

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

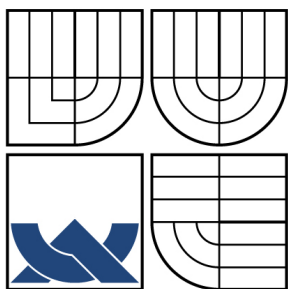
OBSAH ANTIOXIDAČNÍCH LÁTEK VE VYBRANÝCH DRUZÍCH
OVOCNÝCH A BYLINNÝCH ČAJŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

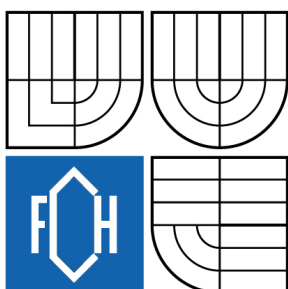
MARTINA TOMKOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

OBSAH ANTIOXIDAČNÍCH LÁTEK VE VYBRANÝCH DRUZÍCH OVOCNÝCH A BYLINNÝCH ČAJŮ

ANTIOXIDATIVE SUBSTANCES IN SELECTED FRUIT AND HERBAL TEAS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

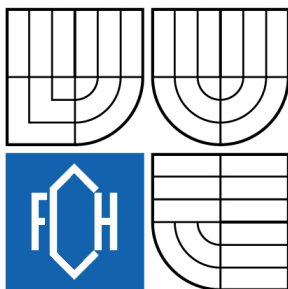
MARTINA TOMKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2008



Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	FCH-DIP0185/2007	Akademický rok: 2007/2008
Ústav	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka)	Tomková Martina	
Studijní program	Chemie a technologie potravin (M2901)	
Studijní obor	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti diplomové práce		

Název diplomové práce:

Obsah antioxidantních látek ve vybraných druzích ovocných a bylinných čajů

Zadání diplomové práce:

- Literární rešerše
 - přehled složení a pozitivních zdravotních účinků ovocných a bylinných čajů
 - přehled antioxidantů v různých typech bylinných a ovocných čajů
 - přehled metod stanovení významně zastoupených antioxidantů a antioxidační aktivity
- Optimalizace metod extrakce a stanovení vybraných antioxidantů; stanovení antioxidační a antimutagenní aktivity
- Screeningová studie - analýza antioxidantů, antioxidační a antimutagenní aktivity ve vybraných ovocných a bylinných čajích
- Orientační senzorická analýza čajů

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Martina Tomková
student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá studiem antioxidačních a antimutagenních vlastností vybraných druhů bylinných a ovocných čajů oblíbených v české populaci. V rámci práce byl srovnán obsah aktivních látek v různě balených (porcovaných a sypaných) bylinných čajích. Rovněž byl sledován vliv dlouhodobého skladování ovocných i bylinných čajů v podmínkách podobných běžnému uchovávání v domácnosti.

K popisu antioxidačních charakteristik čajů byly použity vybrané skupinové parametry - celková antioxidační aktivita (kit Randox), spektrofotometrické stanovení celkových polyfenolů a celkových flavonoidů a rovněž stanovení individuálních zástupců nízkomolekulárních antioxidantů. Hladiny skupinových parametrů byly vesměs vyšší v bylinných čajích ve srovnání s ovocnými. Sypané čaje vykazovaly téměř ve všech případech vyšší obsah antioxidantů než čaje porcované.

Kvalitativní a kvantitativní analýza individuálních antioxidantů byla provedena metodou HPLC se spektrofotometrickou detekcí a verifikována metodou on-line LC/MS. Ve všech druzích čajů byl analyzován obsah katechinů - katechinu, epikatechinu a epikatechin-gallátu a dalších flavonoidů - rutinu, morinu, quercetinu, kaempferolu, myricetinu a luteolinu. Ve všech čajích byl zjištěn vysoký obsah katechinu a rutinu. Obecně nejvyšší obsah jednotlivých flavonoidních látek byl prokázán v bylinných sypaných čajích. Dalším z analyzovaných nízkomolekulárních antioxidantů byla kyselina L-askorbová, která byla ve vyšším množství zastoupena ovocných čajích a v šípkovém čaji.

Antimutagenita čajových extraktů byla testována pomocí in vitro testu za použití kvasinkového kmene *Saccharomyces cerevisiae* D7. Vysoká antimutagenní aktivita byla prokázána u bylinných čajů z kopřivy a z třezalky a u všech ovocných čajů.

V průběhu skladování po dobu 1 roku při 20°C a ve tmě došlo k poklesu většiny sledovaných skupinových antioxidantů, přičemž výraznější pokles byl zaznamenán u ovocných čajů ve srovnání s bylinnými čaji.

ABSTRACT

This diploma project deals with antioxidant and antimutagenic properties of selected herbal and fruit teas commonly used in Czech population. Influence of different tea packaging (bag teas and loose leaf teas) on bioactive compound content was compared. Further, effect of long-term storage in common household conditions was studied.

Antioxidant properties of teas were characterized using some group parameters - total antioxidant activity ("Randox Total Antioxidant Status Kit"), total phenolics and total flavonoids – as well as some individual representatives of low molecular weight antioxidants. Higher antioxidant content was found in herbal teas than in fruit teas. Comparing bag teas with loose leaf teas higher antioxidant activity was shown in loose leaf teas.

Individual antioxidants were analyzed using HPLC method with spectrophotometric detection and verified by on-line LC/MS. In all tea samples catechins - catechin, epicatechin, epicatechin gallate and other flavonoids - rutin, morin, quercetin, kaempferol, myricetin and luteolin were determined. In most of teas high level of catechin and rutin was detected. The highest level of flavonoids was determined in herbal poured teas. Ascorbic acid content was also determined by HPLC method. Higher vitamin C level was found in most of fruit teas and in rose hip tea.

Antimutagenicity of tea extracts was tested by in vitro test using *Saccharomyces cerevisiae* D7 yeast. High antimutagenic activity showed mainly nettle tea, tutsan tea and most of fruit teas.

During long-term storage (1 year, 20°C, darkness) a significant decrease of all analyzed antioxidant parameters was followed. Higher lost of antioxidants was found in fruit teas when compared with the herbal ones.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ovocný čaj, bylinný čaj, antioxidanty, polyfenoly, antioxidační aktivita, antimutagenní aktivita

KEYWORDS

Fruit tea, herbal tea, antioxidants, total phenolics, antioxidant activity, antimutagenic activity

TOMKOVÁ, M. *Obsah antioxidačních látek ve vybraných druzích ovocných a bylinných čajů.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 127 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za cenné rady a všestrannou pomoc, dále pak Ing. Simoně Macuchové za pomoc při měření praktické části práce a v neposlední řadě i mé rodině za podporu během celého studia.

