidaci lipidů a chrání buněčné membrány v časně fázi napadení volnými radikály. Je to nejrozšířenější antioxidant rozpustný v tucích. Chrání nenasycené mastné kyseliny v membránách, regulují srážlivost krve, podílí se na metabolismu bílkovin a hormonální produkci. Rovněž se podílí na ochraně vitamínu A před jeho destrukcí v organismu člověka [28]. Nutno zmínit také preventivní působení proti kardiovaskulárním onemocněním, rakovině a ateroskleróze. Zdrojem tokoferolů jsou nejčastěji oříšky, mandle a rostlinné oleje, tokotrienoly se nacházejí v zrninách a některých olejích [25].

Skupina vitamínu E má také další vlastnosti, kromě těch antioxidantních. Podílí se na zachování celistvosti endotelu cév a inhibují proliferaci buněk hladké svaloviny [41].



tokoferoly

$R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$, 5,7,8-trimethyltokol, α -tokoferol
 $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$, 5,8-dimethyltokol, β -tokoferol
 $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$, 7,8-dimethyltokol, γ -tokoferol
 $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$, 8-methyltokol, δ -tokoferol
 $R^1 = R^2 = R^3 = \text{H}$, tokol



tokotrienoly

$R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$, 5,7,8-trimethyltokotrienol, α -tokotrienol
 $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$, 5,8-dimethyltokotrienol, β -tokotrienol
 $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$, 7,8-dimethyltokotrienol, γ -tokotrienol
 $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$, 8-methyltokotrienol, δ -tokotrienol
 $R^1 = R^2 = R^3 = \text{H}$, tokotrienol

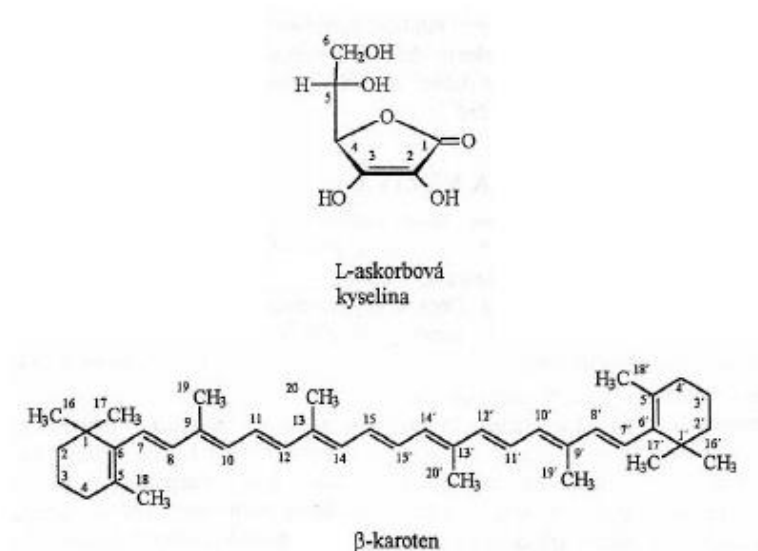
Obr. č. 4: Strukturální vzorce tokoferolů a tokotrienolů [13]

5.2.2.4 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová, známá také jako vitamin C, je jeden z nejsilnějších a zároveň nejméně toxických přírodních antioxidantů [25]. Jedná se o šestiuhlíkatý lakton, který si většina živých organismů dokáže syntetizovat – savci z glukózy v játrech, plazi a ptáci z ledvin [28]. Jediný člověk si tuto látku nedokáže sám vytvořit, musí ji přijímat potravou [42].

Kromě antioxidační funkce má také jiné uplatnění. Působí jako kofaktor některých metabolických procesů, podílí se na syntéze noradrenalinu, kornitinu a posiluje imunitu [41].

Vitamin C se nejčastěji nachází v ovoci, a to zejména v citrusových plodech, třešních, kiwi, melounech a v zelenině – rajče, listová zelenina, květák, brokolice, zelí [25].



Obr. č. 5: Strukturní vzorec β – karotenu a kyseliny askorbové [13]

5.2.2.5 Glutathion

Glutathion (GSH) je významný a všudypřítomný tripeptid, který je složen z aminokyselin cysteinu, kyseliny glutamové a glycinu. Jedná se jak o intracelulární, tak i extracelulární antioxidant, který si organismus dokáže sám syntetizovat. V buňkách se nachází buď volný, nebo vázaný na bílkoviny. Volně se vyskytuje ve své redukované formě. Můžeme jej nalézt v tkáních a tělních tekutinách člověka i zvířat, ale také u rostlin. V organismu má vliv především na řízení signalizace procesů, podílí se na detoxikaci některých

xenobiotik a těžkých kovů a také vychytává volné radikály, či udržuje stálou hladinu thiolových bílkovin [43].

Množství GSH v buňkách je řízeno specifickými enzymy, které se také podílí na syntéze buněk a kontrolují celkový stav buněčného metabolismu GSH. Hodnoty GSH nejsou po celý život vyrovnané. Studie prokázaly, že se zvyšujícím se věkem, klesá obsah tohoto antioxidantu v organismu. To má za následek sníženou antioxidační aktivitu buněk [44].

GSH je produkován ve dvou krocích: v prvním kroku vytvoří enzym γ -GLCL (glutamát – cystein ligáza) peptidovou vazbu mezi γ -karboxylovou skupinou glutamátu a aminoskupinou cysteinu. Energie je dodána prostřednictvím hydrolýzy adenosintrifosfátu (ATP). V dalším kroku se vzniklý dipeptid spojuje s glycinem pomocí enzymu glutathion syntetázy. Energie je opět dodávána prostřednictvím ATP. Je třeba poznamenat, že v některých případech je poskytnutí energie pro tvorbu GSH formou ATP limitujícím faktorem pro metabolismus GSH [45].

Existují také oxidované formy GSH. Nejvýznamnějším zástupcem je disulfid glutathionu (GSSG). Ten je složen ze dvou zbytků GSH, které byly oxidovány způsobem, kterým byl umožněn vznik intermolekulární disulfidové vazby [46]. Poměr mezi oxidovaným GSH a redukováným GSSG je důležitým biomarkerem rovnováhy redoxního potenciálu v buňce. Souvisí to také se vznikem oxidačního stresu [45]. Udržení optimálního poměru GSH:GSSG je v buňce rozhodující pro její přežití. Nedostatek GSH může buňku ohrozit, proto je také případná nerovnováha pozorována v celé řadě chorobných stavů, včetně rakoviny, HIV a stárnutí. Změna poměru GSH:GSSG může mít také přímý vliv na signální dráhy. Například při posunu poměru směrem k oxidované formě dochází ke glutathionylaci cysteinu, či vytvoření disulfidové vazby mezi cysteinovými zbytky [47].

5.3 Antioxidanty v legislativě

Legislativně tyto látky upravuje vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky pro použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. Podle této vyhlášky se mohou používat následující antioxidanty: propylgallát, oktylgallát, dodecylgallát, TBHQ, BHA, BHT, kyselina erythorbová a její sůl, rozmarýnové extrakty

a 4 – hydroxyrezorcinol. Pokud se některé galláty používají v kombinaci, nesmí celkový obsah překročit nejvyšší povolené množství [48].

Pokud je to nezbytně nutné, je možno jako přídatné látky použít i askorbylpalmitát, α -, γ -, δ -tokoferol a extrakt s vysokým obsahem tokoferolů [48].

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Materiál

Pro stanovení celkových thiolových (SH) skupin, GSH a bílkovin z krve testovaných subjektů byl vybrán pravý zelený čaj, který byl v dTestu zvolen jako nejlépe hodnocený z hlediska antioxidační aktivity. Testování se zúčastnilo celkem 10 dobrovolníků, od kterých byl předem vybrán písemný souhlas s experimentem. Jednalo se o 3 ženy ve věku 21 až 26 let a 7 mužů ve věkovém rozsahu 21 až 33 let.

Příprava vzorku

Z čajových sáčků byl připraven výluh v destilované vodě o teplotě 60 °C, který byl podáván zkoumané skupině v závislosti na jejich tělesné váze – 150 ml výluhu na hmotnost 50 kg. Koncentrace čaje byla 1 sáček, tedy 2 g čajové směsi, na 150 ml vody. Doba louhování čaje byla 3 – 4 minuty. Po 20 minutách, při nichž došlo ke vstřebání účinných látek, byla dobrovolníkům odebrána kapilární krev z nahřátého prstu v množství minimálně 15 μ l, která byla dále analyzována vybranými metodami. Prst byl nahřátý na teplotu cca 60 °C, aby došlo k lepšímu nasátí krve do kapiláry.

