

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální chemie**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2011

Andrea Chytilová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální chemie**

Vysokotlaké extrakce antioxidantů ze zeleného čaje

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:	Andrea Chytilová
Studijní obor:	Aplikovaná chemie
Vedoucí bakalářské práce:	RNDr. Pavlína Baizová, Ph.D.

Olomouc 2011

Souhrn

Tato práce se zabývá srovnáním vysokotlakých extrakčních technik aktivních látek zeleného čaje, zejména superkritické fluidní extrakce a zrychlené extrakce rozpouštědlem. Hlavní pozornost je zaměřena na extrakci epigalokatechin-3-galátu ze zeleného čaje. Pro analýzu byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s MS detekcí.

Úvod práce je věnován charakteristice zeleného čaje, jako je pěstování, zpracování, příprava a jeho dělení. Podrobně jsou popsány látky v zeleném čaji obsažené i jejich účinky na zdraví člověka. Zvláštní kapitola je věnována epigalokatechin-3-galátu a jeho antioxidačním a léčivým schopnostem.

V experimentální části jsou popsány vysokotlaké extrakce vzorků zeleného čaje za různých podmínek. Při SFE byly extrahovány vzorky SC-CO₂ bez modifikátoru a s přídavkem modifikátoru (methanol, ethanol) a byl sledován vliv teploty na účinnost extrakce. V případě ASE byla volena různá rozpouštědla a extrakční čas.

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout poznatky týkající se vysokotlakých extrakcí a porovnat superkritickou fluidní extrakci se zrychlenou extrakcí rozpouštědlem.

Summary

This thesis deals with the comparison of high-pressure extraction techniques of active substances from green tea, particularly supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction. The main attention was focused on the extraction of epigallocatechin-3-gallate from green tea. High performance liquid chromatography (HPLC) with MS detection was used for analysis of extracts from green tea leaves.

The introduction consists of characteristic of green tea, such as growing, processing, preparation and division. In detail, there are described substances contained in green tea and their effects on human health. A special chapter is devoted to the epigallocatechin-3-gallate and its antioxidant and healing abilities.

In the experimental part, high-pressure extractions of green tea samples were described under the different conditions. Samples with pure CO₂ and with addition of modifier extracted by SFE were compared and furthermore effect of temperature was investigated. In case of ASE, an effect of solvent and extraction time was observed.

The aim of this work was to unite the information concerning the high-pressure extractions and also compare the supercritical fluid extraction with accelerated solvent extraction.

Děkuji své vedoucí bakalářské práce RNDr. Pavlíně Baizové, Ph.D. za odborný dohled, cenné rady a čas, který věnovala mé bakalářské práci. Poděkování patří rovněž Doc. RNDr. Janu Hrbáčovi, Ph.D. za poskytnutí standardu EGCG, Doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph.D. za pomoc a rady při HPLC analýze vzorků a mé rodině za pochopení, podporu a trpělivost po celou dobu mého studia.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Pavlíny Baizové, Ph.D. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci použila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že je práce prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

podpis

studenta

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů

1. Úvod	1
2. Teoretická část	2
2.1 Historie	2
2.2 Zelený čaj	3
2.2.1 Čajovník, pěstování	4
2.2.2 Zpracování zeleného čaje	5
2.2.3 Příprava zeleného čaje	6
2.2.4. Dělení zeleného čaje	6
2.2.5 Volné radikály a antioxidanty	7
2.2.6 Co obsahuje zelený čaj	8
2.3 Epigalokatechin-3-galát (EGCG)	13
2.4 Další významné katechiny	14
2.5 Účinky zeleného čaje na zdraví člověka	15
2.6 Vysokotlaké extrakce	17
2.6.1 Superkritická fluidní extrakce (SFE)	17
2.6.2 Zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE)	19
2.6.3 Studie zabývající se vysokotlakými extrakcemi katechinů ze	
zeleného čaje	21
2.6.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	22
3. Experimentální část	24
3.1 Přístrojové vybavení	24
3.2 Chemikálie	25
3.3 Pracovní postup	26
4. Výsledky a diskuze	30
5. Závěr	38
6. Seznam použité literatury	39

Seznam použitých zkratk a symbolů

EGCG	epigalokatechin-3-galát
EGC	epigalokatechin
ECG	epikatechin galát
EC	epikatechin
C	katechin
SFE	superkritická fluidní extrakce
SCF	superkritická tekutina
SC-CO ₂	superkritický oxid uhličitý
ASE	zrychlená extrakce rozpouštědlem
MF	mobilní fáze
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometr

1. Úvod

Po staletí je čaj konzumován čínskou a japonskou populací a je to patrně druhý, po vodě nejkonzumovanější nápoj asijské společnosti, kde je pití čaje záležitostí kultury a meditativního životního stylu. Postupně se rozšiřoval i do dalších zemí a dnes se již pije po celém světě.

Existuje mnoho druhů čajů. Všechny se ale vyrábějí z jedné rostliny, čajovníku čínského. Jednotlivé druhy vznikají nepatrnými rozdíly ve zpracování, z nichž nejběžnější tři jsou čaj zelený, oolong a černý. V této práci se však budeme zabývat pouze čajem zeleným a extrakčními metodami antioxidantů v něm obsažených.

Oblíbenost zeleného čaje je založena na jeho lahodné chuti a léčivých schopnostech, za které vděčí obsahu polyfenolů, obzvláště katechinů, jejichž účinky na lidský organismus a léčbu různých chorob jsou velmi širokospektré. Prospívá totiž téměř všem orgánům, neboť posiluje imunitu, čímž zabraňuje virovým a bakteriálním nákazám. Také brání vzniku a rozvoji rakoviny, snižuje krevní tlak a hladinu cholesterolu v krvi, a tak snižuje riziko infarktu a mozkové mrtvice. Dokonce předchází tvorbě zubního kazu¹. V Číně a Japonsku je považován za pramen věčného mládí.

2. Teoretická část

2.1 Historie

Zelený čaj je užíván jako léčivé tonikum a elixír života už více než 4000 let. Je to jedna z mála rostlin s tak dlouhou a zajímavou historií. Kořeny tohoto čaje leží v Číně. Spadají do doby přibližně 2737 př. n. l., kdy se v čínské lékařské knize objevuje první písemná zmínka o čaji jako o léčivém nápoji. Trvalo několik století, než se přišlo na další možnosti jeho využití. Myšlenka, že je možné si čaj jen tak vychutnávat, se objevila teprve kolem roku 400 př. n. l.¹⁻⁵ Až v roce 350 n. l. se poprvé objevuje v čínském slovníku způsob přípravy čaje. V té samé době začali čínští pěstitelé se zdokonalováním techniky pěstování této rostliny¹. Japonská čajová historie začíná v roce 810 n. l. s příchodem dvou mnichů, kteří propašovali semínka čajovníku z Číny do Japonska. Oficiálně a ve velkém množství se začal čajovník do Japonska dovážet ve 12. století z Číny a začal se z něj vyrábět výhradně jen zelený čaj³. Ve 14. století pronikly zprávy o tomto nápoji i do Evropy. Jako první si čaj získal oblibu v Holandsku, odkud se rozvážel do jiných zemí. Do Anglie dorazily zásilky čaje teprve v letech 1652 až 1654. Čaj byl zpočátku velice drahým zbožím, jakousi výstředností, kterou si mohla dovolit pouze šlechta nebo skutečně bohatí obchodníci. Když se však Anglie zapojila do obchodování s čajem, zvýšil se i rozsah obchodu, a to vyústilo v soupeření mezi různými flotilami Evropy a Ameriky. Tak se čaj pozvolna přibližoval i středním vrstvám obyvatelstva. Také v Rusku znali čaj až v 17. století, kde se stal rychle oblíbeným. Rusové začali úspěšně vysazovat čajovníky v oblasti Kavkazu. Od poloviny 19. století začali Angličané pěstovat čaj na plantážích svých kolonií – Indie a Cejlonu (Srí Lanky). Na Cejlonu byla roku 1869 plísňí zničena celá úroda kávy, místo které se zde začal pěstovat čaj. V této době došlo k velkému rozmachu čaje černého^{1, 5}.

Čajové plantáže byly postupně budovány na Tchaj-wanu, Sumatře, Jávě, v Jižní Africe a na mnoha dalších místech. Čaj se stal významným obchodním artiklem a celosvětovým kulturním fenoménem⁶.

2.2 Zelený čaj

Zelený čaj je obvykle světle zelené nebo žluté barvy. Je to nápoj s alkalickou povahou, který působí proti překyselení. Na rozdíl od čaje černého (Obr. 1) neprochází fermentací, což je určitý druh kvašení, při kterém jsou čajové lístky vystaveny působení kyslíku ze vzduchu. Během fermentace dochází v čaji k přeměně jeho účinných látek. Zelený čaj si díky přerušení tohoto kvasného procesu ponechává svou léčivou sílu v plném rozsahu^{1, 2, 4, 7}.

Označení čaje podle stupňů fermentace

černý – plně fermentovaný

modrozelený (oolong) – částečně fermentovaný

bílý – lehce fermentovaný, někdy i nefermentovaný

žlutý – speciálně fermentovaný, někdy označované jako nefermentovaný

zelený – nefermentovaný^{4, 6, 7}

Oproti černému čaji obsahuje zelený čaj také menší množství kofeinu a na druhou stranu asi čtyřikrát více vázaných tříslovin, takzvaných polyfenolů, které jsou odpovědné za účinnost čaje v prevenci a léčení různých chorob^{2, 5}.



Obr. 1. Zelený čaj – vlevo, černý čaj – vpravo (převzato z cit.⁸)

2.2.1 Čajovník, pěstování

Jelikož byl divoce rostoucí čajovníkový keř dosud objeven pouze v Číně a Assamu, jsou známy pouze dvě odrůdy čajovníku, které se od sebe liší velikostí listů. *Camellia sinensis* (čajovník čínský (Obr. 2)), jež je původní rostlinou zeleného čaje, avšak získává se z něj i černý a bílý čaj a také oolong. Druhá odrůda je *Camellia assamica* (čajovník assámský (Obr. 3)), z něhož se získává téměř výhradně jen čaj černý^{1, 3, 7}.



Obr. 2. *Camellia sinensis* s úzkými a jemnými listy (převzato z cit.⁹)



Obr. 3. *Camellia assamica* s širokými listy (převzato z cit.¹⁰)

Rostlina, z níž se zelený čaj vyrábí, čajovník čínský, je z čeledi čajovníkovité (*Theaceae*), rodu čajovník (*Camellia*) a jako většina jeho zástupců má bílé květy podobné třešním (Obr. 4). Tato vytrvalá rostlina má celoročně zelené listy, pro něž jsou typické dobře viditelné stříbřité bílé chloupky na jejich spodní straně. Může dorůst do výšky 10 – 30 metrů a dožít se stovky let. Pro snadnější sklizeň lístků se čaj na plantážích pěstuje v podobě keře vysokého 1,2 metru^{3-5, 8}.



Obr. 4. Květ čajovníku (převzato z cit.¹¹)

Čajovníkům se daří nejlépe ve vyšších polohách s teplým a deštivým podnebím. Prospívají jim ranní mlhy, mírné teploty (okolo 18 °C) a bohaté srážky během celého roku. Ošetřované keře čajovníků dávají čaj až padesát let. Poprvé se z čajovníku může sklízet po třech letech od vysazení rostlinky. Preferuje se ruční sběr od strojového, který provádí ženy nejružnějšího stáří v době sezony po 10 až 15 dní. V Japonsku, Číně a na Tchaj-wanu, probíhá sklizeň od dubna do října nebo listopadu. Při ručním sběru se sklízí pouze mladé výhonky v podobě dvou lístků a jednoho pupenu. Za den sběračky sklídí úrodu 30 – 35 kg čerstvého čaje, z čehož se získá 7 – 9 kg čaje sušeného určeného ke spotřebě¹⁻³.

Čajovník se pěstuje v oblastech Asie, zejména v Číně, Japonsku, Indii, na Tchaj-wanu, v Indonésii, ve Vietnamu, v oblasti Kavkazu a na Srí Lance (dříve Cejlon). V dnešní době je pěstování rozšířeno také do některých zemí Afriky a Jižní Ameriky. Na celém světě se ročně vyrobí asi 2,5 milionu tun sušeného čaje, z čehož asi 20 % připadá na čaj zelený, téměř 2 % na oolong a asi 78 % na čaj černý. Čína je s více jak 400 tisíci tunami ročně největším producentem zeleného čaje^{1,3}.