OBSAH

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	11
2	ÚVOD.....	13
3	TEORETICKÁ ČÁST	15
3.1	Výzkum léčivých bylin a fytoterapie.....	15
3.2	Bylinné a ovocné čaje	15
3.2.1	Příprava čajových nálevů	16
3.2.2	Charakteristika vybraných bylinných čajů.....	16
3.2.3	Ovocné čaje.....	25
3.3	Antioxidační aktivita přírodních látek.....	29
3.3.1	Účinek antioxidantů a rozdělení podle mechanismu působení	29
3.3.2	Antioxidanty v bylinných a ovocných čajích.....	30
3.3.3	Mechanismus působení polyfenolů – radikálové reakce.....	30
3.3.4	Polyfenoly	31
3.3.5	Flavonoidy.....	31
3.3.5.1	Flavanoly - katechiny.....	33
3.3.5.2	Flavonoly.....	34
3.3.6	Kyselina L-askorbová.....	34
3.4	Antimutagenní aktivita.....	36
3.4.1	Antimutagenita/genotoxicita	36
3.4.1.1	Mutageneze a rakovina	36
3.4.1.2	Rozdělení mutací a mutageny	37
3.4.1.3	Definice 4-NQO	38
3.4.2	Testy používané při výzkumu antimutagenních/genotoxických účinků látek	38
3.4.2.1	Amesův test (Test reverzní mutace na Salmonella typhimurium).....	39
3.4.2.2	Test na Saccharomyces cerevisiae D7.....	40
3.5	Metodické postupy	41
3.5.1	Extrakce.....	41
3.5.2	HPLC	41
3.5.3	Hmotnostní spektrometrie	42
3.5.4	Spektrofotometrie UV-VIS.....	43
3.5.5	Celková antioxidační aktivita	43
3.6	Senzorická analýza.....	44
4	CÍL PRÁCE	45
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	46
5.1	Použité chemikálie, mikroorganismy, přístroje a pomůcky	46
5.1.1	Chemikálie	46
5.1.1.1	Celkové polyfenoly a flavonidy	46
5.1.1.2	TAS.....	46
5.1.1.3	HPLC	46
5.1.1.4	Kultivace.....	46
5.1.1.5	Testy antimutagenity	47
5.1.2	Přístroje a pomůcky	47
5.1.3	Mikroorganismy.....	47

5.1.4	Materiál - druhy čaje – ovocné/bylinné	48
5.2	Analytické a separační metody – stanovení antioxidantů	49
5.2.1	Extrakce aktivních složek	49
5.2.2	TAS.....	49
5.2.3	Stanovení celkových polyfenolů	49
5.2.4	Stanovení celkových flavonoidů	50
5.2.5	HPLC analýza flavonoidů	50
5.2.6	HPLC analýza kyseliny askorbové	50
5.2.7	Stanovení látek polyfenolického typu metodou LC-MS.....	51
5.3	Testy antimutagenity/genotoxicity - <i>S. cerevisiae</i> D7	51
5.3.1	Kultivace testovacího kmene.....	51
5.3.2	Postup stanovení antimutagenní aktivity	52
5.3.2.1	Média	52
5.3.2.2	Stanovení antimutagenity	53
5.4	Senzorická analýza	55
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	56
6.1	Stanovení celkové antioxidační aktivity a obsahových látek v ovocných a bylinných čajích	57
6.1.1	Stanovení celkové antioxidační kapacity	57
6.1.2	Stanovení celkových polyfenolů	60
6.1.3	Stanovení celkových flavonoidů	63
6.1.4	HPLC analýza flavonoidů	67
6.1.5	Stanovení látek polyfenolického typu metodou LC-MS.....	75
6.1.6	Stanovení kyseliny L-askorbové.....	76
6.2	Vliv dlouhodobého uchování na obsah účinných látek v čajích.....	78
6.2.1	Vliv uchování čajů na celkovou antioxidační aktivitu.....	78
6.2.2	Vliv uchování čajů na obsah celkových polyfenolů	82
6.2.3	Vliv uchování čajů na obsah celkových flavonoidů	86
6.2.4	Vliv dlouhodobého uchování čajů na obsah jednotlivých zástupců flavonoidů	90
6.3	Stanovení antimutagenních účinků	98
6.4	Seznorická analýza.....	102
7	ZÁVĚRY.....	108
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	110
9	SEZNAM PŘÍLOH.....	113
10	PŘÍLOHY.....	114

1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ABTS	2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazolin sulfonát]
SOD	superoxid dismutáza
CAT	kataláza
GSH-Px	glutathion peroxidáza
GSH-Red	glutathion reduktáza
ROS	reaktivní formy kyslíku
HCAs	heterocyklické aminy
ArOH	fenolové sloučeniny
R-H	lipidy
ROO•	alkylperoxylový radikál
ArO•	fenoxylové (aryloxylové) radikály antioxidantu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
4-NQO	4-N-nitrochinolin-N-oxid
TAS	celková antioxidační aktivita

2 ÚVOD

Rostliny představují důležitý zdroj řady aktivních přírodních produktů, které se mohou výrazně odlišovat strukturou a biologickými vlastnostmi. Mají významnou roli v tradiční medicíně různých zemí. V posledních letech se s příjmem čerstvého ovoce, zeleniny a rostlin bohatých na přírodní antioxidanty spojuje například prevence rakoviny, kardiovaskulárních chorob a dalších závažných civilizačních onemocnění [1].

Volné radikály jsou produkovány v normálním i patologickém buněčném metabolismu. Ve většině živých organismů je oxidace základním procesem získání energie pro další biologické procesy. Nicméně, nekontrolovatelná produkce volných radikálů je jednou z příčin mnoha chorob jako je rakovina, artritida, cirhóza a arteroskleróza, stejně tak může být i příčinou degenerativních procesů spojených se stárnutím. Exogenní chemické a endogenní metabolické procesy v lidském těle nebo v potravním systému mohou produkovat vysoce reaktivní volné radikály, které jsou schopny oxidovat biomolekuly. Výsledkem tohoto působení může být smrt buňky nebo nevratné poškození buněčné tkáně.

Téměř všechny organismy jsou dobře chráněny proti poškození volnými radikály komplexním antioxidačním obranným systémem, jehož součástí jsou enzymy jako superoxiddismutáza (SOD) a kataláza (CAT), nebo nízkomolekulární látky jako je α - tokoferol, kyselina askorbová, karotenoidy, polyfenoly a glutathion [2]. Pokud je posunuta rovnováha mezi reaktivními druhy kyslíku a antioxidanty, nastane oxidační stres, který může vést k trvalému poškození buňky [1]. Vzhledem k tomu, že řada nízkomolekulárních antioxidantů není v lidském organismu syntetizována a musí být přijímána s potravou, je v současné době velká pozornost věnována zdrojům přírodních antioxidantů inhibujících peroxidaci lipidů nebo chránících před škodlivými účinky volných radikálů. Buněčné membrány, které obsahují velké množství fosfolipidů, jako například fosfatidylcholin (lecitin), jsou hlavními cílovými molekulami, na které útočí volné radikály. Tyto radikály indukují peroxidaci lipidů a dochází k chybnému fungování membrány, nastává změna membránové fluidity, navázaných enzymů a funkce receptorů [2].

Antioxidační doplňky stravy nebo potrava obsahující antioxidanty může být použita jako prostředek pro ochranu lidského organismu před oxidačním poškozením. Mnoho druhů ovoce, zeleniny, bylin, cereálií a semen bylo v posledních letech zkoumáno pro svoji antioxidační aktivitu. Byliny a koření jsou obecně bezpečnými zdroji přírodních antioxidantů. Antioxidační aktivita rostlinných tkání je přímo spojována s aktivitou enzymů vylučujících volné radikály a s obsahem antioxidačních látek, hlavně fenolických sloučenin, karotenoidů, tokoferolu a kyseliny askorbové [2].

Epidemiologické studie ukázaly, že se změnou stravovacích návyků a složek potravy se může zmenšit riziko rakoviny. V jídle se vyskytuje mnoho přirozených antimutagenů a antikarcinogenů, které mohou inhibovat jeden nebo více stupňů rakovinného procesu a mohou tímto přímo ochránit člověka před vznikem nádoru [3]. Potrava také obsahuje mnoho mutagenů a karcinogenů, které mohou být rozděleny do tří skupin: přirozeně se vyskytující chemikálie, syntetické sloučeniny a látky vznikající při vaření. První skupina zahrnuje mykotoxiny a rostlinné alkaloidy, zatímco ve druhé skupině se vyskytují potravinová aditiva a pesticidy. Ve třetí skupině jsou polycyklické aromatické uhlovodíky a heterocyklické aminy (HCAs). Heterocyklické aminy jsou mutagenní pro mikroorganismy a eukaryota a jejich prekurzory jsou kreatin a kreatinin, cukry a aminokyseliny v mase [3]. Mutageny

a karcinogeny mohou vzniknout použitím metod pro uchování potravin a vysokou teplotou při vaření.