Experiment probíhal po dobu pěti dnů, z toho krev byla odebírána v pondělí, ve středu a v pátek, ve všech případech na lačno. Krev byla odebrána celkem 3x – v pondělí před požitím čaje, ve středu a v pátek 20 minut po jeho konzumaci. Po 10 minutách od konzumace došlo u testovaných k aktivní fázi, kdy museli udělat 20 dřepů, a následně k fázi klidu. Testovaní jedinci museli po dobu trvání experimentu dodržovat režim, který zahrnoval pití 4 šálků tohoto čaje denně. Museli také omezit konzumaci potravin s větším obsahem antioxidantů, například ovoce, zeleninu, víno, kávu a doplňky stravy.

6.2 Přístroje a pomůcky

V tomto experimentu byly používány následující přístroje a pomůcky:

- Automatické mikropipety pro odměření množství vzorků a chemikálií;
- Mikrotitrační destičky pro stanovení vzorků Ellmanovou a Bradfordovou metodou;
- Eppendorfovy zkumavky pro uchování a práci se vzorky;
- Vortex pro promíchání směsí;

- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5417 R pro odstředění supernatantu při HPLC – ED chromatografii;
- Vialky pro uchování vzorků pro HPLC – ED chromatografii;
- Krevní kapiláry pro zachycení odebírané krve;
- Lancetové pero na jedno použití pro provedení vpichu;
- Sterilní rukavice, desinfekce, vatové polštářky pro odběr krve;
- MiliQ demineralizátor Barnstead GEN PURE, Thermo Scientific;
- Spektrofotometr Tecan Infinite M200Pro, Schoeler;
- HPLC chromatograf s elektromagnetickou detekcí ESA Coullarray se 4 – kanálovou elektrochemickou celou, s autosamplerem ESA model 542.

6.3 Ellmanova metoda stanovení thiolových skupin

Princip:

Kolorimetrická metoda, při které dochází k enzymové hydrolyze za uvolnění thiocholinu, který obsahuje SH skupinu, a příslušné kyseliny. Thiocholin poté reaguje s DTNB (kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová) za uvolnění 5-merkapto-2-nitrobenového aniontu (TNB^-). Tento anion je dále stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm [49].

Chemikálie:

Pro tuto metodu byla používána demineralizovaná MiliQ voda, Ellmanovo činidlo = DTNB, octan sodný a tris base (pufrační činidlo). Jako standard byl použit cystein. Všechny chemikálie byly zakoupeny od společnosti Sigma – Aldrich.

Postup:

Pro stanovení celkových SH skupin bylo nejprve naředěno 2,5 μl krve s 22,5 μl MiliQ vody. Tato směs byla následně protřepávána ve vortexu. Do mikrotitrační destičky bylo automatickou pipetou odměřeno 138 μl DTNB s octanem sodným a bylo přidáno 5 μl naředěné krve. Pro odstartování reakce bylo na závěr napipetováno 16,5 μl tris báze. Tento postup byl opakován u každého vzorku 4x. Takto připravený vzorek se nechal 10 minut stát, a pak byla měřena absorbance při vlnové délce 436 nm. Vyhodnocení bylo provedeno metodou kalibrační křivky. Ze získaných hodnot byl vytvořen aritmetický průměr a byly vypočítány směrodatné odchylky.

6.4 Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové

Princip:

Tato kolorimetrická metoda stanovuje celkové množství bílkovin ve zkoumaném vzorku. V kyselém prostředí dochází k reakci proteinů s barvivem Coomassie Brilliant Blue G – 250 (CBB). Během reakce je barvivo CBB navázáno na bílkovinu a barva roztoku je změněna na sytě modrou. Při této změně je měřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Množství barviva CBB, které je navázáno na bílkovinu je přímo úměrné pozitivním nábojům na proteinové molekule [50].

Chemikálie:

Pro toto stanovení byla používána demineralizovaná MiliQ voda a Bradfordovo činidlo. Jedná se o směs barviva CBB, 100 % ethanolu, koncentrované kyseliny fosforečné a destilované vody. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA – Bovine Serum Albumine). Použité chemikálie byly opět od společnosti Sigma – Aldrich.

Postup:

Vzorek krve o objemu 2 μ l byl nejprve naředěn s 198 μ l MiliQ vody. Do mikrotitrační destičky bylo poté odměřeno 10 μ l naředěného testovaného vzorku. K němu bylo přidáno 90 μ l Bradfordova činidla. Na molekulu bílkoviny bylo navázáno barvivo CBB a barva se změnila. Postup byl opět opakován u každého vzorku 4x. Po 5 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm a bylo vyhodnoceno pomocí kalibrační křivky, aritmetickým průměrem a směrodatnými odchylkami.

6.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie HPLC – ED

Princip:

Jedná se o separační metodu, ve které je vzorek unášen mobilní fází (pohyblivou) skrz fází stacionární (pevný nosič). Takto je látka rozdělována. HPLC chromatografie je jedna z neúčinnějších metod, kterou se dokáže určit i malé množství stanovovaných látek.

HPLC – ED systém je složen ze dvou čerpadel s rozpouštědlem, které pracují v rozsahu 0,001 – 9,999 ml za minutu, CoulArray elektrochemického detektoru a Zorbax Eclipse AAA C18 (150 x 4,6; 3,5 μ m částic). Elektrochemický detektor obsahuje průtokovou buňku. Ta je složena ze čtyř analytických buněk, obsahujících pracovní

elektrodu z porézního uhlíku. Jedná se o dvě pomocné a dvě referenční elektrody. Vzorek je nanášen pomocí autosampleru [51].

Při HPLC s elektrochemickou detekcí je na detektor vložen kladný potenciál. Výsledek je pak zprostředkován pouze v případě, že je zkoumaná látka oxidována [52].

Chemikálie:

Pro tuto analýzu byla používána jako mobilní fáze 10% kyselina trifluoroctová (TFA) ze Sigma – Aldrich a methanol z Chem – Lab NV. Jako standard byl použit GSH, také od společnosti Sigma – Aldrich.

Postup:

Z odebraného vzorku krve bylo dále odebráno alikvotní množství 5 μ l krve, která byla smíchána s 45 μ l 10% TFA. Vzniklá směs byla 20 minut centrifugována při 4 °C a při 25 000 otáčkách za minutu. Při tomto procesu byla oddělena pevná složka (pelet) od kapalné (supernatant) a vzniklý supernatant byl odebrán a analyzován na HPLC chromatografu s elektrochemickou detekcí. Mobilní fází při tomto pokusu byl methanol a TFA. Rychlost průtoku byla 1.1 ml za minutu a nastavení gradientu při spuštění analýzy bylo 4 % TFA a 96 % methanolu. Celková délka analýzy byla 20 minut s potenciálem detekce 900 mV. Výsledkem byla opět kalibrační křivka, která byla vyhodnocena na redukovaný GSH jako standard.

6.6 Orientační sensorická analýza

K sensorickému posouzení byl podáván stejný vzorek čaje jako pro výše uvedené analýzy a hodnocen byl jeho celkový sensorický profil. Pro hodnocení byl sestaven dotazník s grafickou stupnicí 100 mm, která začínala zleva, a každý milimetr znamenal 1 bod. Nejvyšší možný počet dosažených bodů pro jeden deskriptor tedy byl 100. Formulář je zahrnut v Příloze 1.

Hodnocení se zúčastnilo celkem 10 posuzovatelů. Jednalo se o osoby, které byly testované v předešlých experimentech. Každý z nich měl k dispozici dotazník, tužku a degustační sklenici. Neutralizátorem chuti bylo pečivo.