2.2.2 Zpracování zeleného čaje

Rozdílnými způsoby zpracování lze z čajovníkových lístků zhotovit zelený i černý čaj. Zelený čaj prochází nejšetrnějším způsobem zpracování. Aby lístky z čajového keře zůstaly po očesání zelené, musí se přerušit proces fermentace deaktivováním fermentačních enzymů, které by jinak vyvolaly proces kvašení, čímž by ze zeleného čaje udělaly čaj černý s úplně jinou chutí a částečně velmi omezeným léčivým účinkem. Tento proces fermentace může být zastaven dvojím způsobem.

- Pražením (čínský způsob), při němž se čajové lístky vloží ihned po sklizni do plochých ocelových pánví nebo kovových bubnů, kde jsou vystaveny suchému žáru po dobu méně než jedné minuty. Pak se většinou ručně prohnětou a suší po dobu osmi až dvanácti hodin, a posléze se svinují. Takto zpracované čajové lístky se postupně prosévají několika různě hustými sítý, aby se roztřídily podle velikosti. S klesající velikostí lístků klesá kvalita čaje. Čajovým „prachem“, který po prosetí zbude, jsou plněny čajové sáčky.
- Napařováním (japonský způsob), při kterém jsou čerstvě sesbírané čajové lístky vystaveny na 20 – 40 vteřin vodní páře. Foukáním horkého vzduchu jsou pak lístky opatrně sušeny a nakonec slisovány. Čaj je sušen tak dlouho, dokud jeho průměrný obsah vlhkosti nedosáhne přibližně 3 % vlhkosti čerstvé rostliny. Na závěr jsou čajové lístky svinuty, prosety sítý a tříděny do jednotlivých sort^{1-3,5,6}.

2.2.3 Příprava zeleného čaje

K zelenému čaji se musíme chovat mnohem šetrněji než k čaji černému. Látky obsažené v zeleném čaji mají totiž mnohem volnější chemickou vazbu a v horké vodě se rozpustí rychleji a beze zbytku. Proto se nesmí louhovat příliš dlouho a je třeba jej zalít vodou o nižší teplotě (70 – 90 °C). Takovýto postup šetří jeho aromatické látky, které při velmi vysokých teplotách snadno vyprchají, a také zachovává vitaminy, aminokyseliny a enzymy, které jsou taktéž citlivé na teplotu².

2.2.4 Dělení zeleného čaje

Ve starověké Číně bylo známo více než 8 000 druhů zeleného čaje. Dnes jich je ale podstatně méně. Chuť čaje závisí na mnoha činitelích a těmi jsou plantáže (půda, počasí a další vlastnosti oblastí, kde se čaj pěstuje), způsoby pěstování, doba a způsob sběru, výběr a stupeň zralosti čajových lístků, rostliny rostoucí v blízkosti čajové plantáže a také způsob zpracování očesaných lístků^{2,3}.

Nejjednodušeji můžeme zelený čaj dělit na čínský a japonský, přičemž čínský má na rozdíl od japonského bledší zelenou barvu a odlišný způsob fermentace (pražením), kdežto japonský vyniká svojí trávovou příchutí, sytě zelenou barvou a k fermentaci dochází pomocí horké páry. Méně známé jsou potom ještě tchaj-wanské, indické, ceylonské a další čaje. Podrobnější dělení je dále možné podle oblastí pěstování v každé z těchto zemí¹⁻⁴.

2.2.5 Volné radikály a antioxidanty

Volné radikály jsou vysoce reaktivní molekuly a části molekul, které mají jeden nebo více nespárovaných elektronů. Volný radikál vezme elektron jiné molekule, takže této molekule začne elektron chybět a stane se tak volným radikálem. Ta zase odejme elektron z jiné molekuly, která se následně stane volným radikálem. Takto vzniká jakási řetězová reakce, kterou mohou zastavit antioxidanty. Nedojde-li k přerušení této reakce, dochází ke vzniku neškodného oxidu uhličitého, vody a energie. Pokud ale některý z volných radikálů z této reakce unikne, může poškodit molekuly v tělesných buňkách. Po nějaké době vede radikálové poškození těla k množství nemocí a předčasnému stárnutí buněk⁴.

Volné radikály jsou schopné škodit buňkám těla, pomáhají připravovat půdu pro rakoviny, nemoci srdce a mnoho dalších degenerativních onemocnění. Jedním z nejnebezpečnějších volných radikálů je singletový kyslík nebo superoxidový ion, který vzniká z peroxidu vodíku. Volné radikály se tvoří ze tří hlavních zdrojů: v těle, v okolním prostředí a z jiných volných radikálů. Jejich množství v těle se zvyšuje působením mnoha faktorů, počínaje stresem, přes toxické látky v okolním prostředí a UV záření, až po špatné stravovací návyky^{1, 4}.

Antioxidanty mají tu důležitou vlastnost, že mohou dodávat elektrony volným radikálům, čímž jsou schopny uhasit jejich reaktivitu a ukončit zhoubný řetězec radikálových reakcí. Takový antioxidant pak buď vstupuje znovu do reakce s jiným antioxidantem, aby se sám nestal volným radikálem, anebo může zůstat ve změněném stavu, nemá-li jeho nová struktura škodlivý vliv na jiné molekuly¹.

Antioxidační enzymy, které si tělo vytváří a antioxidační vitaminy, které přijímáme s potravou, nemohou dostatečně ochránit všechny tělesné buňky před poškozením v důsledku oxysličování. Proto nás dále zajímají antioxidační látky, které se nacházejí v rostlinách, včetně polyfenolů vyskytujících se v zeleném čaji, zvláště katechinů, jež mají mnohem vyšší antioxidační účinek než mnohé druhy ovoce nebo zeleniny, např. česnek, cibule, kapusta a další¹.

2.2.6 Co obsahuje zelený čaj

Některé rostliny obsahují látky, které mají silný účinek na lidské zdraví. Těmto látkám se někdy říká „rostlinné chemicky účinné látky“ nebo „fytolátky“. Rostliny je používají k vlastnímu přežití. Mnohé fytolátky v rostlinách působí jako enzymy, hormony, barviva nebo regulátory růstu. V čajovém listě je obsaženo kolem 400 nejrůznějších účinných látek. Čím jsou čajové lístky starší, tím méně těchto látek obsahují.

Látky obsažené v čaji k životu probouzí horká voda a jejich koncentraci ovlivňuje teplota vody, doba louhování, dávkování, místo sklizně, způsob zpracování a druh čaje.

Z farmakologického hlediska jsou nejzajímavější polyfenoly^{1-3,5}.

Polyfenoly

Polyfenoly obsahují jednu nebo více fenolových skupin. Tato velká skupina látek má řadu podskupin, mezi které patří flavonoidy, jež se zase dělí na další podskupiny, z nichž nejdůležitější jsou flavanoly neboli katechiny.

V zeleném čaji jsou polyfenoly obsaženy ve velkém množství (obsahují přibližně 30 % obsahu listů) a dávají tak čaji lehce svravou, trpkou až hořkou chuť. Mají silné antioxidační účinky, díky kterým působí preventivně proti vzniku rakoviny a srdečních onemocnění. Spolu s chlorofylem způsobují zbarvení čaje. Nejvíce je jich obsaženo v listovém pupenu a se stárnutím listů jich ubývá^{1,3,12}.

Flavonoidy

Flavonoidy jsou rostlinné pigmenty s antioxidačním účinkem, které mohou výrazně působit při prevenci a léčbě chorob jako jsou arterioskleróza a jiná kardiovaskulární onemocnění. Mohou vázat některé kovové ionty (železo, měď), brání peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, regenerují a zpevňují cévy¹³.

Katechiny

Strukturou jsou katechiny podobné flavonoidům (deriváty flavan-3-olu). Obecně mají tyto látky významnou antioxidační aktivitu na singletový kyslíkový radikál a brání peroxidaci tuků. Jsou také schopné inhibovat tvorbu tromboxanu a snižovat hladinu cholesterolu v krvi¹.

Taniny

Je to skupina jednoduchých a složených fenolů, polyfenolů a flavonoidů. Tyto látky zmírňují žaludeční problémy, zlepšují trávení a mají uklidňující účinek na centrální nervový systém, čímž působí proti účinkům kofeinu.

Jejich název je odvozen od nejznámější třísloviny – taninu (kyselina tříslová), který se naštěstí v čaji nenachází, neboť je zdraví škodlivý při požití, vdechnutí nebo při styku s kůží. Rostliny taniny produkují pro svoji ochranu před patogeny, zvěří a nepříznivým přírodním podmínkám. Na rozdíl od taninů ostatních rostlin, které jsou kvůli své vlastnosti srážet bílkoviny toxické, jsou taniny z čajovníku pro lidský organismus neškodné. To je způsobeno odlišnou chemickou strukturou^{12, 14}.

Purinové alkaloidy

Čajovník obsahuje v listech až 4,5 % kofeinu, doprovázeného theofylinem, theobrominem a xanthinem. Jsou to methylderiváty xanthinu (2,6-dioxypurinu) nazývané též purinové alkaloidy¹⁵.

Kofein

Kofein patří do skupiny chemických látek zvaných metylxantiny. Dříve byla tato látka v čaji označována jako „thein“, protože se lidé domnívali, že jde o jinou látku, než se nachází v kávovníku. Toto pojmenování se v odborné terminologii však již nepoužívá, neboť bylo zjištěno, že jsou molekuly kofeinu v kávě i čaji identické. Pouze vazby, kterými se kofein z čaje nebo kávy váže na jiné látky, jsou odlišné. Zůstaneme tedy u názvu kofein.

Tělo dokáže přijmout kofein z kávy rychleji než kofein z čaje. Po vypití kávy se účinek kofeinu dostaví relativně rychle, během asi 30 minut dosahuje maxima a v průběhu 2-3 hodin pak zase pozvolna odeznívá. Pokud pijeme čaj, působí kofein i při stejném množství pomaleji, ale delší dobu. Kromě svého známého povzbuzujícího účinku odvodňuje organismus a zesiluje ostatní léčivé účinky, protože rozšiřuje cévy a umožňuje tak dalším látkám lepší rozptýlení v organismu. Kofeinové vazby v kávě povzbuzují srdce a krevní oběh, v čaji zase ovlivňují centrální nervovou soustavu. Jeho smrtelná dávka pro člověka činí asi 10 g, což odpovídá cca 80 šálkům kávy nebo cca 140 šálkům čaje^{3, 5, 15}.

V čaji se vyskytují ještě dvě kofeinu příbuzné látky. První z nich je teofylin, který silně povzbuzuje srdce, respirační systém a ledviny a má podle farmakologických testů ještě větší účinek na nervovou soustavu než kofein. Druhá kofeinu podobná látka je teobromin, který působí podobně jako zmiňované dva, ovšem jeho stimulační účinek je nejslabší. Ve většině čajů je obsah těchto dvou látek značně nízký, tudíž je jejich vliv prakticky zanedbatelný⁶.

Vitaminy

List zeleného čaje obsahuje vitaminy A, B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin), B₆ (pyridoxin), B₇ (biotin), B₁₀ (kyselina folová), B₁₂ (kobalamin) a také vitaminy C, E, K a provitamin beta-karoten^{5, 16}.

Aminokyseliny

Zelený čaj obsahuje okolo 20 různých druhů aminokyselin. Nejdůležitější z nich je ovšem L-theanin, který v čaji tvoří více než 60 % celkového obsahu aminokyselin¹⁶.

L-theanin

Tato aminokyselina je obsažena pouze v čajovníku a některých druzích hub. Jeho množství v čaji klesá s rostoucím stářím čajových pupenů. Zatímco katechiny jsou trpké, chuť theaninu je nasládlá, a tak vzniká vyvážená chuť čaje. Výzkumy prokázaly pozitivní účinky theaninu na mysl a paměť člověka, protože pomáhá chránit mozkové buňky a prodlužuje jejich životnost. Je také považován za přírodní antidepresivum, a to díky produkci vln alfa, které uvolňují stres, zbavují úzkosti a navozují pocit relaxace a dobré nálady.

A v neposlední řadě posiluje imunitní systém, snižuje krevní tlak, zvyšuje účinek některých léčiv používaných při léčbě rakoviny a omezuje jejich nežádoucí vedlejší účinky¹⁶.

Pektin

Pektin je přírodní potravinová vláknina, která zvyšuje vstřebávání vitamínu C a váže těžké kovy. V zeleném čaji se vyskytuje v malé míře¹⁷.

Minerály a stopové prvky

Zelený čaj obsahuje 5 – 7 % minerálních látek¹⁶.

Fluor – zpevňuje zuby a kosti, ničí bakterie (*Streptococcus mutans*), které způsobují povlak na zubech a vytváří zubní kaz, urychluje hojení ran a chrání před anémií v těhotenství. Předávkování fluorem (více než 10 mg denně) může vést k deformacím kostí³.