V několika posledních desetiletích mnoho laboratoří prokázalo antimutagenní a antikarcinogenní aktivitu širokého spektra složek potravy. Se zvýšeným příjmem těchto chemopreventivních látek je možno zlepšit ochranu před poškozením způsobeným genotoxiny nebo karcinogeny. Na druhou stranu neadekvátní množství některých mikronutrientů může být kritické pro stabilitu genomu a zvýšit riziko geneticky podmíněných chorob [4].

Čaj patří k nejrozšířenějším a nejoblíbenějším nápojům na světě a je konzumován v řadě různých variant. Bylinné a ovocné čaje jsou považovány spíše za výluhy. Ovocné čaje mohou pít i děti bez jakéhokoliv omezení a jsou vhodným zdrojem zdraví prospěšného vitamínu C. Bylinné čaje jsou používány ve většině případů spíše jako léčebný prostředek. Cílem předložené práce je studium antioxidačních a antimutagenních vlastností vybraných v české populaci rozšířených typů ovocných a bylinných čajů.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Výzkum léčivých bylin a fytoterapie

V přírodě se nacházejí obrovské zdroje aktivních látek rostlinného původu, jejichž účinky nebyly zdaleka beze zbytku zmapovány. Po celém světě dnes pokračuje hledání rostlin, které by se mohly stát základem nových léků. Tento relativně nový výzkum účinných látek z rostlin dává farmaceutickému průmyslu nesmírně slibné vyhlídky [5].

Složení téměř poloviny všech léků, které v současnosti používáme, a to včetně léků alopatických, je rostlinného původu, přičemž další čtvrtina užívaných léčiv obsahuje rostlinné výtažky nebo mnohé účinné látky získávané přímo z různých léčivých bylin. Až počátkem 19. století se na základě výzkumu tehdejších chemiků pozornost zaměřila na jednotlivé účinné látky rostlin a začaly pokusy o jejich izolování. Od třicátých let 20. století umožňuje pokrok v chemii stále snazší syntetickou reprodukci rostlinných aktivních látek. Při léčbě mnohých nemocí se tak dnes používají nesčetné účinné látky rostlin, občas trochu pozměněné, aby se zvýšila jejich účinnost nebo naopak odstranily vedlejší nežádoucí účinky [5].

Zvyk využívat léčivých vlastností některých rostlin se zrodil v nejstarších známých civilizacích, odkud se rozšířil a přenášel dál. Tak vznikla fytoterapie, která se v průběhu věku rozvinula ve špičkovou lékařskou metodu. Fytoterapie spočívá v léčbě nemocí prostřednictvím rostlin, které jsou podávány v různých podobách. Lékař tak může předepsat nebo doporučit užívání rostlin od zeleniny používané v potravě až po léčivé byliny používané jako takové, nebo se přiklonit k specifickým formám, jako jsou tekuté či suché extrakty nebo destilované výrobky [5].

V současné době lze rostlinné výrobky včetně bylinných čajů zakoupit nejen ve velkých obchodních centrech, ale i v obchodech zdravé výživy, zelených lékárnách a na jiných místech. Jde o takzvané volně prodejné rostliny nebo vyhrazená léčiva. Jako takové mohou být prodávány ve formě bylinných čajů, přičemž se povolení vztahuje i na některé směsi [5]. Má-li být fytoterapie účinná, je třeba při předepisování čaje uvažovat nejen o stavu choroby, ale posoudit i sílu a působení rostlinných druhů, citlivost nemocného na léky, jakož i chuťovou povahu léku. Výluh z vegetativních drog nelze považovat za primitivní nebo banální léčivo. Přihlédne-li se k obsahovým látkám, kterými rostlina disponuje, jsou to často léčiva značně složitá [6].

3.2 Bylinné a ovocné čaje

Byliny dokáží léčit téměř všechny zdravotní obtíže. Používají se formou nálevů, odvarů, tinktur, mastí, čajů atd. Právě léčba pomocí bylinných čajů patří již po staletí mezi nejrozšířenější způsoby pozitivního ovlivňování zdravotního stavu. U čaj určeného k léčbě konkrétních obtíží je důležité zastoupení hlavních bylinných složek, které jsou schopny účinně ovlivnit zdravotní stav. Některé bylinné čaje významně posilují obranyschopnost organismu, podporují správnou funkci trávení a detoxikují organismus a bojují proti působení volných radikálů [7].

Ovocné čaje se stávají stále oblíbenějšími. Jejich spotřeba roste ve vyspělých zemích světa rychleji než spotřeba čajů černých nebo zelených. První pokusy s pitím ovocných čajů

podobným těm dnešním začaly v 50. letech v západní Evropě, jejich rozmach však přišel teprve v létech sedmdesátých. Ovocné čaje jsou vhodné pro celou populaci včetně malých dětí, poněvadž neobsahují kofein, žádné povzbuzující látky ani přidaný cukr či kalorie. Jsou produkovány na čistě přírodním základu a lze je pít bez omezení - ideálně hasí žízeň a osvěží. Navíc často obsahují vitamin C, který působí jako významný antioxidant. Paleta ovocných směsí se v posledních letech velmi rozšířila. Používáním různých aromat se potom tyto možnosti dále posouvají. Na rozdíl od čajů černých nebo zelených není původ ovocných čajů v čajovníku, nejde tedy o pravý čaj. Ovocné čaje se nejčastěji skládají ze čtyř základních komponent: ibišku, šípku, pomerančové kůry a sušeného jablka, další přísady a příchutě jsou přidávány za účele výroby dalších specifických ovocných čajů a směsí [8].

3.2.1 Příprava čajových nálevů

Čajové nápoje je nutno připravovat se zvláštní pozorností a je třeba dbát, aby do nálevu přešlo pokud možno nejvíc účinných látek a co nejméně nežádoucích látek. Důležitá je zejména teplota. Těkavé látky, např. silice, při vyšší teplotě vyprchají a léčivý nápoj je potom neúčinný. Nelze například za varu připravovat čaj z máty, heřmánku, šalvěje, mateřídoušky a jiných siličných bylin. Vodné výluhy obyčejně nepřijímají účinné látky v celém rozsahu, a proto se dříve s oblibou užívaly rozmělněné drogy smíchané s malým množstvím vody nebo čaje [6].

Čaje se mohou sladit cukrem nebo medem jen tehdy, nevyklučuje-li to povaha nemoci. Při střevních nemocech se nedoporučuje přidávat cukr a je-li čaj správně chuťově vyvážený, není slazení nutné [6].

Bylinný čaj není vhodné připravovat ani uchovávat v kovových nádobách, což platí zejména u bylin s vysokým obsahem tříslovin. Kov může ovlivnit nejen některé obsahové látky, ale i vůni a vzhled nápoje. Nejvhodnější k přípravě čajů jsou skleněné kádinky nebo nádoby porcelánové a nepoškozené smaltované [6].

Čaj lze připravit třemi způsoby:

1. Macerát, výluh drogy za studena. Připravuje se tehdy, když se přítomné látky varem rozkládají. Byliny se přelijí šálkem vody a ponechají se 3 - 12 hodin stát [6].
2. Nálev je zpravidla za tepla získaný vodný výluh bylin. Bylina se přelije vroucí vodou, nádoba se přikryje a na teplém místě nechá stát asi 15 minut [6].
3. Odvar je zpravidla za varu získaný vodný výluh bylin. Rostlinné části se přidají do příslušného množství vody obyčejné teploty a v přikryté nádobě se zahřejí do varu na 10 -15 minut. Čaj s bylinkou se ponechá ještě čtvrt hodiny stát [6].