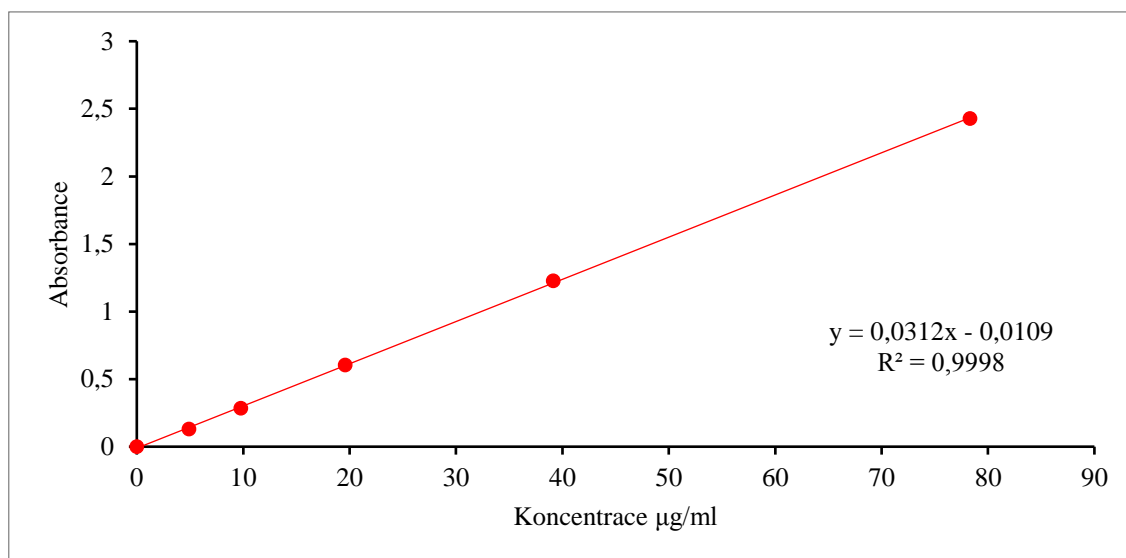
Čajový výluh byl připraven stejným způsobem jako pro předchozí pokusy a hodnoceny byly tyto deskriptory: barva, vůně, intenzita vůně, chuť, intenzita chuti, délka

doznívání chuti, stupeň hořkosti, celkový dojem. Dotazníky byly posléze vyhodnoceny a graficky zpracovány.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

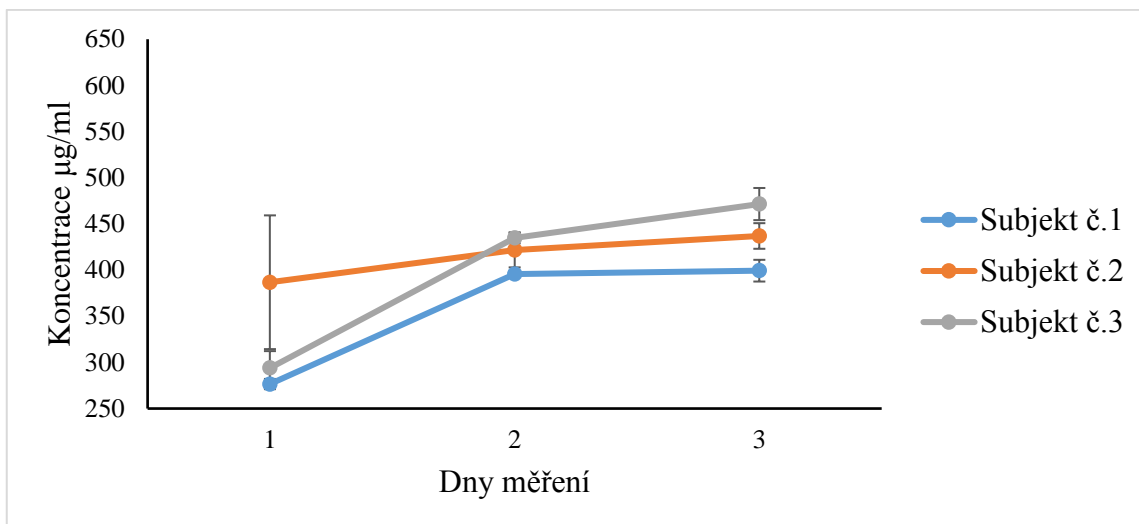
7.1 Vyhodnocení Ellmanovy metody

Výpočet celkových SH skupin byl proveden pomocí kalibrační křivky na cystein jako standard. Z kalibrační křivky (Obr. č. 6) byla vytvořena regresní přímka a rovnice regrese. Po dosažení průměrných hodnot absorbance do rovnice byl proveden přepočet dle použitého ředění, tedy 1:9. Výsledek byl udán v $\mu\text{g/ml}$. Kromě aritmetického průměru byly ještě vypočítány směrodatné odchylky.

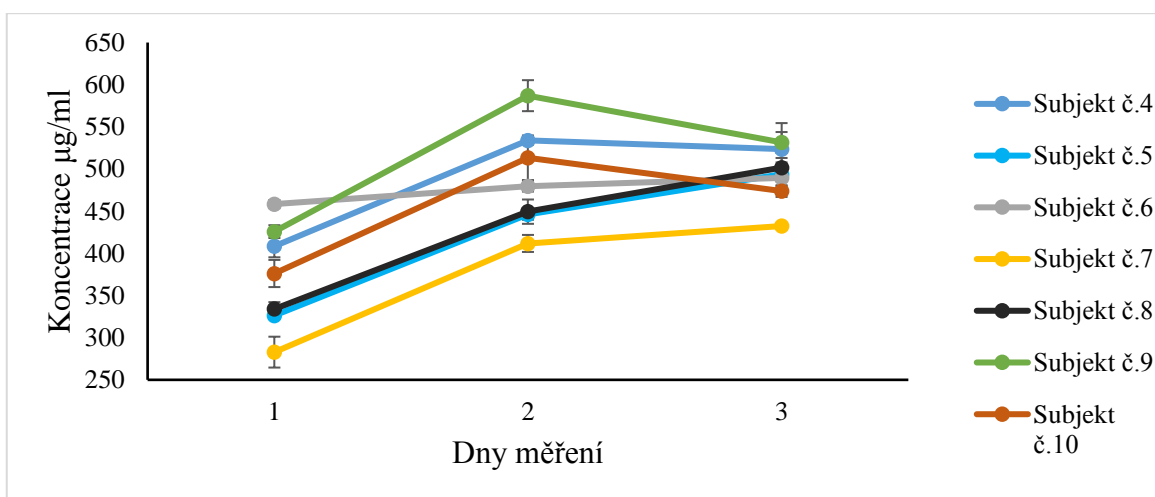


Obr. č. 6: Kalibrační křivka – Ellmanova metoda

Z naměřených hodnot byly vytvořeny grafy, které byly rozděleny dle testovaných subjektů na muže a ženy. Grafické znázornění můžeme vidět na obrázcích 7 a 8.



Obr. č. 7: Celkový obsah SH skupin – ženy (Ellmanova metoda)



Obr. č. 8: Celkový obsah SH skupin – muži (Ellmanova metoda)

Dle obrázku č. 7 můžeme vyčíst, že při pravidelném užívání zeleného čaje došlo především u subjektů 1 a 3 ke zvýšení hodnot SH skupin v krvi, a to až o 177,57 µg/ml v případě ženy č. 3. U subjektu č. 2 nebyl nárůst SH skupin tak výrazný. K nejvyššímu nárůstu došlo během prvních dvou dnů, v dalších dnech konzumace se již hodnoty příliš neměnily, ale stále se mírně zvyšovaly.

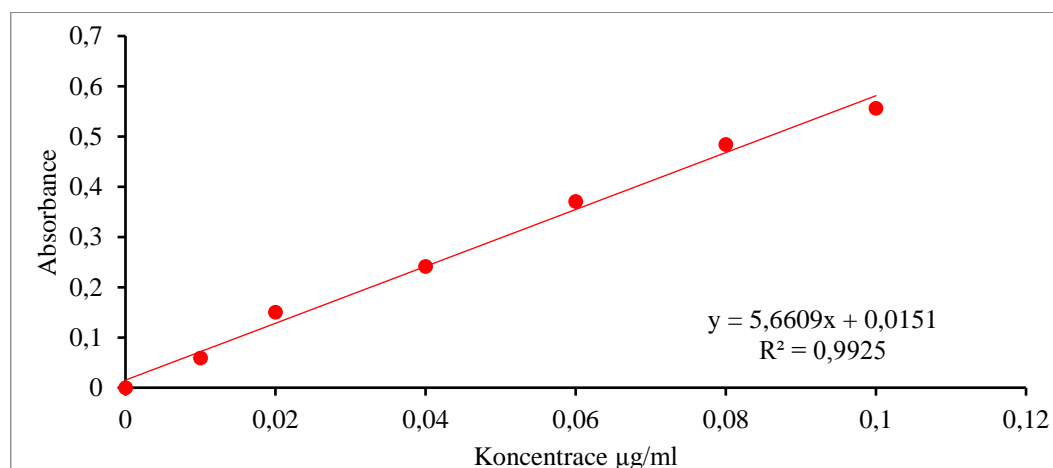
U mužů také došlo k výraznému nárůstu SH skupin v krvi, a to rovněž v prvních dnech konzumace čaje. Na rozdíl od žen však hodnoty SH skupin v dalších dnech testování u některých subjektů klesaly. Tuto skutečnost můžeme pozorovat například na jedincích č. 4, 9 a 10. Také je nutno zmínit, že u většiny mužů se celková koncentrace SH skupin pohybovala již od začátku v průměru o 14,5 % výše, než u žen.