Draslík – má vliv na buněčný metabolismus, odstraňování toxických látek z těla, snižování tlaku, zásobování mozku kyslíkem a nervové vzruchy. Dále je draslík důležitý pro správnou činnost kardiovaskulárního a svalového systému a činnost mnoha enzymů, přeměnu cukrů na energii (která je ukládána v játrech a ve svalech) a pro udržování rovnováhy kyselin. Pro jeho existenci v organismu je důležitá přítomnost hořčíku. Snížená hladina draslíku vede k poruchám srdečního rytmu až zástavě srdce^{3, 18}.

Vápník – je potřebný pro tvorbu zubů a kostí, správnou srážlivost krve, hojení ran, funkci svalů a nervů a hraje důležitou roli při buněčném metabolismu a látkových přeměnách (tvorba hormonů a enzymů). Vápník také snižuje krevní tlak a podporuje činnost srdce. Jeho dlouhotrvající nedostatek vede k osteoporóze a svalovým křečím^{3, 18}.

Sodík – je zodpovědný za odstraňování jedovatých látek z těla, za svalové kontrakce, správné trávení a za hospodaření těla s vodou. V zeleném čaji je ho ale nepatrné množství³.

Mangan – je velice důležitý pro správný metabolismus cukrů, aminokyselin a cholesterolu a hraje roli v antioxidantních dějích. Podporuje vývoj chrupavky a kostí a proces hojení. Nedostatek manganu v těle může vést k onemocněním cukrovkou a vzniku cévních a kardiovaskulárních onemocnění¹⁸.

Železo – je nezbytné k dýchání, protože je součástí hemoglobinu a rozvádí tak kyslík z plic do organismu. Nedostatek železa se projevuje únavou a oslabením výkonnosti³.

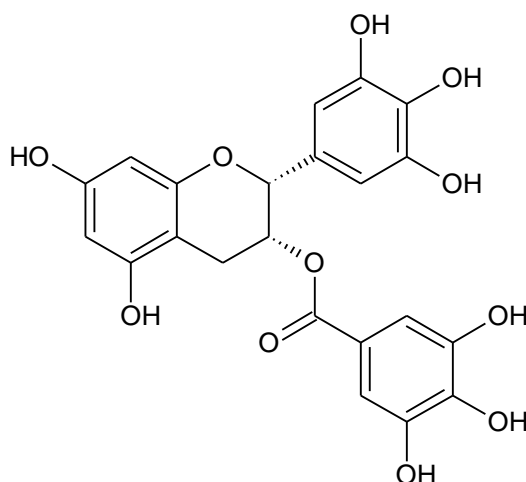
Zinek – je důležitý pro správnou funkci mnoha enzymů v těle. Tyto enzymy se účastní také tvorby protilátek a nepřítomnost zinku způsobuje sníženou aktivitu buněk ničících virovou infekci. Jeho nedostatek v těle se také projevuje pomalým hojením ran, úbytkem na váze, zhoršováním paměti a smyslového vnímání. Dále je důležitý pro správný vývoj tělesného a duševního zdraví a funkci mužských pohlavních orgánů^{3, 18}.

Měď – se vyskytuje v mnoha enzymatických cyklech. Tyto enzymy ovlivňují metabolismus sacharidů, krvetvorbu, tvorbu kostí, činnost svalů a srdce, vývoj mozku a fungování nervového systému. Nedostatek mědi může vést k chudokrevnosti, osteoporóze, vzniku kardiovaskulárního onemocnění a ke zvyšování hladiny tuků¹⁸.

Čajový list dále obsahuje různé enzymy, flavonoly (např. kvercetin, kaempferol a myricetin), chlorofyl, sacharidy, kyseliny (např. molybdenová, fosforečná aj.), karoten, tuky, vosky, saponiny, éterické oleje (silice) a více než 150 dalších, částečně aromatických substancí^{5, 14}.

2.3 Epigalokatechin-3-galát (EGCG)

Jeden druh katechinů ze skupiny polyfenolů se při výzkumech ukázal být zvláště aktivní v boji proti nemocem. Tento pravděpodobně nejúčinnější antioxidant a antikarcinogenní substance zeleného čaje je epigalokatechin-3-galát (EGCG) (Obr. 5) s chemickým názvem 3,4-dihydro-5,7-dihydroxy-2R-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-2H-1-benzopyran-3R-yl-3,4,5-trihydroxy-benzoát a molekulovou hmotností 458,4 g/mol³.



Obr. 5. Strukturní vzorec EGCG

Z pokusů na zvířatech bylo jednoznačně zjištěno, že EGCG zabraňuje karcinogenezi v trávicí soustavě a jiných orgánech a zároveň léčí již existující nádory ve střevě. Dále se podařilo zjistit, že brání i vzniku nádorového bujení na kůži.

Klinické pokusy později prokázaly, že antikarcinogenní vliv EGCG se uplatňuje i na člověku tím, že brání růstu rakovinových buněk v plicích, játrech, žaludku, střevě i pokožce a také snižuje riziko rakoviny prsu, zabraňuje zhoršování pooperačních stavů a zmírňuje toxický odpad kouření. Mezi jeho další pozitivní účinky patří termogenní účinek (podpora spalování tuků), podpora regenerace svalů a ochrana svalové hmoty před poškozením, prevence proti arterioskleróze a srdečním chorobám. Výzkumy potvrdily také inhibiční účinky čajových extraktů na růst a reprodukci mnoha druhů bakterií, dokonce i to, že je přímo ničí (např. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella ananteritidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* a *Clostridium*). Vedle antibakteriálního účinku také EGCG účinně brání v činnosti virům, a to tak, že ovlivňuje jejich přilnavost k buňkám. EGCG se naváže na virus (např. chřipkový) a zabrání tak propuknutí infekce. V neposlední řadě se EGCG osvědčil v podpoře obranyschopnosti

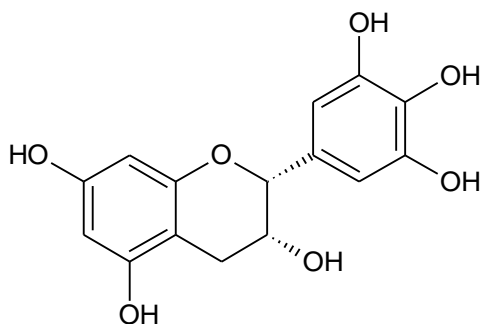
organismu (imunitního systému) tím, že ještě účinněji než běžně užívané léky zvyšuje hladinu bílých krvinek, speciálně makrofágů, B-lymfocytů a T-lymfocytů^{1, 3, 4, 19, 20}.

Pokud jde o působení na některé aktivní kyslíkové radikály, je EGCG 200 x účinnější než vitamin E a 100 x účinnější než vitamin C. Účinky jsou však méně uspokojivé, jde-li o působení na volné hydroxylové radikály¹.

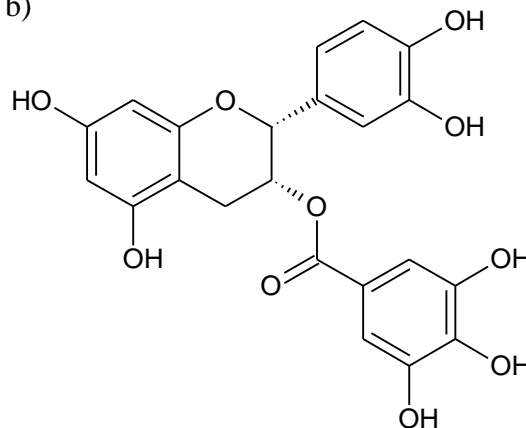
2.4 Další významné katechiny

Katechiny podobné EGCG se v zeleném čaji vyskytují v mnohem větší koncentraci než v čaji černém, kde kvůli působení kyslíku během fermentace dochází ke snižování obsahu polyfenolů. Jedná se o epigalokatechin (EGC), epikatechin galát (ECG), epikatechin (EC), katechin (C). Šálek zeleného čaje průměrně obsahuje 142 mg EGCG, 65 mg EGC, 28 mg ECG a 17 mg EC¹.

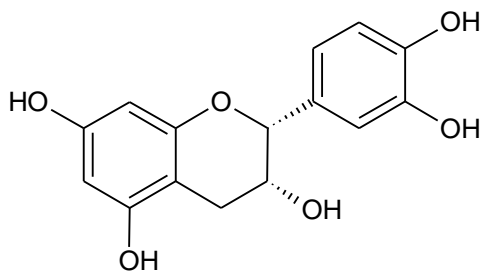
a)



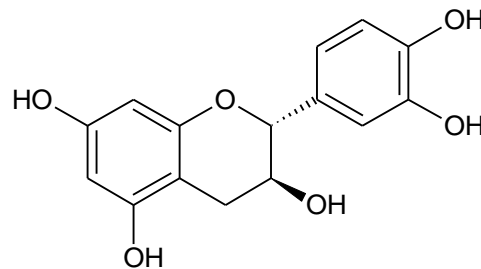
b)



c)



d)



Obr. 6. *Strukturní vzorce katechinů a) EGC, b) ECG, c) EC, d) C*

2.5 Účinky zeleného čaje na zdraví člověka

AIDS

Výzkumy dokázaly, že katechin, který je obsažený v zeleném čaji, brání v rozmnožování viru HIV. Žádný lék proti AIDS zatím ale objeven nebyl².

Rakovina

Výzkumy na zvířatech prokázaly, že čajové polyfenoly mají preventivní, ochranný a léčivý dopad na rakovinu nejrůznějšího stádia (převážně rakovinu kůže, trávicího ústrojí, jícnu, prsu, prostaty, jater, slinivky, močového měchýře a plic). Zabraňují vzniku prvního stádia rakoviny, tj. přeměně buněk na buňky rakovinné, a v pokročilých stádiích brání růstu nádorů a šíření metastáz. Zelený čaj chrání tělo před vedlejšími účinky léčby rakoviny, jako jsou ozařování a chemoterapie^{1, 21}.

Kardiovaskulární choroby

Zelený čaj chrání srdce a cévy tak, že snižuje krevní tlak a hladinu cholesterolu v krvi, brání vzniku usazenin v cévách a napomáhá proudění krve. Tím je zároveň snižováno riziko mnoha srdečních chorob, jako jsou např. infarkt, postižení věnčitých cév, angina pectoris, mozková mrtvice a arterioskleróza (kornatění cév)^{1, 21}.

Cukrovka

Epikatechin podporuje sekreci insulinu, a tak pomáhá udržet hladinu krevního cukru v rovnováze. Proto je tedy zelený čaj vhodným doplňkem při léčbě cukrovky i při její prevenci^{1, 3}.

Neurodegenerativní onemocnění

Zelený čaj podporuje správnou činnost mozku a brání rozvoji senility a degenerativních mozkových onemocnění jako jsou stařecká demence, Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba²¹.

Virová a bakteriální onemocnění

Jak již bylo uvedeno výše, v zeleném čaji je obsažen katechin, který je účinnou látkou proti mnoha druhům virů (chřipka, HIV atd.) a bakterií (černý kašel, zápal plic, cholera, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* atd.)^{1, 2, 14}.

Radioaktivní zátěž

Třísloviny zeleného čaje vážou radioaktivní izotop stroncium 90 a organismus je pak schopen vzniklou sloučeninu vyloučit. Je prokázáno snížení radioaktivní zátěže stronciem 90 až o třetinu. Prevence zdravotního poškození při ozáření^{2, 3}.

Překyselení těla

Zelený čaj je téměř jedinečným prostředkem k neutralizaci překyselení organismu, které může způsobit pálení žáhy, zubní kaz, revmatické problémy, močové, žlučnickové nebo ledvinové kameny a další potíže^{2, 3}.

Zuby

Fluor obsažený v zeleném čaji posiluje zubní sklovinu a zároveň s katechiny brání bakteriím podílet se na vzniku povlaku a zubního kazu. Zelený čaj také ničí bakterie zapříčínující zápach ústní dutiny^{1, 3}.

Trávicí potíže

Při průjmu a „pokaženém“ žaludku je zelený čaj doporučován už po staletí. Zelený čaj zklidňuje žaludek, podporuje trávení a pomáhá předcházet zácpě^{1, 2}.

Obezita a hubnutí

Zelený čaj snižuje rychlost vstřebávání cukrů a napomáhá lepšímu spalování tuků (termogenní účinek). Polyfenoly mají vliv na činnost enzymu amylázy, obsaženém ve slinách, který rozkládá sacharidy a také ovlivňuje následné trávení cukrů v trávicím ústrojí. Za váhové úbytky je částečně zodpovědný i kofein, který zrychluje bazální metabolismus a pomáhá tak tělu spalovat více kalorií^{3, 21}.