3.2.2 Charakteristika vybraných bylinných čajů

Meduňka lékařská (*Melissa officinalis*)

Navozuje klid, příjemný spánek a dobré zažívání. Četnými výzkumy byly prokázány protikřečové účinky rostliny a její účinnost při zažívacích potížích. Silice působí protivirově a protiplísňově [5].

Použití: Užívá se především při nervově podmíněných poruchách žaludečního a střevního traktu, při poruchách zažívání spojených s plynatostí a kolikami, při poruchách pohybu žlučových cest, při protibakteriální léčbě hnilobných a kvasných procesů ve střevech [9].

Obsahové látky: Silice (hlavně s obsahem citronelalu, citralu, citronelolu, geraniolu, linalolu), triterpeny, organické kyseliny, polyfenoly (flavonoidy a fenolové kyseliny, především kyselina rozmarýnová).

Sbíraná část: nať, list.



Obr. 1: Meduňka lékařská [9]

Lípa malolistá (*Tilia cordata*)

Snižuje riziko vzniku řady onemocnění. Vyniká protizánětlivými vlastnostmi, působí potopudně, rozpouští hlen [9].

Použití: používá se jako potopudný prostředek při nachlazení, zánětech horních dýchacích cest a horečce. Zvyšuje vylučování moči a žaludečních šťáv a zlepšuje trávení [9]. Vnitřně je květ předepisován na nepřilíš závažné spánkové potíže. Zevně je doporučován jako hojivá a protizánětlivá látka [5].

Obsahové látky: flavonoidy (quercitrin, tilirosid, hesperidin), v malém množství silice, sliz a třísloviny.

Sbíraná část: květ (květenství).



Obr. 2: Lípa malolistá [9]

Heřmánek pravý (*Chamomilla recutita*)

Příznivě ovlivňuje zažívání, zevně lze použít jako kloktadlo, dále k omývání a obkladům, ke koupelím a výplachům [9].

Použití: používá se jako protizánětlivý prostředek při žaludečních a střevních potížích, při zánětech ústní dutiny, při léčbě infikovaných sliznic a kůže, při zánětech očních spojivek, pohlavního ústrojí, jako pomocný prostředek při léčbě žaludečních vředů [9].

Obsahové látky: silice (složkami jsou chamazulen, alfa-bisabolol, jeho A a B oxidy, dicykloétery, sesquiterpeny), kumariny (umbelliferon, herniarin), sliz, flavonoidy (apigenin), sesquiterpenické laktony.

Sbíraná část: květ.



Obr. 3: Heřmánek pravý [10]

Máta peprná (*Mentha piperita*)

Mátový čaj je jedním z nejužívanějších čajů z léčivých rostlin vůbec. Mírní nadýmání, působí příznivě na vylučování žaludečních šťáv a žluče. Čaj z máty peprné příjemně chutná po své hlavní složce – mentolu [9]. Rostlina je velice účinná při léčbě křečí zažívacího ústrojí díky silici a flavonoidům, které obsahuje, má také antioxidační účinky [5].

Použití: léčebný účinek drogy spočívá především v silici a její složce – mentolu, který působí zevně jako prostředek potlačující citlivost nervových zakončení (vyvolává pocit chladu). Důležitý je účinek drogy na tvorbu a vylučování žluče; pro obsah mentolu je účinná antisepticky a protizánětlivě, pro obsah tříslovin i antidiarhoicky. Využívá se jako chuťové korigens (zubní pasty, kloktadla, ústní vody, žvýkačky) [9].

Obsahové látky: silice (0,5-4%, běžně 0,8-1,2%, obsahuje mentol, menton, mentofuran), třísloviny, flavonoidy, triterpeny a organické kyseliny, fenolové kyseliny (kyselina rozmarýnová a deriváty kyseliny kofeinové).

Sbíraná část: list, nať.



Obr. 4: *Máta peprná* [9]

Růže šípková (*Rosa canina*)

Šípkový čaj je zdrojem vitamínu C, karotenů a dalších látek, které příznivě ovlivňují odolnost organismu proti nepříznivým vlivům prostředí. Účinné látky šípků působí příznivě například při jarní únavě [9]. Vzhledem k bohatství taninů je šípek používán jako svíravý a protiprůjmový přípravek. Obsah pektinů a organických kyselin vysvětluje jeho močopudný účinek [5].

Použití: zdroj vitaminů, diuretikum, diaforetikum. Kyselina askorbová nepůsobí jenom jako antiskorbutikum (při krvácení z dásní), resp. při jarní únavě, ale má všeobecný biologický význam. Působí při různých enzymových procesech v organismu a zvyšuje imunitu a přirozenou odolnost organismu proti infekcím [9].

Obsahové látky: třísloviny (taniny), pektin, sacharidy, sorbitol, vitamin C (až 1,7%), kyselina jablečná, kyselina citronová.

Sbíraná část: plod



Obr. 5: *Růže šípková* [11]

Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*)

Používá se při lehkých až středně těžkých depresivních stavech, dále při napětí, úzkosti, strachu, rozladech nejrozmanitějšího původu, poruchách trávení, klimakterických obtížích [9]. Použití: používá se k uvolnění křečí trávicího ústrojí, žlučových cest a hladké svaloviny tepen při zánětech žaludku a střev, ke zvýšení tvorby žaludečních šťáv a při trvale špatném zažívání. Dále jako mírný močopudný prostředek, k uklidnění při neurózách, depresích a melancholiích, při různých nervových poruchách a při migréně [9]. V poslední době vzbudily pozornost psychotropní účinky třezalky: antidepresivní působení rostliny je zřejmě vyvoláno červeným fluoreskujícím barvivem hypericinem [5].

Obsahové látky: malé množství silice (0,6-3 ml/kg), triterpeny, steroly, fenolické látky: kyselina kávová, kyselina chlorogenová, proanthocyanidiny, prenylované deriváty phloroglucinolu (hyperforin, adhyperforin), flavonoidy (2-4%, hyperin, rutin, quercitrin, isoquercitrin), biflavonoidy, barviva - naftodiantrony (hypericin, vzniká z emodin anthronu přes pseudohypericin).

Sbíraná část: nať, květ.



Obr. 6: Třezalka tečkovaná [12]

Mateřídouška obecná (*Thymus serpyllum*)

Blahodárné účinky mateřídoušky jsou známy již odnepaměti. Čaj je vhodným nápojem v období s vyšším výskytem onemocnění horních cest dýchacích, dále příznivě ovlivňuje zažívání a zlepšuje kvalitu spánku [9]. Existuje jen málo prokazatelných farmakologických údajů či klinických studií týkajících se mateřídoušky. Přesto jsou antispasmatické a antiseptické vlastnosti této rostliny prověřené praxí [5].

Použití: podává se při poruchách trávení spojených s plynatostí a kolikami, ke zvýšení vylučování žaludečních šťáv. Obsahové látky zvyšují sekreci hlenu v dýchacích cestách, dezinfikují sliznice a uplatňují se při zánětech průdušek [9].

Obsahové látky: silice (různé složení podle taxonu a sběru z lokality - převládá thymol, karvakrol, linalol, terpineol), třísloviny, hořčiny, flavonoidy.

Sbíraná část: nať, list, květ.



Obr. 7: *Mateřídouška obecná* [9]

Kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*)

Působí příznivě na metabolickou výměnu a dezodoračně. Zevně se používá jako součást péče o vlasy, především při mastné pokožce [9]. Listy kopřivy jsou močopudné. Kořeny působí proti zánětům, stimulují vznik lymfocytů a brání bujení prostaty [5].

Použití: podporuje celkový metabolismus organismu. Často tvoří složku protirevmatických, metabolických, diuretických, hemoroidálních i expektoračních čajovin. Používá při dlouhotrvajících chorobách, při poruchách výživy, ke zvýšení obnovy tkání, jako močopudný prostředek při zánětech močových cest, tvorbě kamenů [9].