Nejlepších výsledků z žen dosáhl jednoznačně subjekt č. 3, u mužů zase subjekty č. 5 a 8. U těchto jedinců došlo k vyrovnanému a neustálému nárůstu SH skupin v průběhu testování, i když se nejednalo o nejvyšší koncentrace. Ne příliš velkých změn v obsahu SH skupin dosáhly subjekty č. 2 a 6. Rozdíly v hodnotách se pohybovaly okolo 30 – 50 $\mu\text{g/ml}$. U těchto jedinců mohlo dojít již k předchozí pravidelné konzumaci zeleného čaje, či naopak k nedodržování stanoveného režimu.

Ze získaných výsledků vyplývá, že ze 70 % se obsah SH skupin zvyšuje při pravidelném užívání zeleného čaje. Záleží však také na pohlaví jedince – u mužů docházelo k postupnému zvyšování koncentrace jen u 4 ze 7 testovaných. Pokud by hodnoty SH skupin u testovaných jedinců klesaly, mohlo by to znamenat zvýšení aktivity reaktivních radikálů, které by oxidovaly proteiny nesoucí právě SH skupiny [53]. Mezi intracelulární látky, které obsahují SH skupinu patří například cystein, homocystein nebo GSH. Nedostatek těchto látek může mít za následek také nerovnováhu v buněčné redoxní homeostázi, nebo potíže při syntéze bílkovin [54].

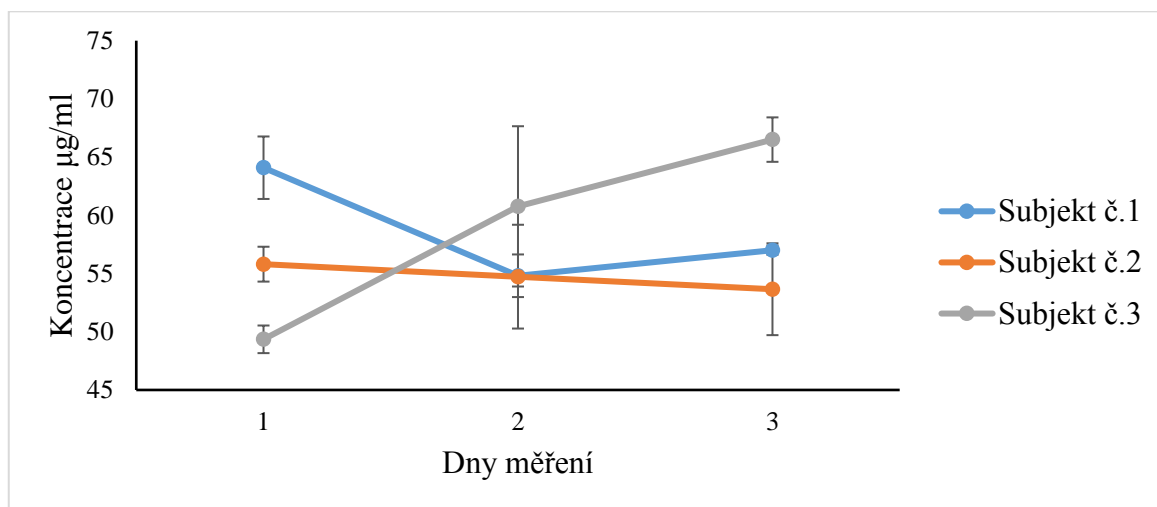
7.2 Vyhodnocení Bradfordovy metody

Celkové množství proteinů bylo stejně jako u předchozí metody vyhodnoceno metodou kalibrační křivky (*Obr. č. 9*). Z té byla vytvořena regresní přímka a rovnice regrese. Po dosažení průměrných hodnot absorbance byly výsledky přepočteny dle použitého ředění, tedy vynásobeny 1 000. Výsledek byl v $\mu\text{g/ml}$. I v tomto případě byly dopočítány směrodatné odchylky a aritmetický průměr vzorků. Standardem v tomto experimentu byl BSA.

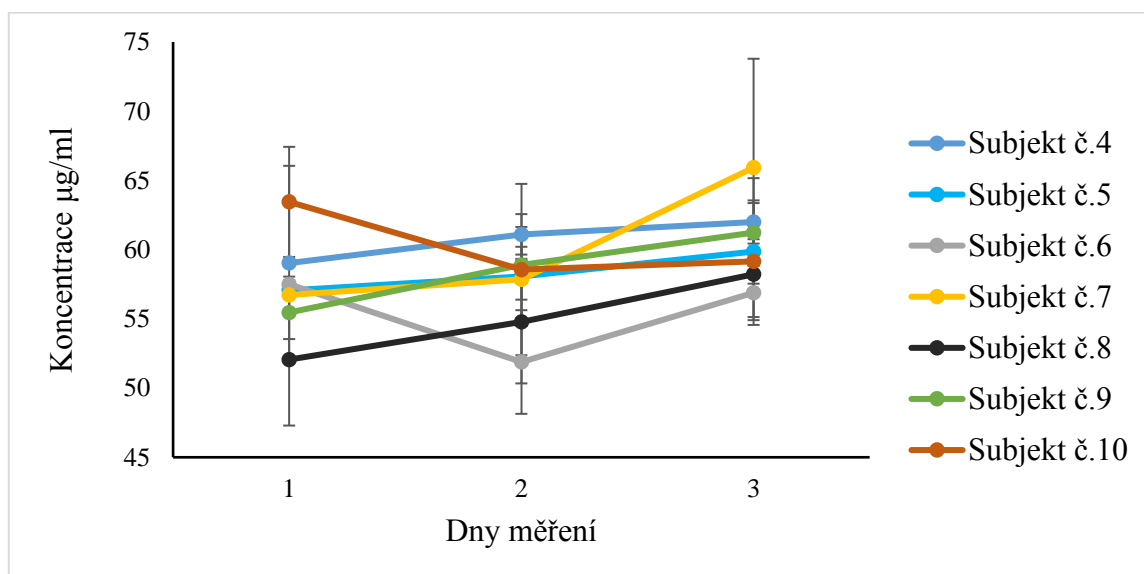


Obr. č. 9: Kalibrační křivka – Bradfordova metoda

Naměřené hodnoty byly graficky znázorněny a rozděleny dle testovaných jedinců na muže a ženy. Výsledky můžeme vidět na obrázcích 10 a 11.



Obr. č. 10: Celkové množství proteinů – ženy (Bradfordova metoda)



Obr. č. 11: Celkové množství proteinů – muži (Bradfordova metoda)

Z obrázku č. 10 je patrné, že obsah bílkovin se během užívání čaje příliš neměnil. Největší změny zaznamenáváme u subjektu č. 3, kdy došlo k vzestupu proteinů o 17,18 µg/ml. U dalších dvou testovaných žen došlo spíše k poklesu hodnot, který u ženy č. 2 přetrvával, u ženy č. 1 se pak opět nepatrně zvýšil.

K poklesu proteinů v krvi a následnému nárůstu při testování mužské skupiny nedocházelo, jednalo se pouze o jedince č. 6. U dalších subjektů docházelo především

k vzrůstu koncentrace, a to zejména u jedinců 7 a 8. K malým změnám v koncentracích docházelo i u mužů 4, 5 a 9.

Obecně lze říci, že obsah proteinů v kapilární krvi byl u mužů i žen přibližně ve stejné koncentraci. Pohyboval se v rozmezí od 50 do 65 $\mu\text{g/ml}$, což je jejich předpokládané množství. To také potvrzují Wurzinger a jeho společníci ve své studii [55]. Fyziologické rozlišení mezi kapilární a žilní krví také popsal Stein a kolektiv, kteří zmiňují nižší obsah bílkovin v kapilární krvi, oproti krvi žilní [56].