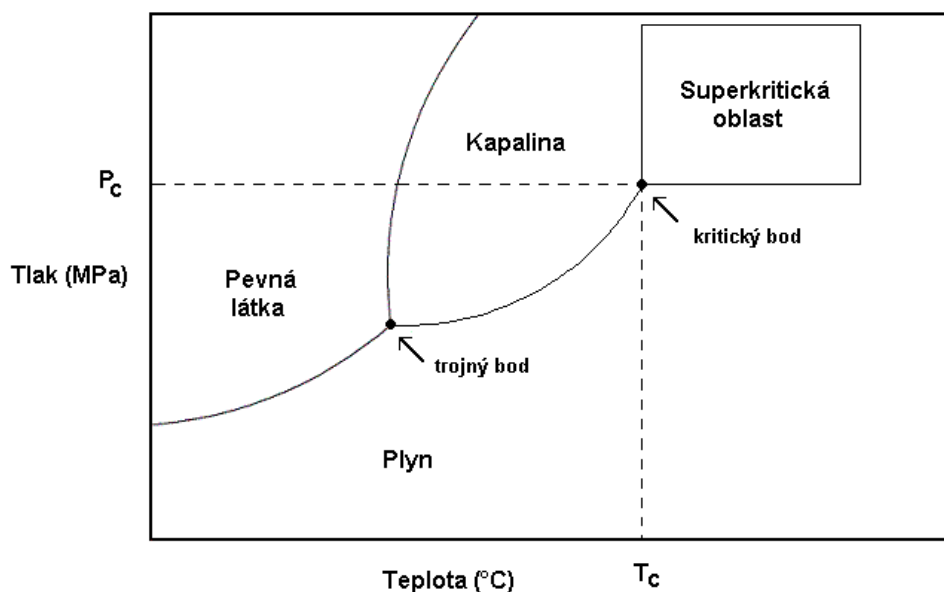
2.6 Vysokotlaké extrakce

Extrakce je dělicí metoda, při které se využívá různé rozpustnosti jednotlivých složek vzorku v různých rozpouštědlech²². Tento proces je založený na difúzi rozpouštědla do matrice, ze které extrahuje žádanou složku.

Klasické extrakční techniky (jako je extrakce v Soxhletově extraktoru, extrakce ultrazvukem nebo vytřepávací extrakční technika) jsou náročné na čas, vysokou spotřebu analyzovaného vzorku i extrakčního rozpouštědla. Proto byly nahrazeny novějšími extrakčními metodami, které redukují množství používaných rozpouštědel a zkracují dobu extrakce. Mezi ně patří superkritická fluidní extrakce a zrychlená extrakce rozpouštědlem²³.

2.6.1 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Tato metoda využívá vlastností kapalin za superkritických podmínek, takzvaných superkritických tekutin (SCF). Superkritická (neboli nadkritická) tekutina je definována jako látka s teplotou i tlakem vyšším, než je její kritická teplota (T_c) a kritický tlak (P_c). Kritický bod představuje nejvyšší teplotu a tlak, při kterých může látka existovat jako plyn a kapalina v rovnováze. SCF mají některé vlastnosti jako plyny (transportní vlastnosti, viskozitu blízkou plynům, stlačitelnost) a některé jako kapaliny (rozpuštěcí vlastnosti a hustotu blízkou kapalinám). SCF také nemají žádné povrchové napětí a viskozita je u nich mnohem nižší než u kapalin, takže rozpouštědlo může pronikat do malých pórů matrice, které jsou kapalinám nepřístupné. Vyšší difuzivita a nižší viskozita výrazně zvyšují rychlost extrakce²⁴.



Obr. 7. *p-t diagram CO₂ s vyznačením superkritické oblasti*

Tabulka I: Srovnání fyzikálně-chemických vlastností plynné, kapalné a superkritické fáze (převzato z cit. ²⁵)

	Hustota (g.ml ⁻¹)	Viskozita (Pa.s)	Difuzivita cm ² .s ⁻¹
Plyn	(0,6 – 2,0).10 ⁻³	(0,5 – 3,5).10 ⁻⁴	0,01 – 1,0
Superkritická tekutina	0,2 – 0,9	(2,0 – 9,9).10 ⁻⁴	(0,5 – 3,3).10 ⁻⁴
Kapalina	0,8 – 1,0	(0,3 – 2,4).10 ⁻²	(0,5 – 2,0).10 ⁻⁵

Jako superkritická tekutina se při SFE používá oxid dusný, amoniak, freony apod., nejčastěji je to však oxid uhličitý.

Superkritický oxid uhličitý (SC-CO₂)

SC-CO₂ je nepoužívanější superkritická tekutina, protože má relativně nízkou kritickou teplotu (31,1 °C) i tlak (73,8 bar), vysokou čistotu při relativně nízké ceně, je netoxický, nehořlavý, inertní, nekoroze a hojně se vyskytující. Avšak nevýhodou SC-CO₂ je jeho nepolárnost, neboť se stoupající polaritou analytů klesá jejich rozpustnost. Pro zvýšení polarit a tím i výtěžnosti při extrakci polárních látek se k SC-CO₂ přidávají vhodné polární látky - modifikátory (nejčastěji methanol, ethanol, acetonitril, benzen nebo voda)^{24, 26}.

SFE systém byl shledán mnohem jednodušší, s menší časovou náročností extrakce a menším použitím procesů než klasické extrakční techniky. Je to také vhodná alternativa kvůli své menší spotřebě použitého rozpouštědla a schopnosti extrahovat teplotně nestabilní látky za mírných podmínek^{23, 26}.

Použití SFE

SFE může být použita pro extrahování široké škály nepolárních, biologicky aktivních látek z přírodních produktů zahrnujících esenciální oleje a další aromatické látky, léčivé látky, karoteny a alkaloidy. A také bývá použita pro mírně polární látky, jako jsou např. aldehydy, estery, alkoholy, tuky, pesticidy a další biochemicky zajímavé látky. Ačkoliv většina doposud provedených analytických studií se zabývá extrakcí relativně nepolárních látek, objevují se i studie extrakcí polárních vzorků. Tato metoda není vhodná pro přímou extrakci vzorků obsahujících vodu²⁶.



Obr. 8. *SFE extraktor*

2.6.2 Zrychlená extrakce rozpouštědlem (Accelerated Solvent Extraction – ASE)

Pro tuto metodu existuje mnoho názvů a zkratk, z nichž nejpoužívanější jsou Pressurized solvent extraction – PSE, Pressurized fluid extraction – PFE, Fast extraction – FE, High-pressure solvent extraction HPSE, Enhanced solvent extraction – ESE a Pressurized liquid extraction – PLE. Dále budeme používat pouze zkratku ASE²⁷.

ASE je extrakční proces mezi tuhou látkou a kapalinou prováděný v krátkém časovém intervalu (5 – 20 min) za zvýšené teploty (50 – 200 °C) a zvýšeného tlaku (100 – 150 bar). Pro tuto extrakční techniku bývají použita organická rozpouštědla běžná při extrakci kapalinami (aceton, methanol atd.) a to v rozmezí 10 – 20 ml na extrakci a při vysokých teplotách a tlacích, aby urychlila proces extrakce²³.

Faktory ovlivňující účinnost ASE

Teplota použitá při procesu ASE je jedním z nejdůležitějších parametrů. S jejím zvýšením vzrůstá rozpustnost analytů v rozpouštědle, což umožňuje snížení objemu rozpouštědla pro úplnou extrakci analytu z matrice vzorku. Dále roste rozpustnost vody v nepolárních rozpouštědlech a rychlost difúze, což vede ke zrychlení extrakce a podstatnému zkrácení extrakčního času. Se snížením teploty klesá viskozita a povrchové napětí rozpouštědla, což umožňuje lepší proniknutí do pórů a mezi částice matrice, a dochází k oslabení a narušení silných interakcí mezi analytem a matricí založených na van der Waalsových silách. Nejen teplota významně ovlivňuje proces ASE, ale i tlak má svůj účel, především udržet rozpouštědlo v kapalném stavu, čímž umožňuje extrakci rozpouštědlem za teplot mnohem vyšších než je jeho bod varu^{23, 27, 28}.

Použití ASE

Tato metoda může být použita pro extrakci mnoha různých látek, jako jsou tuky, přírodní a účinné látky, ropné uhlovodíky, polychlorované bifenyly, polycyklické aromatické uhlovodíky, dioxiny, bazické, neutrální a kyselé složky, organochlorované a organofosforové pesticidy, chlorované herbicidy a antioxidantní přísady z polyolefinů²⁸.



Obr. 9. ASE extraktor

2.6.3 Studie zabývající se vysokotlakými extrakcemi katechinů ze zeleného čaje

Od zavedení analytické SFE v r. 1986 již bylo publikováno množství úspěšných analytických aplikací a SFE se stává rychle se rozvíjející extrakční metodou. Stejně je to i s ostatními vysokotlakými extrakcemi.

Byla zkoumána separace katechinů ze zeleného čaje pomocí SFE za podmínek 242 bar, 35 °C a přídavku ethanolu jako modifikátoru a zjistili, že po přidání 99,8 % ethanolu došlo k 2,8-násobnému zvýšení celkového obsahu surových extraktů než bez přídavku modifikátoru a k dvojnásobnému zvýšení než po přidání 45 % ethanolu²⁹. Podobná studie používala SC-CO₂ s podmínkami extrakce 310 bar a 60 °C za přídavku vody a ethanolu jako modifikátorů o různé koncentraci³⁰. Dále byl sledován vliv teploty, tlaku a modifikátoru na výtěžnost extrakce. Po analýze bylo zjištěno, že výtěžek EGCG vzrostl po zvýšení tlaku, teploty a množství vody³¹.

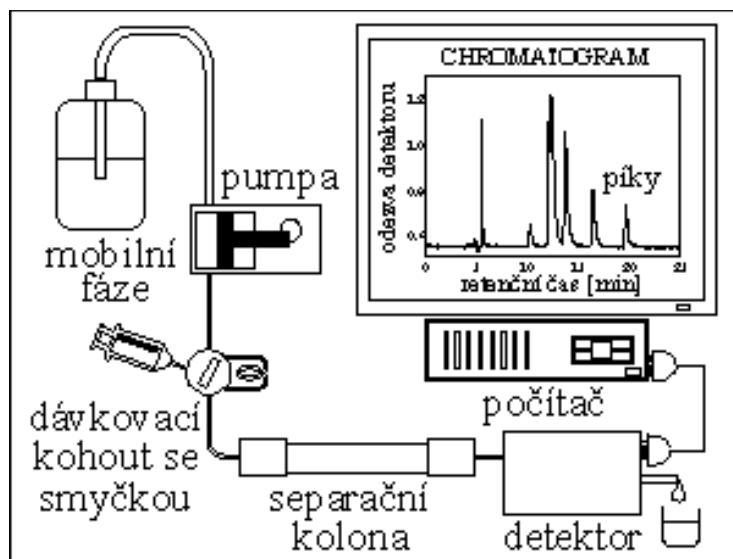
Byla studována ASE katechinu a epikatechinu z čajových lístků za přídavku čtyř různých rozpouštědel (vody, methanolu, ethanolu a etylacetátu), z nichž methanol prokázal nejlepší výsledky. Tato studie zahrnuje i extrakce tří typů čajových listů lišících se stupněm fermentace. Tento fermentační proces probíhá na povrchu čajového lístku s tím, že zbývající katechiny, které nebyly zoxidovány, se nacházejí v méně dostupných částech lístku. A proto extrakce katechinů z fermentovaného čaje bude obtížnější než z čaje zeleného. Při teplotách nad 130 °C a době extrakce 10 minut dochází k degradaci katechinu a epikatechinu³².

Pro extrakci katechinů ze zeleného čaje byla použita vysokotlaká extrakce rozpouštědlem za laboratorní teploty, kdy vzorek byl spolu s rozpouštědlem (50 % ethanol) umístěn do polyetylenového vaku. Extrakce probíhala při různých tlacích (100 – 600 MPa) po dobu 15 minut³³.

2.6.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography – HPLC) je pokročilá separační analytická metoda umožňující kvantitativní a kvalitativní analýzu látek z roztoku. HPLC umožňuje separování všech organických méně těkavých kapalných i tuhých látek rozpustných ve vodě a běžných organických rozpouštědlech nebo ve zředěných minerálních kyselinách^{22, 34}.

Mobilní fáze (MF) je vedena ze zásobníku přes odplyňovač do vysokotlakého čerpadla, odkud pokračují po případném utlumení pulsů přes dávkovací zařízení do chromatografické kolony. Kolona je spojena přímo s detektorem, který vede do sběrače frakcí nebo do jímače mobilní fáze a také je napojen na zařízení pro automatický záznam dat a pro vyhodnocování chromatogramů²².



Obr. 10. Schéma kapalinového chromatografu (převzato z cit.³⁵)

Dávkovací zařízení

K dávkování se používá šesticestný ventil s dávkovací smyčkou, jehož otočením se vnitřní prostor ventilu naplněný vzorkem přesune do proudu mobilní fáze a je vytlačen do separační kolony^{22, 34}.