Obsahové látky: kopřiva obsahuje chlorofyl, skupinu vitaminů, karotenoidy, kyselinu listovou, minerální látky (vápník, hořčík, křemík, železo, hořčík), kyselinu šťavelovou, kyselinu kofeinovou a chlorogenovou.

Sbíraná část: list, nať, kořeny.



Obr. 8: *Kopřiva dvoudomá* [9]

Tymián obecný (*Thymus vulgaris*)

Tymián zbavuje svalových bolestí: tento účinek je připisován flavonoidům. Jeho silice je antiseptická: tato vlastnost byla ověřena laboratorně na různých houbách, plísňích a bakteriích. Působí i protikřečově [5].

Použití: hlavní složka silice – thymol je účinné antiseptikum, uplatňuje se při chorobách horních cest dýchacích z nachlazení a dále při poruchách zažívání, v zubním lékařství, při výrobě past a ústních vod, jako prostředek odstraňující zápach. Je však při dlouhodobém užívání nebo nepřiměřených dávkách toxický, poškozuje štítnou žlázu, proto se v těhotenství nedoporučuje užívat [9].

Obsahové látky: silice (5-25 ml/kg, hlavními složkami jsou podle chemotypů linalool, thymol, karvakrol), flavonoidy, (luteolin, apigenin, jejich glykosidy), triterpeny, fenolové kyseliny, sacharidy.

Sbíraná část: nať, kvetoucí lodyha.



Obr. 9: Tymián obecný [9]

Jitrocel kopinatý (*Plantago lanceolata*)

Iridoidy obsažené v jitroceli mají prokazatelný protizánětlivý účinek: účinné jsou v tomto směru výtažky připravené za studena. U člověka byl úspěšný vodný roztok při léčbě chronické bronchitidy [5].

Použití: droga se používá při zánětu sliznic hltanu a ústní dutiny, jako prostředek proti kašli, zvyšující zároveň vylučování hlenu při léčbě žaludečních vředů bez vylučování kyseliny, jako protibakteriální prostředek při zánětlivých střevních chorobách spojených s poruchami zažívání [9].

Obsahové látky: iridoidy (aukubin), flavonoidy, fenolické kyseliny, sliz.

Sbíraná část: list.



Obr. 10: *Jitrocel kopinatý* [13]

Divizna velkokvětá (*Verbascum densiflorum*)

U divizny velkokvěté byly prokázány nejrůznější účinky. Slizy přítomné v rostlině zmírňují bolesti a působí protizánětlivě. Saponiny spolu s flavonoidy podporují sekreci histaminu, jenž působí jako mediátor některých nerovnovážených spojů a ovlivňuje vznik alergií [5].

Použití: sliz, obsažený v droze mírně dráždí horní cesty dýchací, flavonoidy a saponiny reflektoricky zvyšují bronchiální sekreci. Divizna se používá při suchých zánětech horních cest dýchacích, při nemocech z prochládnutí spojených s dráždivým, neproduktivním kašlem, při zánětech jícnu, případně žaludku a střev, jako pomocný prostředek při poruchách zažívání spojených s průjmy [9].

Obsahové látky: polysacharidy (kyselina uronová, galaktóza a arabinóza), sliz, flavonoidy, saponiny, iridoidy (aukubin, catalpol), glykosidy lignanů.

Sbíraná část: květ bez kalicha.



Obr. 11: *Divizna velkokvětá* [9]

Bez černý (*Sambucus nigra*)

Čaj z květu černého bezu působí příznivě na horní cesty dýchací, podporuje pocení. Je vhodný v období zvýšeného výskytu onemocnění horních cest dýchacích [9].

Použití: bylina se používá jako potopudný prostředek při nemocech z nachlazení, jako močopudný prostředek (zejména v dětské praxi a při léčbě seniorů) a ke zvýšení tvorby mléka u kojících žen [9]. Zevně se používá při léčbě zánětu hrtanu, hltanu a sliznice ústní dutiny. Sirup z plodů pročišťuje organismus a podporuje pocení [5].

Obsahové látky: flavonoidy (rutin, isoquercitrin), fenolické kyseliny, deriváty kyseliny kávové, silice (triterpeny), mastné kyseliny, dusičnany draslíku

Sbíraná část: květ se stopkou, kůra, plod.



Obr. 12: Bez černý [9]

Jablečnick obecný (*Marrubium vulgare*)

Díky hořčinám, především diterpenickému marrubiinu, má jablečnick účinek usnadňující trávení a obecně tonizující účinek. Kvetoucí vrcholky rostliny působí proti kašli, rozpouštějí hleny a usnadňují odkašlávání [5].

Použití: bylina má expektorační a sekretolytické působení, zvyšuje sekreci bronchů dýchacích cest, přitom nedráždí na zvracení. Zvyšuje funkci jater a v přiměřených dávkách příznivě působí při nepravidelném srdečním rytmu jako kardiosedativum. Nejčastěji se používá při onemocnění dýchacích cest a protože obsahuje hořčiny, které podporují vylučování žluče, bývá složkou žlučnickových čajovin, k povzbuzení chuti k jídlu, ke zlepšení trávení [9].

Obsahové látky: stopy silice, flavonoidy (flavonové glykosidy), diterpeny (marrubiin).

Sbíraná část: nať.



Obr. 13: Jablečník obecný [14]

3.2.3 Ovocné čaje

Černý rybíz (*Ribes nigrum*)

Mnoho výzkumů na zvířatech prokázalo, že listy působí na snížení krevního tlaku (pravděpodobně díky flavonoidům) a proti zánětům [5].

Použití: list je předepisován jako pročišťovací prostředek a v případě cévních zánětů a infekce močových cest. Nejvíce je však bezpochyby užíván při revmatických obtížích, kdy se černý rybíz zpravidla přidává do směsí dalších rostlin. Plod bývá součástí léků pomáhajících při cévní nedostatečnosti [5]. Flavonoid sakuranetin má prokázané fungicidní účinky. Plod rybízu černého napomáhá látkové výměně, je zdrojem vitaminů, bývá součástí jarních bylinných kúr, používá se i při léčbě dny [9].

Obsahové látky: plody jsou bohaté na sacharidy a organické kyseliny, flavonové glykosidy, anthokyany. Listy obsahují flavonoidy (hyperin, astragalin), malé množství silice, prodelfininy. Sbíraná část: plod, list.

Složení rybízového čaje: sušený květ ibišku, sušené plody šípku, sušená jablečná dužina, pomerančová kůra, sušené plody černého bezu, jeřabiny, černého rybízu (3%)



Obr. 14: Rybíz černý [15]

Borůvka černá (*Vaccinium myrtillus*)

Borůvka je často předepisována při léčbě lymfatické a žilní nedostatečnosti. Posiluje křehké krevní kapiláry, užívá se také při hemeroidech a v gynekologii [5].

Použití: v oftalmologii se používá pro svoji schopnost léčit některé poruchy vidění [5]. Borůvkové plody se používají při zánětlivých procesech v zažívacím ústrojí, spojených s průjmy, ke kloktání a výplachům ústní dutiny a jako pomocný prostředek při léčbě cukrovky – antokyany chrání stěnu vlásečnic, zejména v očním pozadí a zlepšují obnovu oční sítnice. Antokyany z listů mají protikřečové účinky, třísloviny působí svíravě a dezinfekčně, jednoduché fenoly brání růstu bakterií a působí protizánětlivě, flavonoidy působí močopudně a glukokininy snižují obsah cukru v krvi [9].

Obsahové látky: cukry, tuky, organické kyseliny, fenolové kyseliny, flavonoidy (hyperin, quercitrin), proanthocyanidiny, flavanoly (katechin, epikatechin), antokyany.

Sbíraná část: plod, nať, list.