Ze získaných hodnot by se dalo odvodit, že konzumace zeleného čaje nemá velký vliv na obsah proteinů v kapilární krvi, neboť nebyl pozorován žádný statisticky významný pokles ani vzestup v rámci průměru celé testované skupiny. Byly sledovány pouze změny v závislosti na pohlaví, kdy u mužů ve většině případů obsah bílkovin stoupal, zatímco u žen klesal. Výsledky u žen však nejsou proti mužským tolik směrodatné, jelikož se testování zúčastnilo méně dobrovolníků. Nelze tedy s jistotou říci, zda by výsledky více testovaných žen nebyly podobné, jako ty mužské, a zda by subjekt č. 3 nebyl pouze výjimkou.

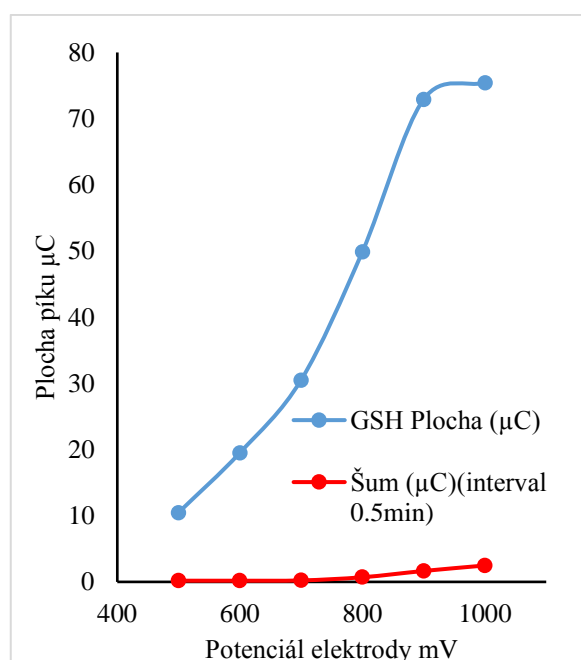
7.3 Vyhodnocení HPLC – ED analýzy

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie byla rovněž jako předchozí metody vyhodnocena pomocí kalibrační křivky. Jako standard byl použit GSH. Po vytvoření regresní přímky a rovnice regrese byly dosazeny průměrné hodnoty absorbance a byl proveden přepočítání dle použitého ředění, tedy 1:9. Výsledky byly vyjádřeny v $\mu\text{g/ml}$. U této metody se nepočítala směrodatná odchylka. Průměrné hodnoty jsou znázorněny v tabulce č. 5.

Před samotnou analýzou byl ještě proveden test stability GSH, ve kterém byla zvolena hodnota potenciálu elektrody 900 mV (*Obr. č. 12*). Se zvyšujícími se hodnotami potenciálu byl zvyšován i šum a také byly zhoršovány podmínky pro kolonu, proto výsledná hodnota 900 mV byla nejvhodnější.

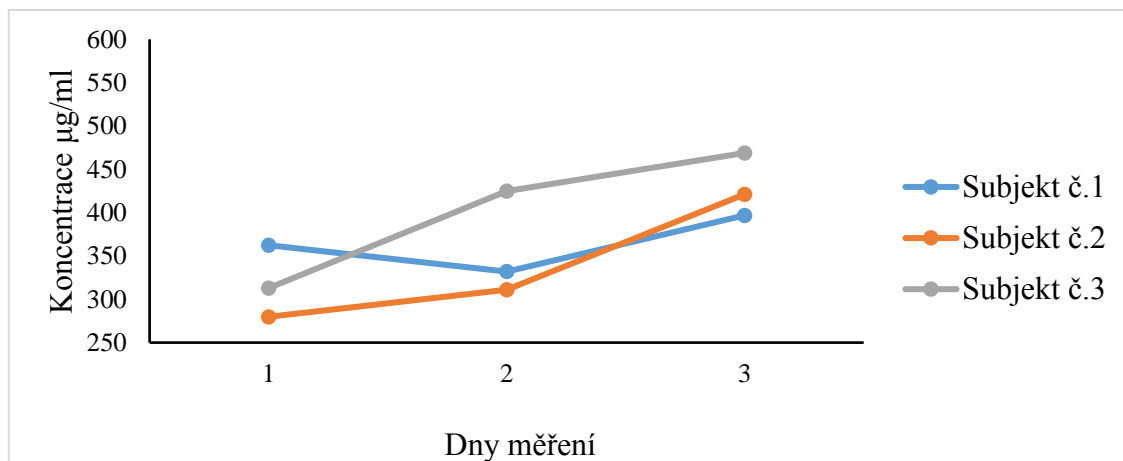
Tabulka č. 4: Průměrné hodnoty GSH

Výsledné hodnoty HPLC metody po přepočtu na ředění ($\mu\text{g/ml}$)			
	Pondělí	Středa	Pátek
Subjekt č.1	362,38	331,92	396,87
Subjekt č.2	279,77	311,15	421,19
Subjekt č.3	312,88	424,64	468,86
Subjekt č.4	433,70	448,34	406,70
Subjekt č.5	340,39	434,49	388,11
Subjekt č.6	393,15	468,86	517,19
Subjekt č.7	391,30	441,95	497,83
Subjekt č.8	301,35	335,01	398,88
Subjekt č.9	344,19	556,12	565,93
Subjekt č.10	399,90	524,20	504,40

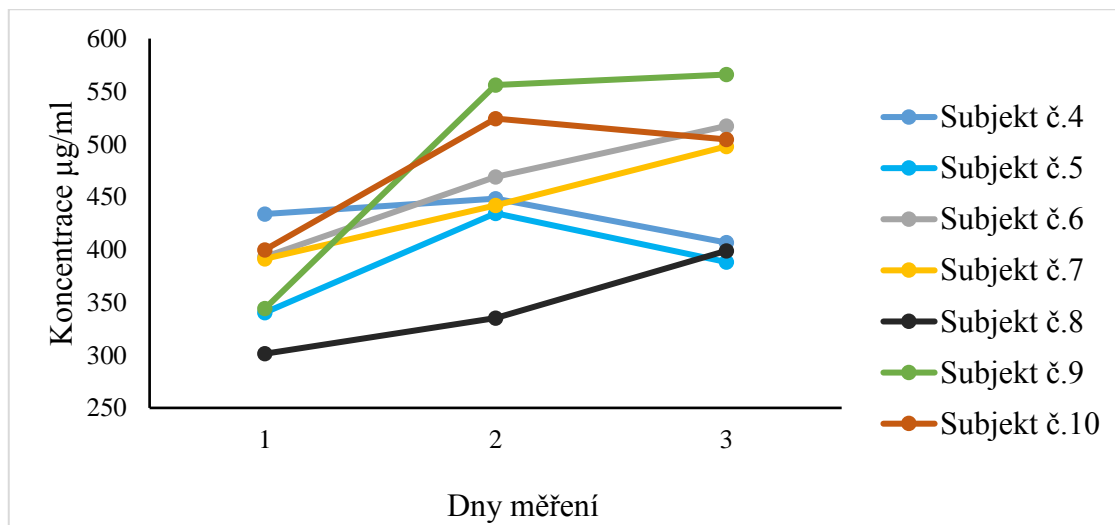


Obr. č. 12: Grafické znázornění testu stability GSH

Pro vyhodnocení bylo opět použito grafické znázornění rozdělené na muže a ženy. To můžeme vidět na obrázcích 13 a 14. V grafech je znázorněna koncentrace GSH v krvi. Původně měl být stanovován i obsah oxidované formy GSH, a to disulfidu GSSG, ale díky malému množství testovaného vzorku byly jeho hodnoty pod limitem detekce. Proto také nebyly zahrnuty do experimentální části.



Obr. č. 13: Celkové množství GSH – ženy (HPLC – ED analýza)



Obr. č. 14: Celkové množství GSH – muži (HPLC – ED analýza)

Na obrázku č. 13 můžeme sledovat, že došlo k vzestupu hladiny GSH v krvi testovaných žen. Pouze u subjektu č. 1 došlo k poklesu a následnému vzrůstu hodnot. Nejlepší výsledek vykazuje subjekt č. 3, kde došlo k vzrůstu obsahu GSH o 155,98 µg/ml a nárůst byl poměrně stabilní, bez větších výkyvů. Subjekt č. 2 dopadl také dobře, zde došlo ke zvýšení koncentrace o 141,42 µg/ml.