Kolony

Separační kolony musí odolat vysokému tlaku mobilní fáze, proto se vyrábějí z nerezové oceli nebo ze skla s velkou mechanickou pevností. Vnitřní průměr kolony nepřesahuje 3 – 6 mm. Délka kolony se volí podle druhu použité stacionární fáze a bývá v rozmezí 15 – 30 cm^{22, 34}.

Detektory

K detekci separovaných látek se většinou využívá jejich obecných nebo specifických vlastností, kterými se liší od mobilní fáze. Podle toho se také rozlišují univerzální a selektivní detektory. Nejpoužívanějšími detektory jsou fotometrický, refraktometrický, fluorescenční, FTIR, elektrochemický nebo hmotnostní spektrometr (MS)^{22, 36}.

Mobilní a stacionární fáze

Mobilní fáze nesmí být mísitelná se stacionární fází. Používají se běžná rozpouštědla a jejich směsi. V případě separace slabě kyselých nebo bazických látek je nutná optimalizace pH. Pokud si mobilní fáze zachovává konstantní složení během celé analýzy, jedná se o izokratickou eluci látek. Pokud ovšem během analýzy měníme složení mobilní fáze s časem, jde o gradientovou eluci. Kolony jsou naplněny stacionární fází, tou bývá obvykle oxid křemičitý, nejčastěji modifikovaný navázáním vhodných funkčních skupin. Typ funkční skupiny na povrchu stacionární fáze určuje její výslednou polaritu.

Eluční pořadí je dáno vzájemným vztahem polarity separovaných látek a polarity mobilní a stacionární fáze. Při použití polární stacionární fáze jsou nejméně zadržovány nepolární látky, snížení polarity vede k prodloužení retenčních časů. Pro nepolární stacionární fází platí, že jsou v koloně nejméně zadržovány polární látky a se zvýšením polarity mobilní fáze se prodlužují retenční časy. Dokonalá separace však vyžaduje konstantnost průtoku mobilní fáze, kterou zajišťují čerpadla^{22, 34}.

3. Experimentální část

3.1 Přístrojové vybavení

Superkritická fluidní extrakce byla provedena pomocí nadkritického extraktoru LIZARD – 2001 firmy SEKO-K, s.r.o. Brno v off-line provedení. Při extrakci byla nastavena teplota restryktoru 100 °C, teplota extrakční cely 40 a 60 °C, tlak 200 bar a čas 20 minut.

Jako přístrojové vybavení pro zrychlenou extrakci rozpouštědlem sloužil *one* PSE firmy Applied Separations, Inc. USA. Teplota extrakční cely byla 100 °C, tlak byl 100 bar a čas 5 a 10 minut.

K odstředění tuhých podílů z extraktů byla použita centrifuga Centrifuge EPPENDORF 5702. Pro odpaření vzorků do sucha před analýzou byl použit suchý termostat pro odpařování rozpouštědel ze vzorků Evaterm firmy LABICOM s.r.o. Olomouc. Pro rozpouštění odpařených vzorků rozpouštědlem sloužila ultrazvuková lázeň Elma, S 40 H, Elmasonic.

Pro analýzu vzorků byl použit kapalinový chromatograf: Modulární systém Acquity UPLC (Waters, Milford, USA) obsahující Acquity PDA Detector, Acquity Column Manager, Acquity Sample Manager (autosampler) a Acquity Binary Solvent Manager.

Parametry kapalinové chromatografie

- Binární gradientová eluce: MF A: 0,1 % (v/v) kyselina mravenčí ve vodě, MF B 0,1 % (v/v) mravenčí v acetonitrilu
- Profil gradientu (Tab. II)

Tabulka II: *Profil gradientu*

Krok	Čas (min)	Průtok (ml/min)	Rychlost A (%)	Rychlost B (%)
1.	počátek	0,250	100,0	0,0
2.	2,50	0,250	100,0	0,0
3.	5,00	0,250	70,0	30,0
4.	10,00	0,250	50,0	50,0
5.	12,00	0,250	30,0	70,0
6.	13,00	0,250	0,0	100,0
7.	15,00	0,250	0,0	100,0

- Kolona: C18 (Acquity BEH, 1,7 μm , 50 mm \times 2,1 mm i. d., Waters)
- Dávkování: dávkovací smyčka 10 μl , způsob dávkování: částečné plnění smyčky (5 μl) s přeplněním dávkovací jehly.

Jako detektor sloužil hmotnostní spektrometr: Q-TOF Premier (Waters, USA) s ortogonálním uspořádáním analyzátoru typu QqTOF, vybavený iontovým zdrojem ESI s využitím ZSpray technologie a iontové optiky T-Wave a s možností měření přesné a správné hmotnosti iontů (systém LockSpray).

Parametry hmotnostního spektrometru

- Napětí na sprejovací kapiláře: + 3,2 kV
- Teplota iontového zdroje: 120 $^{\circ}\text{C}$
- Teplota desolvatačního plynu: 150 $^{\circ}\text{C}$
- Průtok plynů: (zmlžovací 400 l/hod; cone gas flow 0 l/hod)
- Kolizní energie: pro MS sken 5 eV, pro MS/MS sken rampa 20-70 eV
- Doba skenu: v rozsahu 1 s (interscan delay 0,02 s)

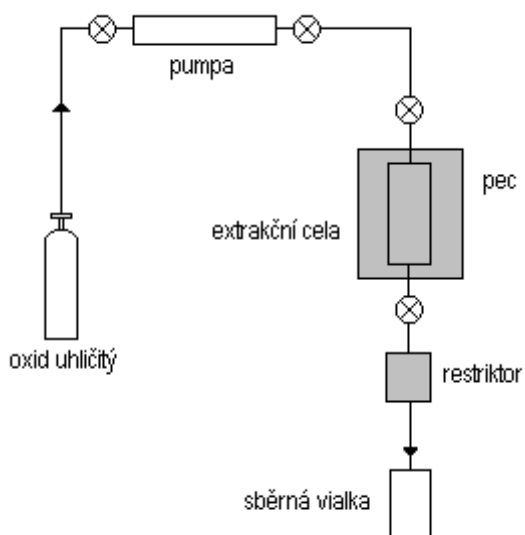
3.2 Chemikálie

- Sypaný zelený čaj s názvem Vzácné obočí (Chun Mee), země původu Čína, výrobce OXALIS, spol. s.r.o., Slušovice, Česká republika.
- Standard epigalokatechin-3-galát, $\geq 80\%$ HPLC (SIGMA – ALDRICH).
- Methanol, ethanol, aceton, všechny p. a. (PENTA, Chrudim, Česká republika).
- Kyselina mravenčí (SIGMA – ALDRICH).

3.3 Pracovní postup

SFE

Do patrony byl navážen vzorek čaje nebo čaje s přísávkem modifikátoru. Patrona byla vložena do extrakční cely a utěsněna. SC-CO₂ protéká z extrakční cely přes křemenný restriktor, ve kterém se vlivem sníženého tlaku mění skupenství na plynné. Za restriktorem následuje záchyt analytu do rozpouštědla. Proudící plyn rozpouštědlo probublává a neustále ho odpařuje, čímž nastává i částečná ztráta těkavějších látek. Po ukončení extrakce byly všechny vzorky centrifugovány, přečištěny přes PTFE stříkačkový filtr (průměr 25 mm, velikost pórů 0,45 μm), odpařeny v proudu dusíku do sucha a vloženy do mrazicího boxu až do doby analýzy.



Obr. 11. Schéma SFE extraktoru (převzato z cit.³⁷)

Pracovní podmínky pro SFE

Navážka vzorků při SFE byla 1 g, extrakční tlak byl 200 bar, použitá nadkritická tekutina SC-CO₂, jímací kapalina methanol a čas extrakce 20 minut. Extrakce jednotlivých vzorků se lišily pouze teplotou extrakce a použitým modifikátorem. Hodnoty těchto podmínek pro vzorky 1 – 6 byly následující:

vzorek č. 1: $t = 40\text{ °C}$, bez modifikátoru

vzorek č. 2: $t = 40\text{ °C}$, modifikátor methanol (200 μl)

vzorek č. 3: $t = 40\text{ °C}$, modifikátor ethanol (200 μl)

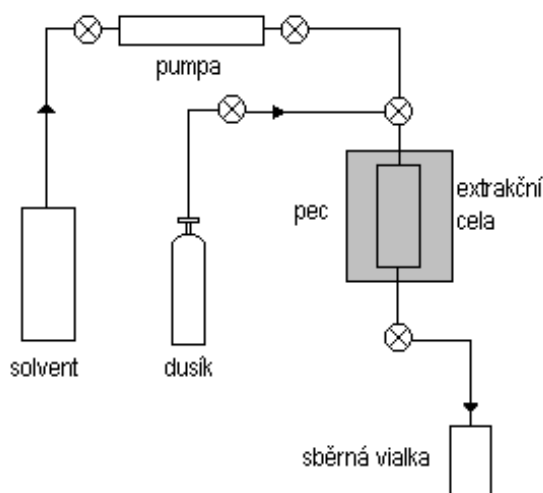
vzorek č. 4: $t = 60\text{ °C}$, bez modifikátoru

vzorek č. 5: $t = 60\text{ °C}$, modifikátor methanol (200 μl)

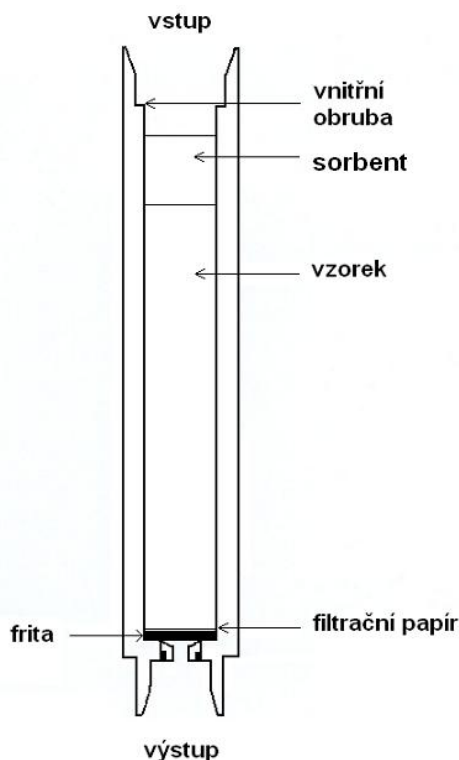
vzorek č. 6: $t = 60\text{ °C}$, modifikátor ethanol (200 μl).

ASE

Vzorek čaje byl navážen na analytických vahách a vložen do patrony. Navážka činila 2 g. Patrona se vzorkem se doplnila centimetr pod okraj sorbentem (Obr. 13) a vložila do vyhřívaného extrakčního bloku (termostatu). Termostat byl uzavřen přišroubováním víka. Aby po extrakci nedošlo k potížím s otevíráním termostatu, musí být víko pootočeno o $\frac{1}{4}$ otáčky zpět. Na displeji byl zvolen program s hodnotou teploty 100 °C, tlaku 100 bar a doby extrakce 10 a 5 minut. Po spuštění startu se do patrony načerpá rozpouštědlo, jehož tlak a teplota se upraví na pracovní podmínky a po ukončení extrakce je vypuštěno do jímací vialky. Patrona je následně vymyta čistým rozpouštědlem a poté dusíkem. Po skončení extrakce se termostat otevře, vyjme se patrona a důkladně vymyje. Vzorky byly centrifugovány, přečistěny přes PTFE stříkačkový filtr (průměr 25 mm, velikost pórů 0,45 μm), odpařeny v proudu dusíku do sucha a poté uloženy v mrazicím boxu až do doby analýzy.



Obr. 12. Schéma ASE extraktoru (převzato z cit.³⁷)



Obr. 13. *Naplněná patrona*

Pracovní podmínky pro ASE

Navážka vzorků pro ASE činila 2 g, extrakční tlak byl 100 bar a teplota extrakční cely byla 100 °C. Vzorky se od sebe lišily dobou extrakce a použitým rozpouštědlem. Jejich hodnoty byly následující:

vzorek č. 7: t = 10 min, rozpouštědlo methanol

vzorek č. 8: t = 10 min, rozpouštědlo ethanol

vzorek č. 9: t = 10 min, rozpouštědlo aceton

vzorek č. 10: t = 5 min, rozpouštědlo aceton

vzorek č. 11: t = 5 min, rozpouštědlo methanol

vzorek č. 12: t = 5 min, rozpouštědlo ethanol.