Složení borůvkového čaje: sušený květ ibišku, sušená jablečná dužina, sušené plody šípku, pomerančová kůra, sušené plody trnky, jeřabiny, borůvky (3%), aroma



Obr. 15: Borůvka černá [16]

Citron – citroník limonový (*Citrus limon*)

Flavonoidy obsažené v plodu a listu snižují krevní tlak a zvyšují odolnost vlásečnic. Mají protialergické a protizánětlivé účinky. Stejně tak bylo prokázáno, že pravidelné pití citronové, ale také pomerančové a grepfruitové šťávy zvyšuje obsah kortikosteronu v krvi. Silice koncentrovaná v limonenech a citranech působí výrazně proti infekcím [5].

Použití: pravidelné pití citronové šťávy je velice účinnou léčbou arteriosklerózy a navíc významně zvyšuje pružnost žil a kapilár. Doporučuje se jako prevence a léčba rýmy, chřipky, angíny a zánětu horních cest dýchacích [5].

Obsahové látky: vitamin C, flavonoidy (v listech), karotenoidy, kumariny, monoterpeny a seskviterpeny (80% limonen), citrany.

Sbíraná část: plod, list.

Složení citronového čaje: sušená jablečná dužina, sušený květ ibišku, citrónová kůra (20%), sušené plody šípku, trnky, aronie (druh černého jeřábu), pomerančová kůra, aroma



Obr. 16: Citroník limonový [17]

Ibišek súdanský (*Hibiscus sabdariffa*)

Používá se jako barvivo a aromatikum do čajovinových směsí a osvěžujících nápojů (např. do čajovin se šípky a pod.), kterým dodává výrazně červenou barvu a kyselější chuť. V Africe se ibišek tradičně používá jako spasmolytikum, antibakteriální prostředek a antioxidant [9].

Obsahové látky: polysacharidy, fenolické látky, anthokyany, organické kyseliny (citronová, jablečná, vinná, askorbová).

Sbíraná část: květ.



Obr. 17: Ibišek súdánský [9]

Jabloň (*Malus domestica*)

Použití: metabolikum - obsahuje vlákninu, upravuje zažívání, používá se do čajových směsí k hubnutí, zdroj vitamínu C [9].

Obsahové látky: vitamin C, organické kyseliny, cukry, polysacharidy.

Sbíraná část: plod.



Obr. 18: Jabloň [9]

Do této části kapitoly o ovocných čajích byly zařazeny čaje s velkým obsahem jablečné dužiny, ibišku súdánského a šípku, tyto složky se u ovocných čajů používají především jako plnidlo a jako přírodní barvivo.

Jablko jadernička

Složení jablečného čaje – Jablko jadernička: jablečná dužina 77%, plody šípku, přírodně identické aroma jablka, pražený kořen čekanky, kořen lékořice, kyselina jablečná, skořice.

Apple & Cinnamon Twist

Složení jablečného a skořicového čaje – Apple & Cinnamon Twist: jablečná dužina (29%), skořice (24%), borůvkové listí, aromatické látky, kyselina mléčná, lékořice, ibiškový květ, pražený čekankový kořen, jablečná šťáva (1,1%), plod šípku.

Višeň

Složení višňového čaje: jablko, ibišek, kyselina citrónová, aroma, šípek, višňová vláknina (1%), pomerančové oplodí.

Pomeranč

Složení pomerančového čaje: jablečná dužina, kyselina citrónová (kyseliny), květ ibišku súdánského, čekanka, kyselina jablečná (kyseliny), aroma pomerančové a grepové, pomerančová kůra 1%.

Hruška máslovka

Složení hruškového čaje: jablečná dužina, plody šípku, sušený plod hrušky 5%, pražený kořen čekanky, přírodně identické aroma hrušky, kořen lékořice, kyselina citrónová, skořice.

Ovocná směs

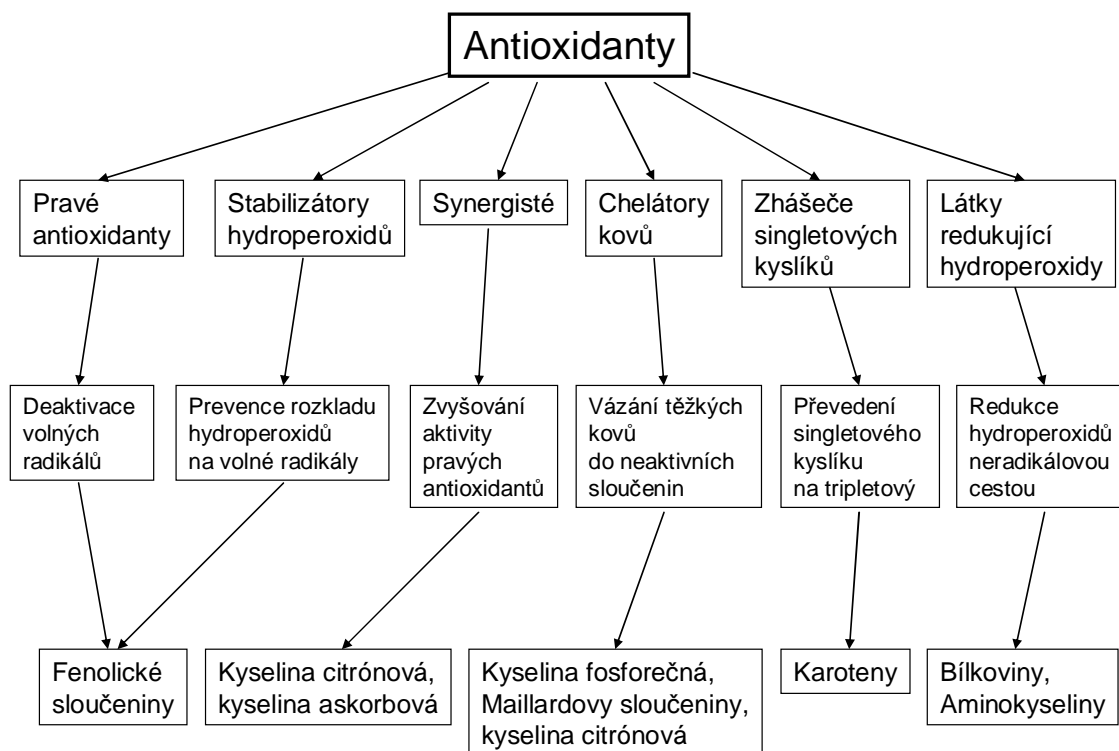
Složení čaje Ovocná směs: sušená jablečná dužina, sušený květ ibišku, pomerančová kůra sušené plody šípku, trnky, černého bezu, aronie (druh černého jeřábu), jeřabiny, maliny (1%), borůvky (1%), jahody (1%), ostružiny (1%) aroma.

3.3 Antioxidační aktivita přírodních látek

3.3.1 Účinek antioxidantů a rozdělení podle mechanismu působení

Jednou z metod ochrany potravin před oxidací je použití specifických látek, která inhibují oxidaci. Tyto látky se správně nazývají inhibitory oxidace, ale v dnešní době jsou většinou nazývány jako antioxidanty. Tyto inhibitory reprezentují skupinu látek, které se velmi liší chemickou strukturou a mají rozdílný mechanismus působení. Jedním z nejdůležitějších mechanismů působení je reakce s volnými radikály a tvorba inaktivních produktů [18].

Obvykle antioxidanty reagují s alkoxy- a peroxyradikály tvořenými rozkladem lipidových hydroperoxidů. Jiné inhibitory stabilizují hydroperoxydy a zabraňují jejich rozkladu na volné radikály. Rozklad hydroperoxidů je katalyzován těžkými kovy, tudíž chelatační činidla také inhibují oxidaci. Některé látky zvané synergisté samy neprojevují antioxidační aktivitu, ale mohou zvyšovat aktivitu pravých antioxidantů. Jiná skupina látek rozkládá hydroperoxydy neradikálovou cestou a tím snižuje obsah volných radikálů. Také singletový kyslík oxiduje látky mnohokrát rychleji než běžný triplexový kyslík a proto mají zhášeče singletových kyslíků také důležitý inhibiční efekt na oxidaci potravin [18]. Na následujícím obrázku je znázorněno obecné rozdělení antioxidantů podle způsobu inhibice oxidačních látek.