U převážné většiny testovaných mužů také docházelo k vzestupu GSH v krvi. Nárůst a následný mírný pokles byl zaznamenán u subjektů č. 4, 5 a 10. Nejvyšší rozdíl v koncentraci GSH byl u muže č. 9 a to celkem o 221,74 µg/ml. Nejvyrovnanější nárůst koncentrace byl zjištěn u subjektů č. 6, 7 a 8.

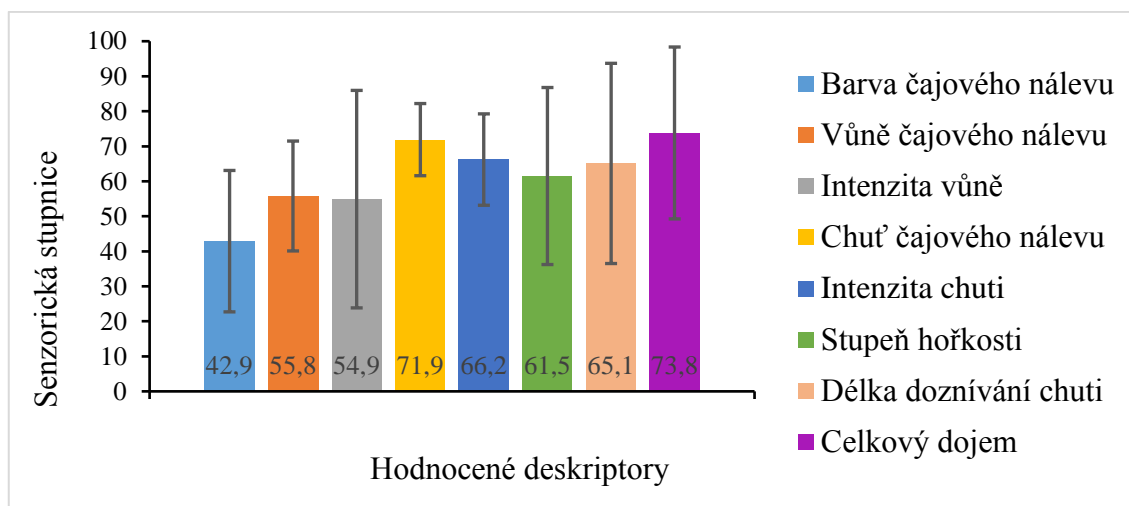
Ze získaných výsledků můžeme usuzovat, že konzumace zeleného čaje má pozitivní vliv na zvýšení koncentrace GSH v krvi. U mužů byl obsah GSH nepatrně vyšší než u žen již na začátku testování, v průměru o 15,5 %, na konci měření byl obsah vyrovnaný. Také zde dle našich výsledků záleží na pohlaví, neboť u některých mužů docházelo k poklesu koncentrace.

Zvyšování obsahu GSH je pozitivní, jelikož tak dochází také ke zvýšené inaktivaci reaktivních radikálů a rychlejší regeneraci v krvi, což potvrzuje článek Monostoriho a jeho kolegů [57]. Pokud by se naopak koncentrace GSH snižovala, značilo by to narušení antioxidantního systému organismu, jak je zmíněno ve studii z roku 2007 [58]. Jiná studie také prokázala, že množství GSH v krvi je ukazatelem náchylnosti k onemocnění a celkového zdravotního stavu. Rozdíly v koncentraci GSH mohou být také zapříčiněny rozdílnou aktivitou hemoglobinu jednotlivců, neboť GSH s ním částečně interaguje. Tato studie také tvrdí, že nejsou pozorovány žádné významné rozdíly v hodnotách GSH v závislosti na věku či pohlaví [59].

Hodnoty GSH se podobají hodnotám z Ellmanovy metody, které jsou uvedeny výše. GSH také obsahuje SH skupinu, takže podobnost výsledků může odkazovat na správně provedené metody a také potvrzuje, že konzumace zeleného čaje zvyšuje obsah těchto látek v krvi, což je potvrzeno také výše uvedenými studiemi.

7.4 Vyhodnocení senzorické analýzy

Senzorická analýza byla provedena za účelem zisku informací o chuťové přijatelnosti testovaného čaje. Všichni testovaní provedli senzorické hodnocení jednotlivých parametrů anonymně. Po skončení senzorického hodnocení bylo provedeno grafické zpracování dat. Výsledné hodnoty jednotlivých deskriptorů byly zprůměrovány a byly vypočítány směrodatné odchylky. Grafické znázornění výsledných hodnot můžeme vidět na obrázku 15.



Obr. č. 15: Výsledky orientační sensorické analýzy

Ze získaných výsledků můžeme usuzovat, že celkový sensorický profil hodnoceného zeleného čaje byl lehce nad průměrem. Nejhůře hodnocena byla barva čajového nálevu, která se většině hodnotitelů zdála spíše zakalená. Vůně a její intenzita byla průměrná, některým jedincům se mohla zdát spíše nepříjemná. U tohoto deskriptoru byla hodnocena i přítomnost cizích pachů a jejich identifikace. Pět hodnotitelů potvrdilo cizí pach a všichni se shodli na tom, že jim připomíná seno. Jak je však uvedeno v teoretické části práce, pach po seně je pro některé druhy Japonských zelených čajů typický. Testovaný čaj byl ale vyroben ve Velké Británii a země původu není na obale specifikována, takže se můžeme pouze domnívat, odkud čaj pochází. Také byla zaznamenána u intenzity vůně nejvyšší směrodatná odchylka, a to 31,06.

Chuť čajového nálevu dosáhla téměř nejvyšší hodnoty, pro konzumenty byla vcelku uspokojivá a příjemná. Také zde byla naměřena nejmenší směrodatná odchylka, a to 10,31. I u tohoto deskriptoru byla hodnocena cizí příchut' a její případná identifikace. Dva hodnotitelé potvrdili cizí chuť, jeden z nich cítil seno, druhý suchou trávu. Intenzita chuti byla poněkud slabší, méně výrazná.

Co se hořkosti týče, výsledné hodnoty byly kladné, výluh nebyl hodnocen jako příliš hořký. Délka doznívání chuti byla také spíše pozitivní, nebyla ani příliš krátká, ani nepříjemně dlouhá.

Celkový dojem z výluhu byl hodnocen 73,8 body, což je nadprůměrná hodnota. Můžeme tedy usuzovat, že po sensorické stránce je testovaný zelený čaj relativně přijatelný, i když směrodatná odchylka vyšla poměrně vysoká, a to 24,5.

8 ZÁVĚR

Lidský organismus je dennodenně vystavován působení reaktivních radikálů, které mohou vést ke vzniku oxidativního stresu. Lze tomu zabránit pravidelným příjmem antioxidantů stravou, protože lidský antioxidační systém nedokáže sám udržet oxidačně – redukční rovnováhu těla. K přírodním látkám pro podpoření antioxidační aktivity se řadí například zelený čaj, pro svůj vysoký obsah polyfenolických látek, zejména EGCG.

V literární části této práce byl vytvořen přehled účinných látek zeleného čaje, jeho výroba a zdravotní výhody. Byl vytvořen také stručný přehled základních antioxidantů a charakteristika volných radikálů. V praktické části byl sledován účinek vybraného zeleného čaje na antioxidační stav lidského organismu. Vzorkem pro analýzy byla kapilární krev deseti dobrovolníků. Stanoven byl celkový obsah bílkovin pomocí Bradfordovy metody, celkový obsah SH skupin Ellmanovou metodou a v neposlední řadě obsah GSH pomocí HPLC – ED analýzy. Na závěr byla provedena orientační senzorická analýza.

Původně měla být stanovena namísto HPLC – ED analýzy celková antioxidační kapacita pomocí metody TEAC. S tou však byly během stanovení problémy, metoda nebyla spolehlivá a výsledky nebyly dostačující, proto byla nakonec zvolena již zmiňovaná a ověřená HPLC – ED analýza. Výsledky z této analýzy byly uspokojivé, a lze na nich také pozorovat vzájemný vztah mezi hodnotami GSH a celkovými SH skupinami.