Příprava vzorků před analýzou

Všechny zakoncentrované odparky byly rozpouštěny v čistém rozpouštědle. Vzorky ze SFE byly rozpouštěny v 1 ml MF 0,1 % kyseliny mravenčí ve vodě s přidavkem 100 µl methanolu a pro lepší rozpustnost vloženy do ultrazvukové lázně. Vzorky z ASE byly rozpouštěny 10 ml směsí, složené z MF (0,1 % kyseliny mravenčí ve vodě) a methanolu v poměru 10:1.

Kalibrace

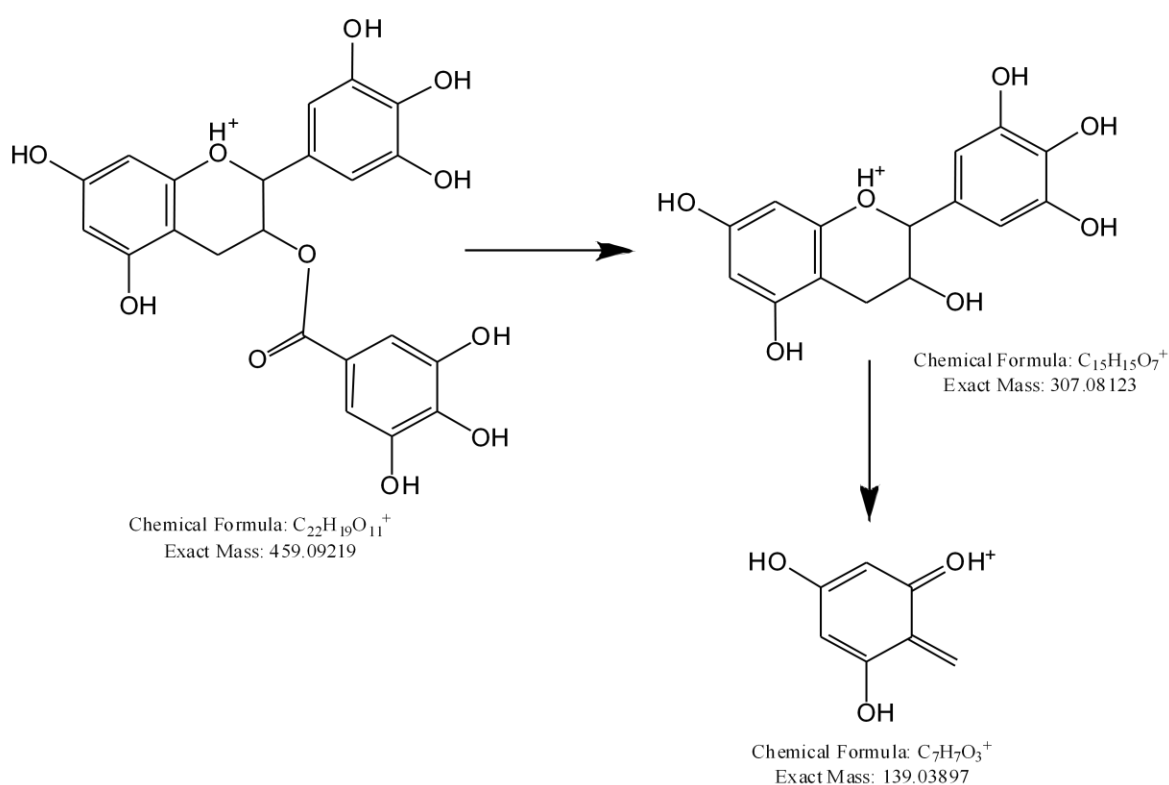
Standard byl připraven rozpuštěním 1 mg EGCG v 500 μ l MF (0,1 % kyseliny mravenčí ve vodě). Z tohoto roztoku o koncentraci 2 mg/ml byla postupným ředěním připravena sada kalibračních roztoků o koncentraci 200, 100, 50, 40 a 16 mg/l doplněním mobilní fáze do 1 ml a sestavena kalibrační přímka.

Analýza vzorků

Analýza extraktů byla provedena technikou HPLC s MS detektorem.

4. Výsledky a diskuze

Cílem bakalářské práce bylo vyextrahovat EGCG ze zeleného čaje za pomoci vysokotlakých extrakčních technik a porovnat jejich účinnost a experimentální náročnost. Byla použita superkritická fluidní extrakce a zrychlená extrakce rozpouštědlem za různých extrakčních podmínek. Vzorky byly analyzovány HPLC MS a MS/MS. Retenční čas standardu EGCG se shodoval s retenčním časem reálného vzorku.



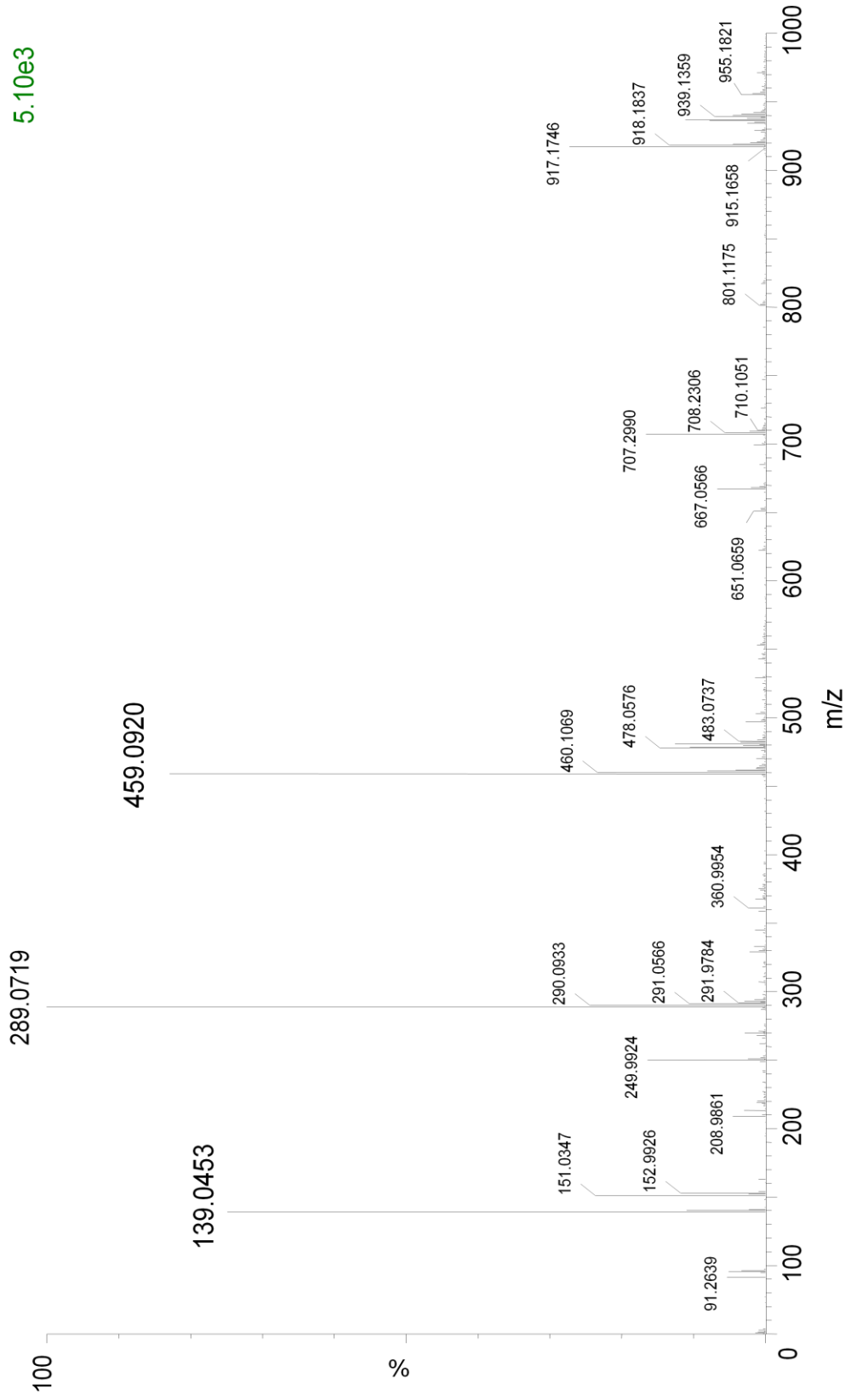
Obr. 14. Fragmentace EGCG

kalibrace 200-mg-l

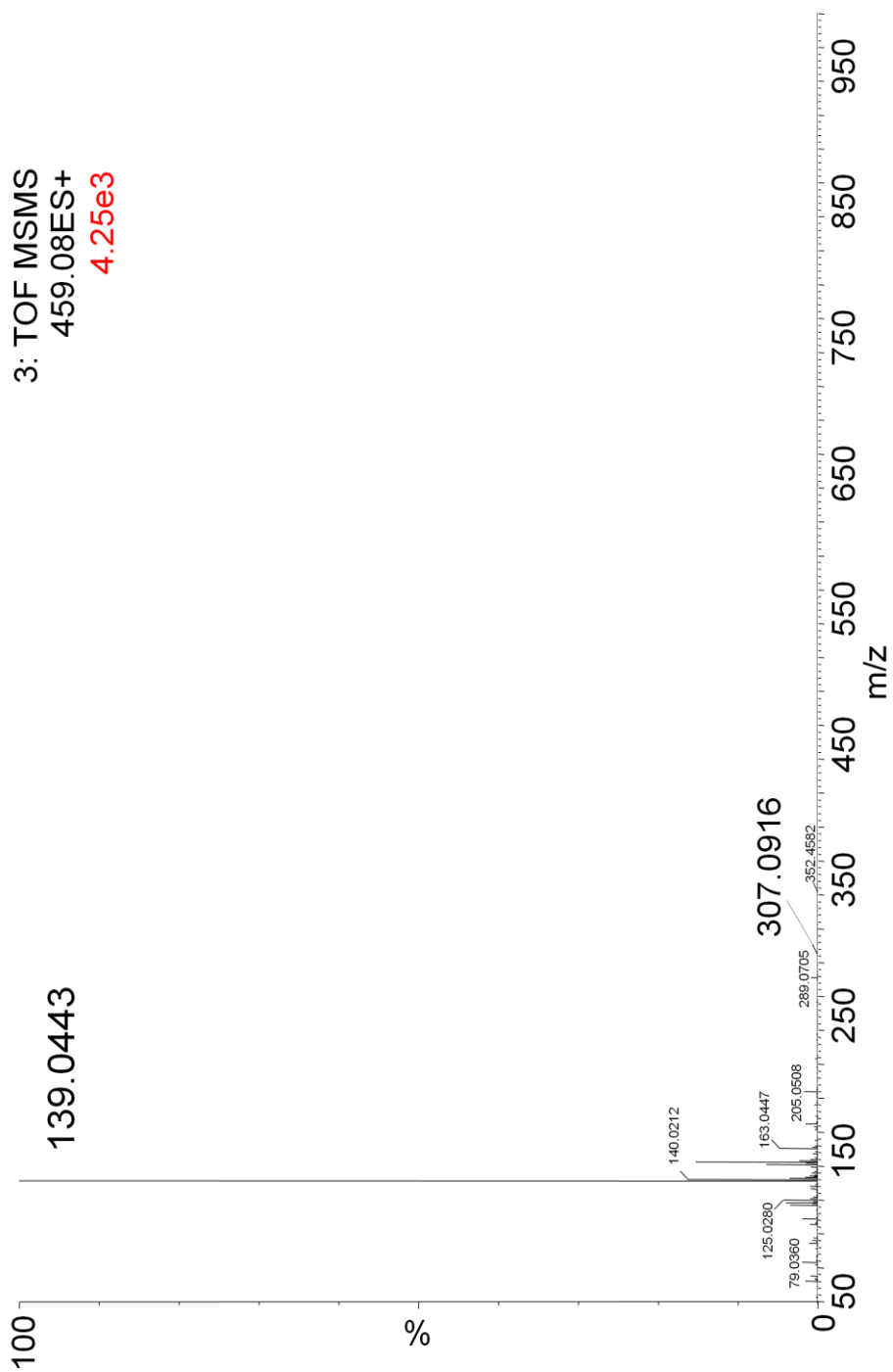
caj-kalibrace-200-mg-l 177 (5.146) Cm (177:180-(165:168+195:197))