Obr. 19: Rozdělení antioxidantů podle jejich účinku působení

3.3.2 Antioxidanty v bylinných a ovocných čajích

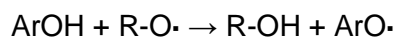
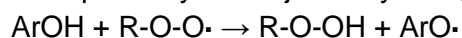
Chemická povaha a aktivita přírodních antioxidantů v ovoci, zelenině, cereáliích, bylinách a jiných potravinách je studována v současné době v řadě výzkumných týmů na celém světě. Většina antioxidantů izolovaných z vyšších rostlin jsou polyfenoly, které mají antibakteriální, antialergické, antikarcinogenní, protizánětlivé, antivirové a imunostimulační účinky. Antioxidační aktivita polyfenolů je především způsobena jejich redoxními vlastnostmi, které jim dovolují působit jako činidlo, donory vodíku a zhášecí singletových kyslíků. Také mají vlastnosti podporující tvorbu chelátů s kovy. Antioxidační efekt rostlinných fenolů byl studován ve vztahu k prevenci srdečních chorob, rakoviny a degenerativních mozkových poruch souvisejících s biologickým stárnutím [19].

Přestože byla dosud realizována řada studií zaměřených na analýzu zastoupení a biologické aktivity antioxidantů v čajích, bylinných a ovocných odvarech, detailní profil struktury a působení fenolických látek přítomných v bylinných odvarech není zdaleka uzavřenou problematikou [19].

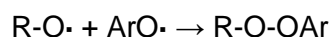
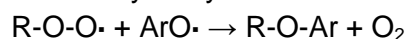
3.3.3 Mechanismus působení polyfenolů – radikálové reakce

Fenolové sloučeniny (ArOH) mohou jako primární antioxidant interferovat s oxidací lipidů (R-H) v kompetitivní reakci k propagační fázi autooxidační reakce tím, že reagují s radikály hydroperoxidů (ROO·) nebo alkoxylovými radikály (RO·) vzniklými oxidací lipidů a poskytují jim atom vodíku, čímž přerušují řetězovou radikálovou reakci [20].

Jako produkty vznikají fenoxylové (aryloxylové) radikály antioxidantu:



Tyto radikály reagují s volným hydroperoxylovým nebo alkoxylovým radikálem oxidované mastné kyseliny v terminační fázi reakce.



Fenoxylové radikály nesmí ovšem vstupovat do řetězové radikálové reakce ani iniciovat štěpení dalších molekul lipidů. K těmto reakcím může docházet při vysokých koncentracích antioxidantu, který potom působí jako prooxidant [20].

Relativní stabilita a malá reaktivita fenoxylových radikálů souvisí s delokalizací nepárového elektronu v aromatickém systému. Fenoxylový radikál je proto těžko atakovatelný vzdušným kyslíkem. Samostatný fenol je jako antioxidant neúčinný, avšak substituce alkylovými skupinami v o- nebo p-poloze zvyšuje konjugačním efektem hustotu elektronů na skupině OH a zvyšuje tak schopnost fenolu reagovat s volnými radikály [20].

3.3.4 Polyfenoly

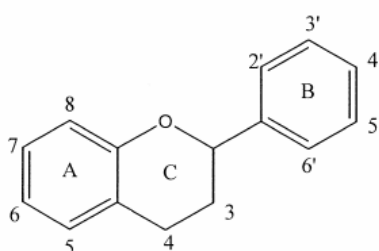
Fenolické látky, obecně nazývané jako polyfenoly, jsou přítomny ve všech rostlinách a proto se vyskytují také v naší stravě. Existuje kolem 8000 identifikovaných fenolových struktur. Tyto sloučeniny se liší strukturně a mohou se vyskytovat jak v jednoduché formě (fenolová kyselina s C6 kruhem), tak jako polymery (např. tanniny). Je známo více než deset tříd polyfenolů, které se od sebe liší na základě struktury. Flavonoidy jsou nejběžnější fenolické látky, které se vyskytují v rostlinné stravě. Ačkoliv jsou polyfenoly přítomny ve všech rostlinných potravinách, jejich hladina se liší u různých druhů stravy a celkový příjem závisí na typu a množství rostlinné stravy v naší dietě [21].

Většina polyfenolů také projevuje antimikrobiální aktivitu. Některé studie se zabývají efektem polyfenolů na patogenní mikroorganismy v zažívacím traktu, ačkoliv zde existuje spor o tom, které bakteriální druhy jsou inhibovány antioxidanty. Tolerance bakterií k polyfenolům závisí na druhu bakterií a struktuře polyfenolů [22].

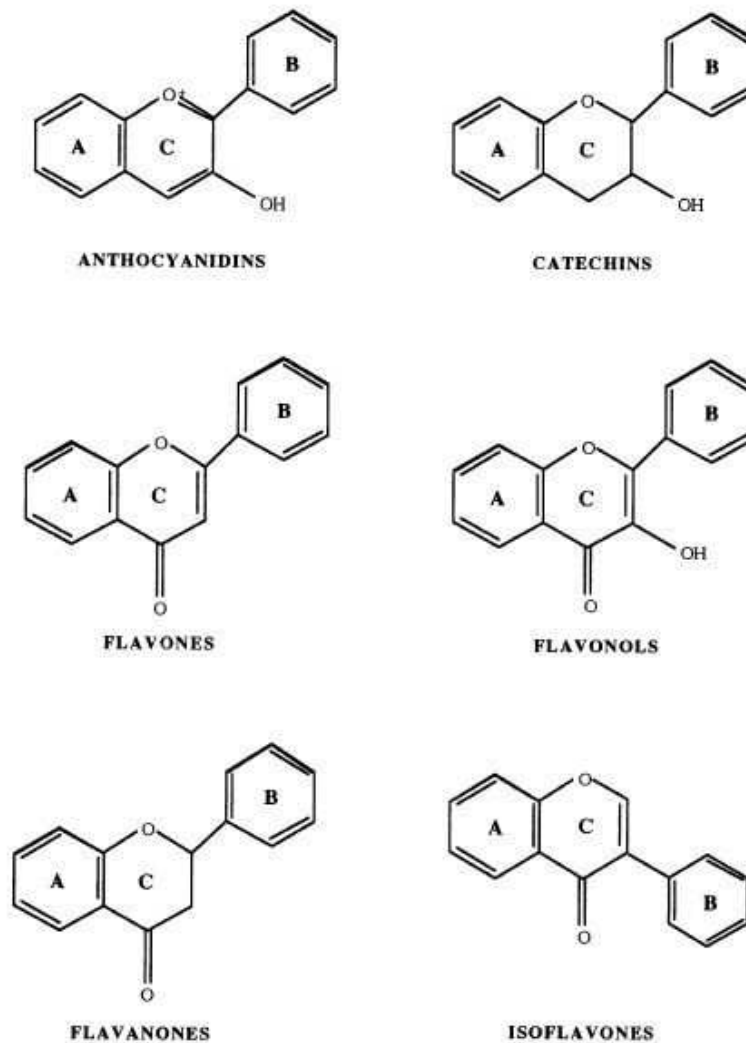
3.3.5 Flavonoidy

Flavonoidy jsou sekundární metabolity velmi rozšířené zejména v rostlinné říši. Mohou být rozděleny do šesti tříd: flavony, flavonony, isoflavony, flavonoly, flavanoly (katechiny) a anthokyandiny. Struktura a konformace těchto látek je založena na heterocyklickém kruhu s kyslíkem. Hlavní třídy flavonoidů v čaji jsou flavanoly a flavonoly [23].