Ze získaných výsledků je pak možné odvodit, že zelený čaj nemá podstatný vliv na obsah bílkovin v krvi, zatímco na obsah látek s SH skupinou, včetně GSH, už ano. Při pravidelné konzumaci zeleného čaje docházelo k nárůstu hodnot těchto látek, které pozitivně ovlivňují antioxidační aktivitu, což je také uvedeno v odborné literatuře. Senzorickým dotazníkem bylo hodnoceno 8 deskriptorů. Analyzovaný čaj byl ve většině případů hodnocen lehce nadprůměrně, nejhůře dopadla barva čajového nálevu. Celkový dojem byl však uspokojivý.

V této práci tedy bylo prokázáno, v porovnání s odbornou literaturou, že pravidelné užívání zeleného čaje přispívá ke zvýšení látek s antioxidačním účinkem v krvi, zejména látek obsahujících SH skupiny. Je doporučováno přijmout 240 – 320 mg polyfenolů denně, což odpovídá 2 – 3 šálkům čaje [60]. Je tedy možné říci, že konzumace zeleného čaje je zdraví prospěšná a přináší s sebou spoustu dalších pozitivních aspektů.

9 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] UDALL, K. G. *Green Tea: Fight Cancer, Lower Cholesterol, Live Longer*. Woodland Pub, 1998. 28 s. ISBN 9781580540247.
- [2] HONEJ, P. Čajovník čínský. *Encyklopedie psychotropních rostlin* [online]. [cit. 18. 12. 2016]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/enpsyro/pj3rcaj.html>.
- [3] CAMPBELL, D. *The Tea Book* [online]. Pelican Publishing, 1995 [cit. 10. 1. 2017]. 9781455612796.
- [4] BURDA, A. *O kávě, čaji a dalších nápojích*. Praha: Carter/reproplus s.r.o., 2013. 83 s. ISBN 978-80-87613-00-9.
- [5] DANKOVÁ, Z. Čaj: Čajovník a zelený čaj. *Epoch times* [online]. [cit. 18. 12. 2016]. Dostupné z: <http://www.epochtimes.cz/2009120711748/Caj-Cajovnik-a-zeleny-caj.html>.
- [6] THOMOVÁ, S. et al. *Příběh čaje*. Praha: Argo, 2002. 400 s. ISBN 80-7203-447-2.
- [7] MARTIN, L. C. *Tea: The Drink that Changed the World*. Tuttle Publishing, 2011. 256 s. ISBN 9781462900138.
- [8] SABERI, H. *Tea: A Global History*. Reaktion Books, 2010. 183 s. ISBN 9781861898920.
- [9] TEUFL, C. *Zelený čaj - elixír zdraví*. Praha: Metramedia, 2000. 95 s. ISBN 80-238-5536-0.
- [10] BRZOŇOVÁ, L. *Jak poznáme kvalitu? Čaj* [online]. Praha: Česká technologická platforma pro potraviny, 2016 [cit. 11. 4. 2017]. ISBN 978-80-87719-38-1.
- [11] MUIRHEAD, W. E. *Green Tea - It's Hidden Benefits*. CreateSpace Independent Publishing Platform, 2008. 56 s. ISBN 9781438268309.
- [12] HARA, Y. *Green Tea: Health Benefits and Applications*. CRC Press, 2001. 230 s. ISBN 9780203907993.
- [13] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*. Tábor: Osis, 1999. 328 s. ISBN 80-86659-01-1.

- [14] GAUR, S. a AGNIHOTRI, R. Green tea: A novel functional food for the oral health of older adults. *Geriatrics gerontology* [online]. [cit. 19. 12. 2016]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ggi.12194/epdf>.
- [15] WACHENDORFOVÁ, V. V. *Čaj*. Praha: Slovart, 2007. 96 s. ISBN 978-80-7209-922-1.
- [16] KARORI, S. M. et al. Antioxidant capacity of different types of tea products. *African Journal of Biotechnology*, 2007, Vol. 6. ISSN 1684–5315.
- [17] WAL, V. D. S. *Sustainability Issues in the Tea Sector: A Comparative Analysis of Six Leading Producing Countries*. Amsterdam: SOMO, 2008. 110 s. ISBN 978-90-71284-23-6.
- [18] *Vyhláška č. 330/1997 Sb., kterou se provádí §18 písm. a), d), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro čaj, kávu a kávoviny*. *Zákony pro lidi*. [online]. [cit. 12. 11. 2016]. Dostupné z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-330>
- [19] HO, C. T. et al. *Tea and Tea Products: Chemistry and Health-Promoting Properties*. CRC Press, 2008. 320 s. ISBN 9781420008036.
- [20] HEISS, R. J. Oxidation and fermentation in tea manufacture [online] *Ten Speed Press* 2007, [cit. 11. 4. 2017], s. 5. Dostupné z: <http://the-leaf.org/issue%202/wp-content/uploads/2008/03/oxidation-fermentation-in-tea-manufacture-single-page-layout.pdf>.
- [21] CHANG, K. World tea production and trade: Current and future development [online]. 2015, [cit. 12. 4. 2017], s. 13. Dostupné z: <http://www.fao.org/3/a-i4480e.pdf>.
- [22] JAIN, N. K. et al. *Protective Effects of Tea on Human Health*. CABI Pub., 2006. s. ISBN 9781845931131.
- [23] ŠEBELOVÁ, K. Čaj: Zázračné účinky zeleného čaje. *Epoch times* [online]. [cit. 18. 12. 2016]. Dostupné z: <http://www.epochtimes.cz/20060428419/Caj-Zazracne-ucinky-zeleneho-caje.html>.
- [24] ŠTEFÁNEK, J. Oxidační stres. *Medicína, nemoci, studium na 1. LK UK* [online]. [cit. 13. 11. 2016]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/>.

- [25] CHARLES, D. J. *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*. New York: Springer, 2013. 612 s. ISBN 978-1-4614-4310-4.
- [26] DOSTÁLEK, M. Oxidativní stres, biomarkery oxidativního stresu. *Postgraduální medicína* [online]. [cit. 12. 11. 2016]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/oxidativni-stres-biomarkery-oxidativniho-stresu-300319>.
- [27] HOLEČEK, V. Volné radikály, antioxidanty a jak dále? [online]. *Klinická biochemie a metabolismus* 2006, sv. 3, [cit. 11.1. 2017]. Dostupné z: <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-140.pdf>.
- [28] CADENAS, E. a PACKER, L. *Handbook of Antioxidants: Second Edition*. CRC Press, 2001. 732 s. ISBN 978-0-8247-0547-3.
- [29] OH, J. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*, 2013, sv. 31, č. 2, s. 403-409. ISSN 0956-7135.
- [30] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. Tábor: OSSIS, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.
- [31] BABIČKA, L. Přídavné látky v potravinách. [online]. 2012, [cit. 10. 1. 2017]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/publikace/P%C5%99%C3%ADdatn%C3%A9%A9%20%C3%A1tky%20v%20potravin%C3%A1ch%20PK.pdf>. ISSN 978-80-905096-3-4.
- [32] RACEK, J. *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. 1. vydání. Praha: Galén, 2003. 90 s. ISBN 80-726-2231-5.
- [33] HOLEČEK, V. Volné radikály a antioxidanty. [online]. [cit. 11. 1. 2017]. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/volne-radikaly-a-antioxidanty-mudr-vaclav-holecek-csc.htm#ixzz4VRY7DkKp>.
- [34] DING, M. Z. a ZOU, J. K. Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils. *Food Chemistry*, 2012, sv. 131, č. 3, s. 1051-1055. ISSN 0308-8146.