1: TOF MS ES+

5.10e3



Obr. 15. Spektrum EGCG



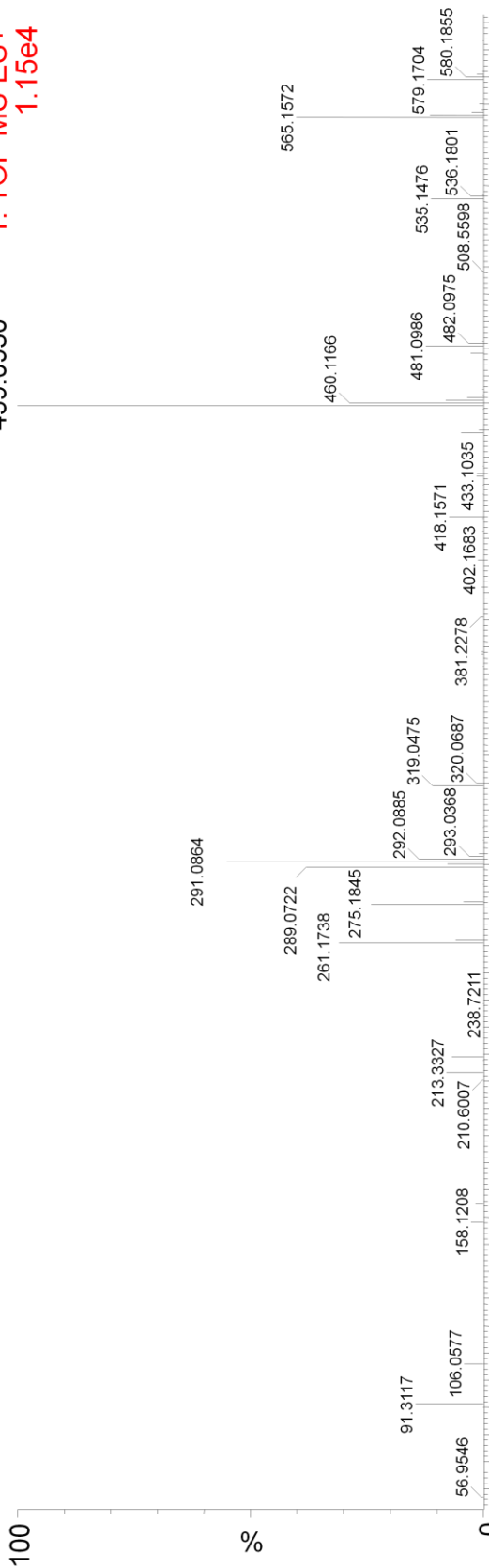
Obr. 16. MS/MS spektrum standardu

extrakce ASE+ethanol- 10min

caj-ASE-V8 174 (5.043) Cm (174:184-(162:169+214:229))

**1: TOF MS ES+
1.15e4**

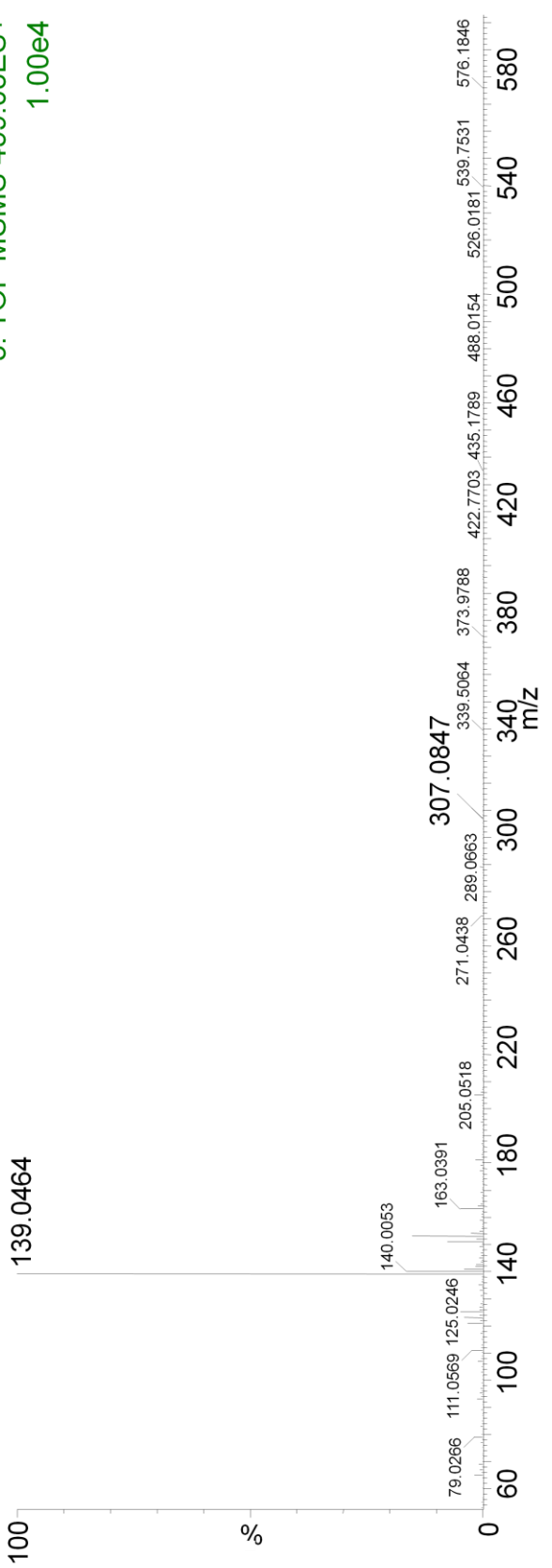
459.0930



caj-ASE-V8 176 (5.123) Cm (174:183-(134:146+204:208))

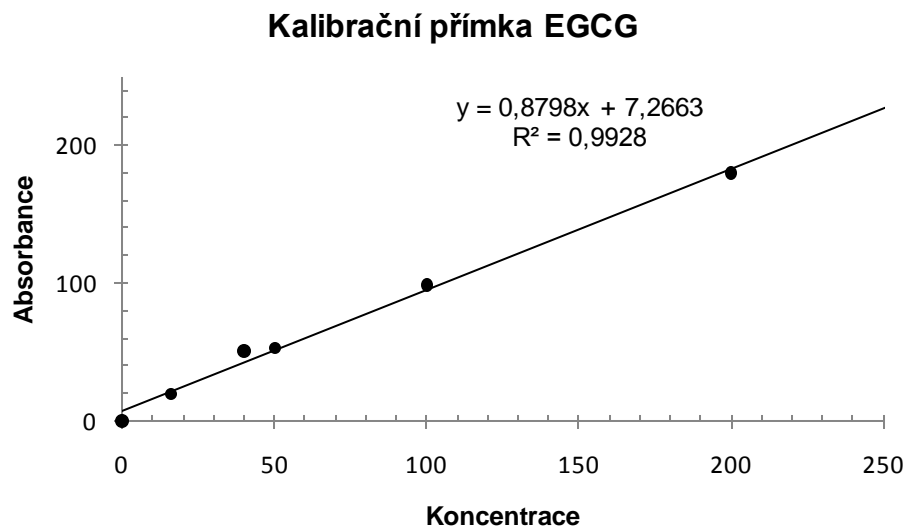
**3: TOF MSMS 459.08ES+
1.00e4**

139.0464

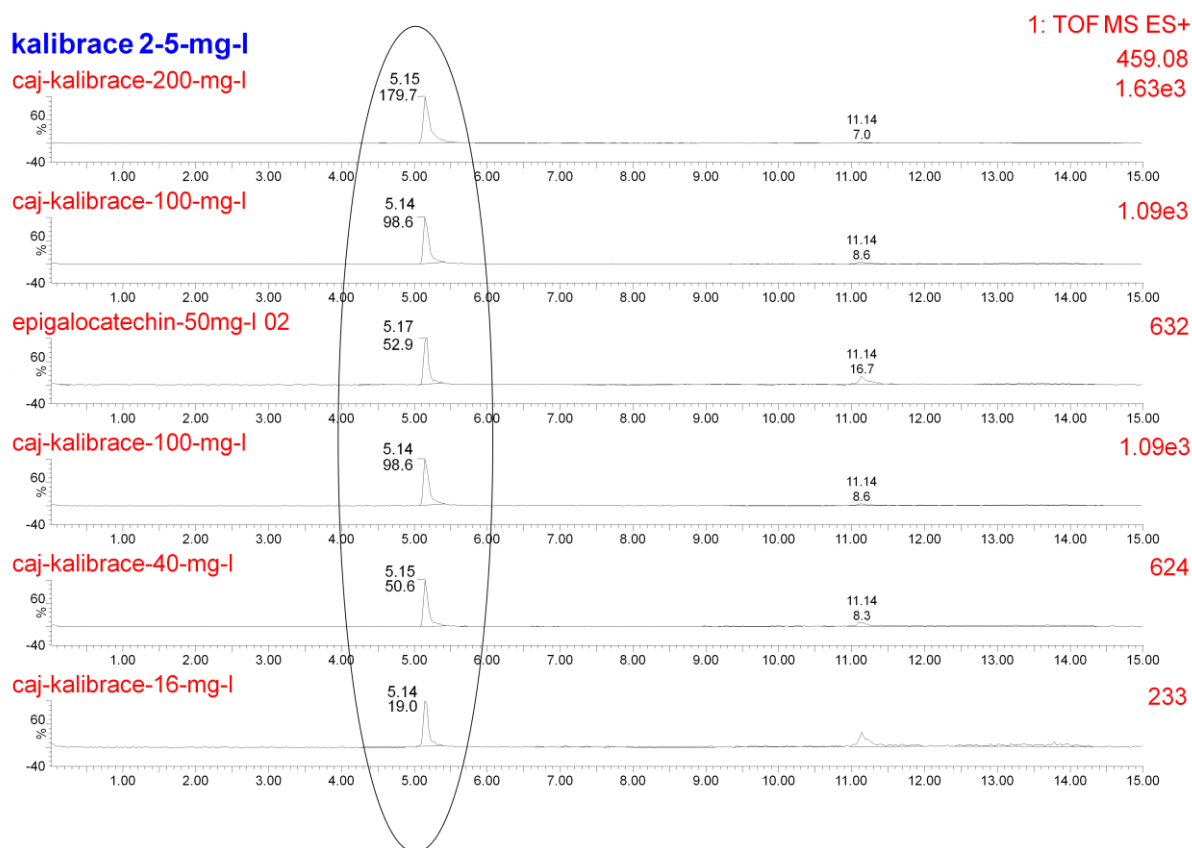


Obr. 17. Spektrum reálného vzorku

Pro sestavení kalibrační přímky byla použita sada roztoků o koncentraci 200, 100, 50, 40 a 16 mg/l. Mez stanovitelnosti (LOQ = 4,5 mg/l) byla určena z poměru výšek signálu a šumu.



Obr. 18. Graf kalibrační přímky EGCG

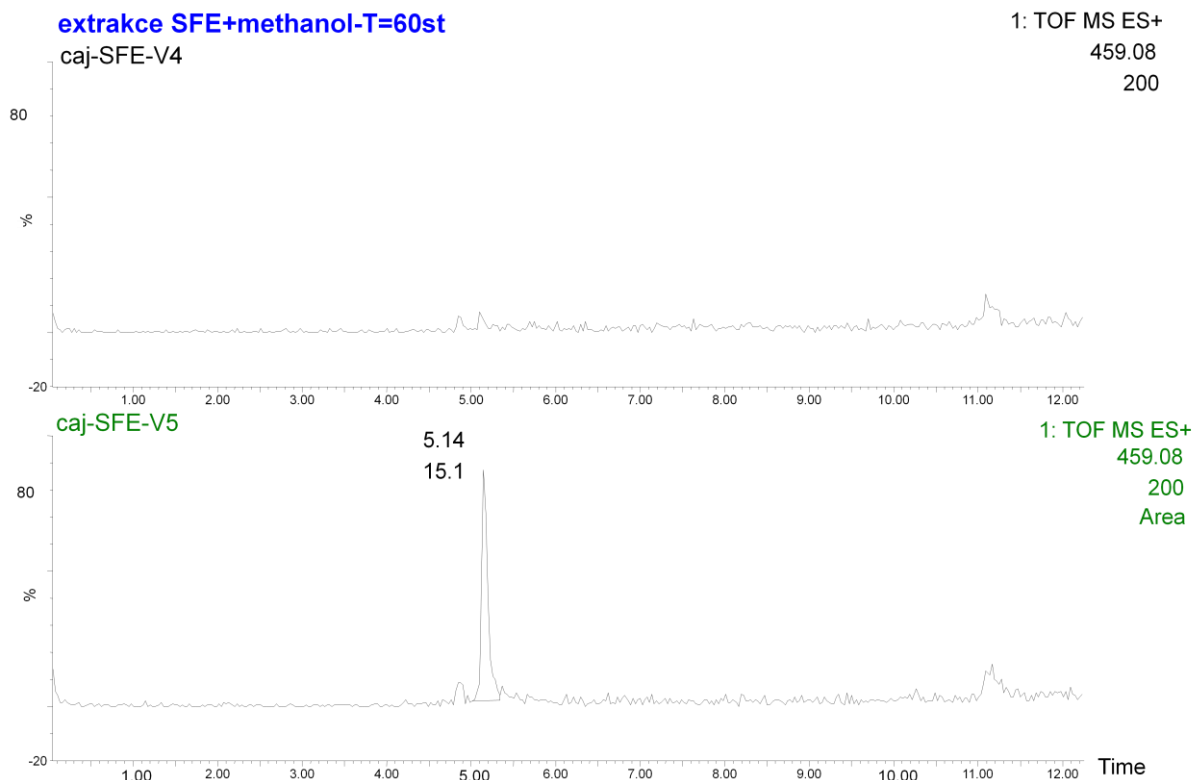


Obr. 19. Kalibrace

Pro SFE jsme použili různé teploty extrakce (40 a 60 °C) a také různé modifikátory (methanol a ethanol). Extrakty byly zachytávány do vialky s 1 ml methanolu. Při této superkritické extrakční technice může v důsledku expanze SC-CO₂ docházet k zamrznutí restriktoru. V těchto případech jsme zamrznutý restriktor uvolňovali použitím topného bloku. V průběhu experimentů bylo nutné věnovat pozornost průtoku SC-CO₂ restriktorem, nejen z důvodů jeho zamrznutí, ale i z důvodu ucpání restriktoru částicemi vzorku. Při výběru modifikátorů byla kromě methanolu a ethanolu zvolena také voda, která při experimentech způsobovala ucpávání restriktoru. V daném experimentálním uspořádání nebylo možné tento problém vyřešit, a tudíž jsme ji vyloučili. Extrakty získané touto metodou byly čisté a nepotřebovaly další čištění. Z tabulky III je patrné, že nejlepší výsledky byly získány použitím methanolu jako modifikátoru při teplotě 60 °C.