- [35] ŠKRAMLÍKOVÁ, J. Antioxidanty jak je známe i neznáme. [online]. [cit. 11. 4. 2017]. Dostupné z: <https://skramlikova.wordpress.com/2011/05/23/antioxidanty-jak-je-zname-i-nezname/>.
- [36] RICE-EVANS, C. A. a PACKER, L. *Flavonoids in Health and Disease, Second Edition*. CRC Press, 2003. 504 s. ISBN 9781439858110.
- [37] SZALAY, J. What are flavonoids? [online]. [cit. 12. 1. 2017]. Dostupné z: <http://www.livescience.com/52524-flavonoids.html>.
- [38] SINGH, M. et al. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, sv. 84, s. 206-239. ISSN 0223-5234.
- [39] SZALAY, J. What are Carotenoids? [online]. [cit. 12. 1. 2017]. Dostupné z: <http://www.livescience.com/52487-carotenoids.html>.
- [40] CHEN, D. F. et al. Specific roles of tocopherols and tocotrienols in seed longevity and germination tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Science*, 2016, sv. 244, s. 31-39. ISSN 0168-9452.
- [41] MARGARITELIS, N. V. Antioxidants as therapeutics in the intensive care unit: Have we ticked the redox boxes? *Pharmacological Research*, 2016, sv. 111, s. 126-132. ISSN 1043-6618.
- [42] LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health [online]. *Pharmacognosy Review* 2010, sv. 4-8, [cit. 11. 1. 2017]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249911/>.
- [43] ZITKA, O. et al. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology Letters*, 2012, sv. 4, č. 6, s. 1247-1253. ISSN 1792-1074.
- [44] LAPENNA, D. et al. Glutathione metabolic status in the aged rabbit aorta [online]. *Experimental Gerontology* 2017, sv. 91, [cit. 15. 3. 2017], s. 34 - 38. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531556516302546>.
- [45] SENTELLAS, S. et al. GSSG/GSH ratios in cryopreserved rat and human hepatocytes as a biomarker for drug induced oxidative stress. *Toxicology in Vitro*, 2014, sv. 28, č. 5, s. 1006-1015. ISSN 0887-2333.

- [46] LUSHCHAK, V. I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*, 2012, sv. 2012, s. 26.
- [47] TOWNSEND, D. M. et al. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2003, sv. 57, č. 3-4, s. 145-155. ISSN 0753-3322.
- [48] Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. *Zákony pro lidi*. [online]. [cit. 10. 1. 2017]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-4>
- [49] KARASOVÁ J. Ž. et al. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů [online]. *Chemické listy* 2010, sv. 104, [cit. 3. 3. 2017], s. 46 - 50. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_01_46-50.pdf.
- [50] WENRICH, B. R. a TRUMBO, T. A. Interaction of nucleic acids with Coomassie Blue G-250 in the Bradford assay. *Analytical Biochemistry*, 2012, sv. 428, č. 2, s. 93-95. ISSN 0003-2697.
- [51] ZITKA, O. et al. Phytochelatin synthase activity as a marker of metal pollution. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, sv. 192, č. 2, s. 794-800. ISSN 0304-3894.
- [52] PAULOVÁ, H. et al. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro [online]. *Chemické listy* 2004, sv. 98, [cit. 3. 3. 2017], s. 176 - 179. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf.
- [53] DUFRESNE, C. J. a FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2001, sv. 12, č. 7, s. 404-421. ISSN 0955-2863.
- [54] HYMAN, L. M. a FRANZ, K. J. Probing oxidative stress: Small molecule fluorescent sensors of metal ions, reactive oxygen species, and thiols. *Coordination Chemistry Reviews*, 2012, sv. 256, č. 19-20, s. 2333-2356. ISSN 0010-8545.
- [55] WURZINGER, S. et al. Interdependency of the oxidizability of lipoproteins and peroxidase activity with base excess, HCO₃, pH and magnesium in human venous and capillary blood. *Life Sciences*, 2006, sv. 78, č. 15, s. 1754-1759. ISSN 0024-3205.

- [56] STEIN, D. F. et al. Gene expression profiles are different in venous and capillary blood: Implications for vaccine studies. *Vaccine*, 2016, sv. 34, č. 44, s. 5306-5313. ISSN 0264-410X.
- [57] MONOSTORI, P. et al. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2009, sv. 877, č. 28, s. 3331-3346. ISSN 1570-0232.
- [58] LEE, K. T. et al. Glutathione status in the blood and tissues of patients with virus-originated hepatocellular carcinoma. *Clinical Biochemistry*, 2007, sv. 40, č. 15, s. 1157-1162. ISSN 0009-9120.
- [59] KLEINMAN, W. A. et al. Protein glutathiolation in human blood. *Biochemical Pharmacology*, 2003, sv. 65, č. 5, s. 741-746. ISSN 0006-2952.
- [60] BRAVERMAN, J. How Much Green Tea Should You Drink Per Day? [online]. [cit. 11. 4. 2017]. Dostupné z: <http://www.livestrong.com/article/332904-how-much-green-tea-should-you-drink-per-day/>.

10 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Seznam obrázků:

Obr. č. 1: <i>Strukturní vzorce katechinů</i>	12
Obr. č. 2: <i>Strukturní vzorce kyseliny gallové a kyseliny kávové</i>	13
Obr. č. 3: <i>Strukturní vzorce flavonoidů</i>	26
Obr. č. 4: <i>Strukturní vzorce tokoferolů a tokotrienolů</i>	27
Obr. č. 5: <i>Strukturní vzorce β – karotenu a kyseliny askorbové</i>	28
Obr. č. 6: <i>Kalibrační křivka – Ellmanova metoda</i>	35
Obr. č. 7: <i>Celkový obsah thiolových skupin – ženy (Ellmanova metoda)</i>	36
Obr. č. 8: <i>Celkový obsah thiolových skupin – muži (Ellmanova metoda)</i>	36
Obr. č. 9: <i>Kalibrační křivka – Bradfordova metoda</i>	37
Obr. č. 10: <i>Celkové množství proteinů – ženy (Bradfordova metoda)</i>	38
Obr. č. 11: <i>Celkové množství proteinů – muži (Bradfordova metoda)</i>	38
Obr. č. 12: <i>Grafické znázornění testu stability GSH</i>	40
Obr. č. 13: <i>Celkové množství GSH – ženy (HPLC – ED)</i>	41
Obr. č. 14: <i>Celkové množství GSH – muži (HPLC – ED)</i>	41
Obr. č. 15: <i>Výsledky orientační sensorické analýzy</i>	43

Seznam tabulek:

Tabulka č. 1: <i>Členění druhů čaje na skupiny a podskupiny</i>	15
Tabulka č. 3: <i>Fyzikální a chemické požadavky na jakost čaje</i>	15
Tabulka č. 2: <i>Smyslové požadavky na jakost čaje</i>	16
Tabulka č. 4: <i>Průměrné hodnoty glutathionu</i>	40

11 SEZNAM ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
BHA	butylhydroxyanisol
BHT	butylhydroxytoluen
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)
CBB	Coomasie Brilliant Blue G – 250
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTNB	kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
ECG	epikatechin gallát
EGC	epigallokatechin
EGCG	epigallokatechin gallát
GC	gallokatechin
γ – GLCL	glutamát – cystein ligáza
GSH	glutathion
GSSG	disulfid glutathionu
HBA	kyselina hydroxybenzoová
HCA	kyselina hydroxyskořicová
HPLC – ED	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
SH	thiolové
TBHQ	terciální butylhydrochinon
TEAC	celková antioxidační kapacita
TFA	kyselina trifluoroctová
TNB ⁻	5-merkpto-2-nitrobenový anion

12 PŘÍLOHY

Příloha č. 1 – Senzorický dotazník

SENZORICKÉ HODNOCENÍ ZELENÉHO ČAJE

Pohlaví:

Zdravotní stav:

Datum:

Úkol: Ochutnejte několikrát po sobě předložený vzorek a ohodnoťte jej v následujícím pořadí: barva, vůně, intenzita vůně, chuť, intenzita chuti, stupeň hořkosti, délka doznívání chuti, celkový dojem. Při hodnocení používejte jako neutralizátor chuti přiložené pečivo. Barvu hodnoťte proti bílému pozadí. Vaše poznatky zaznačte do níže uvedených grafických stupnic.

1. Barva čajového nálevu (průzračný, barva jasná, čirá, žlutozelená)

Vzorek:

Zakalená

Čirá

2. Vůně čajového nálevu (čistá, bez vedlejších zápachů, květinové, či ovocné tóny)

Vzorek:

Nepříjemná

Příjemná

Cizí pach: ANO/NE

Identifikace:

3. Intenzita vůně

Vzorek:

Nevýrazná

Intenzivní

4. Chuť čajového nálevu (typická, nasládlá, nemá být mdlá nebo naopak svíravá, příliš trpká a hořká)

Vzorek:

Nepříjemná

Příjemná

Cizí příchut': ANO/NE

Identifikace:

5. Intenzita chuti čajového nálevu

Vzorek:

Nevýrazná

Intenzivní

6. Stupeň hořkosti

Vzorek:

Silná hořkost

Slabá hořkost

7. Délka doznívání chuti

Vzorek:

Krátká

Dlouhá

8. Celkový dojem

Vzorek:

Nevyhovující

Vynikající