Tabulka III: SFE EGGC ze zeleného čaje

Teplota	bez modifikátoru	modifikátor - methanol	modifikátor – ethanol
40 °C	nekvantifikováno	1,175	nekvantifikováno
60 °C	nekvantifikováno	8,904	nekvantifikováno

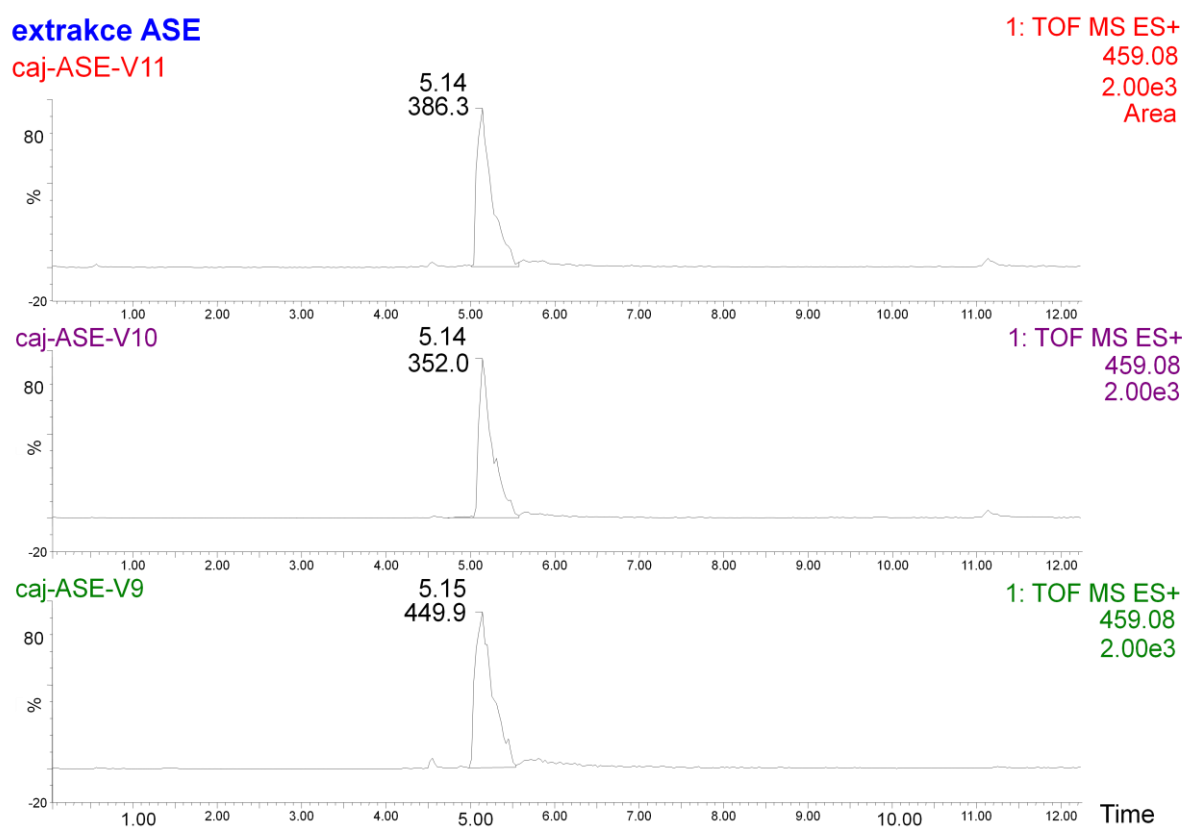


Obr. 20. Srovnání SFE

Při ASE byla volena různá rozpouštědla (aceton, methanol a ethanol) a doba extrakce. Na rozdíl od literatury, kde vysokotlaké extrakce probíhaly za laboratorní teploty, byla v našem případě zvolena teplota rozpouštědla nad bodem varu. Byl zvolen extrakční čas 5 a 10 minut. Delší extrakční čas neměl výrazně větší vliv na účinnost extrakce. Extrakty vyžadovaly další důkladnější přečištění (centrifugace, filtrace).

Tabulka IV: ASE EGGC ze zeleného čaje

Doba extrakce	Aceton	Methanol	Ethanol
5 min	330,909	368,645	367,508
10 min	383,444	458,415	415,360



Obr. 21. Srovnání ASE

Z tabulek III a IV můžeme udělat závěr, že zrychlená extrakce rozpouštědlem byla ve srovnání se superkritickou fluidní extrakcí mnohonásobně účinnější. Metoda ASE je rychlejší a v průběhu experimentu není nutný zásah do jeho chodu. Na druhou stranu, extrakty získané ASE obsahují větší množství balastních látek, a tudíž je nezbytná jejich další úprava před analýzou. Z výsledků vyplývá, že nejúčinnější pro extrakci EGCG ze zeleného čaje je ASE methanolem, při tlaku 100 bar, teplotě 100 °C a době extrakce 10 minut.

5. Závěr

Bylo sledováno několik faktorů, které ovlivňují extrakční účinnost superkritické fluidní extrakce a zrychlené extrakce rozpouštědlem. Parametry měněné při SFE byly teplota a čistý SC-CO₂ nebo s přidavkem modifikátoru. U ASE se měnilo používané rozpouštědlo a doba extrakce. Z naměřených výsledků vyplývá, že nejlepšími podmínkami pro SFE je použití methanolu jako modifikátoru při teplotě 60 °C a pro ASE je použití methanolu jako rozpouštědla po dobu 10 minut.

Ze závěrečného porovnání výsledků obou metod je jednoznačně účinnější ASE. Na základě výše uvedených faktů lze konstatovat, že vysokotlaké extrakce jsou schopny plně nahradit klasické extrakční metody.

Tabulka V: Porovnání výhod a nevýhod klasické extrakce s vysokotlakými extrakcemi (převzato cit.³⁸)

	Doba extrakce	Rozpouštědlo	Výhody	Nevýhody
Sox.	několik hodin	organické (150 – 500 ml)	<ul style="list-style-type: none"> – levná instrumentace – jednoduchá manipulace – není nutná filtrace 	<ul style="list-style-type: none"> – velká spotřeba rozpouštědla – dlouhá doba extrakce – po extrakci je nutné odpařit rozpouštědlo – zakoncentrování i nečistot
SFE	10 – 60 min	CO ₂ čistý nebo modifikovaný vhodným polár. rozpouštědlem 2 – 5 ml resp. 30 – 60 ml	<ul style="list-style-type: none"> – rychlá extrakce – nízká spotřeba rozpouštědla – možnost extrakce teplotně nestabilních látek – zakoncentrování analytů – možnost on-line připojení – není nutná filtrace 	<ul style="list-style-type: none"> – vysoká cena instrumentace – problém s maticí – možný rozklad analytu během extr.
ASE	10 – 20 min	organické (15 – 60 ml)	<ul style="list-style-type: none"> – rychlá extrakce – nízká spotřeba rozpouštědla 	<ul style="list-style-type: none"> – vysoká cena instrumentace – možná degradace teplotně nestabilních analytů – nutné přečištění analytu

6. Seznam použité literatury

- [1] Mitscher L. A., Dolby V.: *Kniha o zeleném čaji: Čínský pramen mládí*. ZEMS a Pragma, Praha 2006.
- [2] Lübeck W.: *Zelený čaj: Uzdravující požitek*. FONTÁNA, Český Těšín 2007.
- [3] Teufl C.: *Zelený čaj – elixír zdraví*. METRAMEDIA, Praha 2000.
- [4] Dolby V.: *O zeleném čaji*. Pragma, Praha 2002.
- [5] Oppliger P.: *Nová kniha o zeleném čaji*. Pragma, Praha 2000.
- [6] Valter K.: *Vše o čaji pro čajomily*. Granit, Praha 2004.
- [7] Hurtado-Fernández E., Gómez-Romero M., Carrasco-Pancorbo A., Fernández-Gutiérrez A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53**, 5 (2010).
- [8] <http://www.caj.cz/>, 25.2.2011.
- [9] http://www.bitkisel-tedavi.com/images/Camellia_sinensis3a.jpg, 27.2.2011.
- [10] <http://www.asianflora.com/Theaceae/Camellia-assamica-1.jpg> 27.2.2011.
- [11] http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Flower_of_camellia_sinensis.jpg 27.2.2011.
- [12] <http://blog.wuwej.net/2009/05/10/oblibene-cajove-omyly-a-nepresnosti.html>, 5.3.2011.
- [13] <http://home.zf.jcu.cz/~dadakova/texty/flavon.htm>, 19.3.2011.
- [14] Hamilton-Miller J. M. T.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2375 (1995).
- [15] <http://www.vscht.cz/lam/new/bapl2003-01.pdf>, 20.3.2011.
- [16] <http://greentealovers.com/greenteahealthcatechin.htm>, 15.3.2011.
- [17] <http://www.nutrice.cz/vlaknina/>, 1.3.2011.
- [18] <http://www.mineralfit.cz/>, 1.3.2011.
- [19] <http://www.reflexnutrition.cz/zpravy?nid=106>, 1.3.2011.
- [20] Nagle D. G., Ferreira D., Zhou Y.-D.: *Phytochemistry* **67**, 1849 (2006).
- [21] Zaveri N. T.: *Life Sci.* **78**, 2073 (2006).
- [22] Holzbacher Z., Churáček J. a kolektiv: *Analytická chemie*, SNTL, Praha 1987.
- [23] Eisner A., Kurečková K., Ventura K.: *Chem. Listy* **94**, 235 (2000).
- [24] Kurečková K., Ventura K., Eisner A., Adam M.: *Chem. Listy* **95**, 415 (2001).
- [25] King M. B., Kassim K., Bott T. R.: *Fluid Phase Equilib.* **10**, 249 (1983).
- [26] Cao X.-L., Tian Y., Zhang T.-Y., Ito Y.: *J. Chromatogr., A* **898**, 75 (2000).
- [27] Giergielewicz-Mozajska H., Dabrowski L., Namieśnik J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* **31**, 149 (2001).

- [28] Ventura K., Adam M, Válková P.: Chem. Listy **95**, 223 (2001).
- [29] Chang Ch. J., Wu S.-M., Yang P.-W.: Innovative Food Sci. Emerging Technol. **1**, 187 (2000).
- [30] Chang Ch. J., Chiu K.-L., Chen Y.-L., Chang Ch.-Y.: Food Chem. **69**, 109 (2000).
- [31] Kim W.-J., Kim J.-D., Kim J., Oh S.-G., Lee Y.-W.: J. Food Eng. **89**, 303 (2008).
- [32] Piñeiro Z., Palma M., Barroso G. C.: J. Chromatogr., A **1026**, 19 (2004).
- [33] Jun X., Shuo Z., Bingbing L., Rui Z., Ye L., Deji S., Guofeng Z.: Int. J. Pharm. **386**, 229 (2010).
- [34] Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie*. Karolinum, Praha 2005.
- [35] <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>, 20.3.2011.
- [36] Klouda P.: *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, Ostrava 2003.
- [37] http://is.muni.cz/th/106556/prif_m/Vyuziti_metody_superkriticke_fluidni_extrakce_k_extrakci_organickych_polutantů.pdf, 27.3.2011.
- [38] Halko R., Hutta M.: Chem. Listy **101**, 649 (2007).