Chemická povaha flavonoidů závisí na strukturní třídě, stupni hydroxylace, jiných substitucích a konjugací a stupni polymerizace. V rostlinách jsou relativně odolné proti teplu, kyslíku a suchu. Fotostabilita flavonoidových molekul závisí na povaze hydroxylové skupiny napadající C3 kruhu C. Nepřítomnost nebo glykosylace této hydroxylové skupiny způsobuje vyšší fotostabilitu molekuly. S výjimkou katechinů se flavonoidy nevyskytují v rostlinách jako aglykony. Nejčastěji se vyskytující formy jsou deriváty glykosidů. Glykosylace zapříčiňuje zvýšení polarity flavonoidové molekuly, což je nezbytné pro uchování flavonoidů v buněčné vakuole rostliny [24].



Obr. 20: Základní struktura flavonoidů [23]



Obr. 21: Hlavní třídy flavonoidů [24]

Flavonoidy mohou projevovat svoji antioxidační aktivitu několika způsoby. Mohou přímo zachytávat některé radikály a tím působit jako antioxidanty zastavující řetězové reakce. Mohou potlačovat peroxidaci lipidů recyklací jiných antioxidantů, jako je alfa-tokoferol, poskytnutím vodíkového atomu molekule tokoferolu. Navíc některé flavonoidy mohou chelatovat prooxidační kovové ionty, jako je železo a měď a tím zabraňovat tvoření volných radikálů z těchto prooxidantů [21].

Volné radikály vyskytující se v prostředí mohou iniciovat řetězové reakce, které způsobují oxidační poškození citlivých biologických struktur, jako je R-O-OAr nebo buněčné membrány. Následkem těchto reakcí může být vznik rakoviny, srdečních chorob, roztroušené sklerózy a autoimunitních chorob. Bylo dokázáno, že flavonoidní látky v čaji mají velmi silné antioxidační vlastnosti a schopnost zachycovat volné radikály. Jsou mnohem efektivnější v ochraně buňky před poškozením volnými radikály než vitamin C a E [23].

Rozložení flavonoidů v rostlinách závisí na mnoha faktorech, přítomnost flavonoidů se mění s druhem, řádem a čeledí rostlin. Distribuce závisí na dostupnosti světla a na předchozím osvětlení, protože tvorba vyšších oxidovaných flavonoidů je urychlována

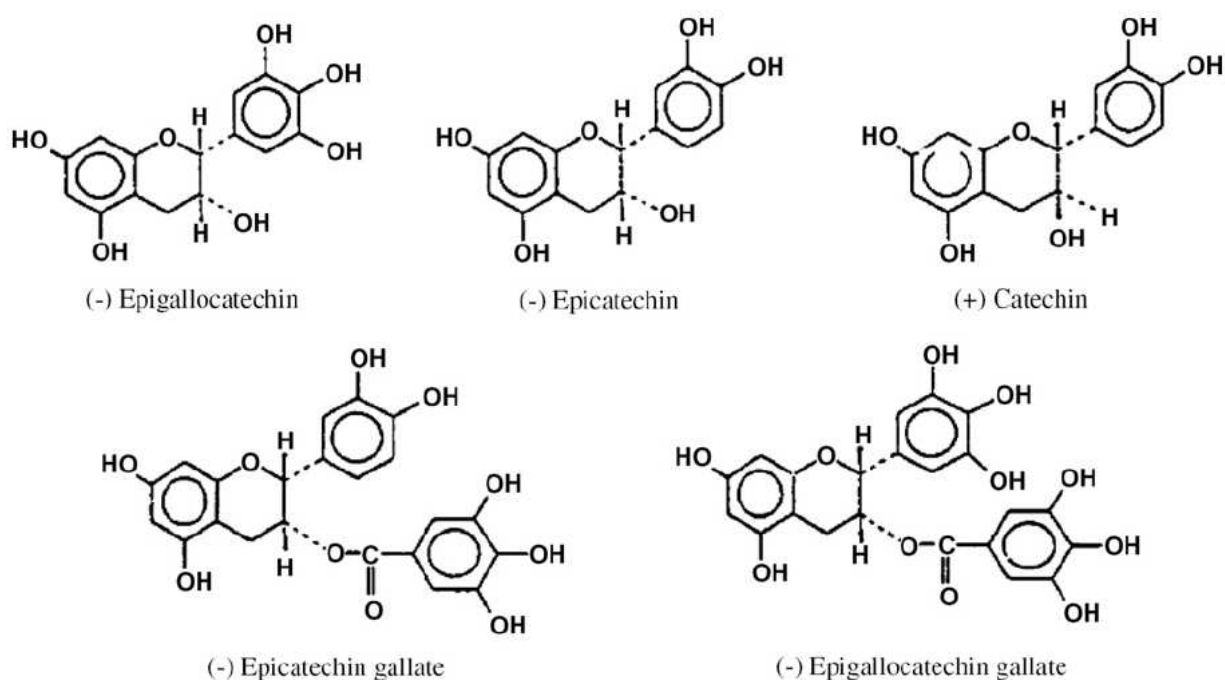
světlem. V listové zelenině a ovoci jsou flavonoly téměř výhradně přítomny jako glykosidy. Flavonolové glykosidy jsou přítomny hlavně v listech, květech svrchních částech rostliny, jako je kůra a klesá směrem dovnitř. Jenom stopová množství flavonoidů jsou přítomna částech rostliny pod zemí [24].

Příjem čajových flavonoidů se může velmi lišit v závislosti na typu čaje, konzumovaných čajových produktů a na metodě přípravy čaje. Velikost čajových lístků a extrakční povrch se zdá být důležitý ve vztahu k obsahu flavonoidů v čaji. Velikost částic vysvětluje viditelné rozdíly mezi čaji připravenými z porcovaných čajů nebo sypaných. Odvary připravené z porcovaných čajů mají vyšší obsah flavonoidů ve srovnání s extrakty připravenými ze sypaných čajů [24].

3.3.5.1 Flavanoly - katechiny

Katechiny jsou strukturně především flavanoly a mohou tvořit až 30% váhy suchého čaje. Jsou to bezbarvé, ve vodě rozpustné látky, které způsobují hořkost a trpkost čajových nálevů. Nejdůležitějšími katechiny jsou (-)-epigallokatechin gallát, (-)-epigallokatechin, (-)-pikatechin gallát a (-)-epikatechin [23].

Všechny katechiny čaje nemají stejnou aktivitu. Estery kyseliny gallové jsou mnohem reaktivnější než negallované katechiny, je to způsobeno jejich nižším redoxním potenciálem. Některé katechiny, jako například epikatechin gallát, však byly shledány méně účinnými antikarcinogeny, ačkoliv vykazovaly synergistický efekt s ostatními katechiny [23].

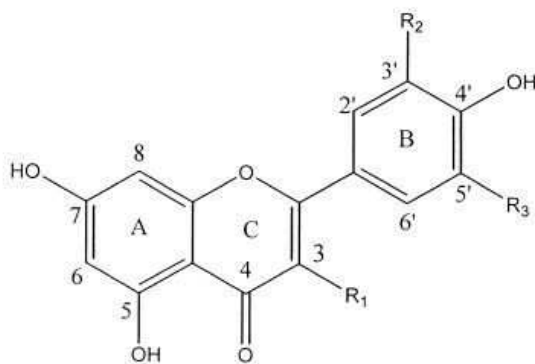


Obř. 22: Struktura hlavních katechinů čaje [22]

3.3.5.2 Flavonoly

Nejdůležitějšími flavonoly v čaji jsou quercetin, kaempferol a myricetin. Tvoří 2-3% vodného extraktu čaje. Flavonoly se častěji vyskytují jako glykosidy než v neglykosylované formě (aglykony). Cukerná část flavonolu může být glukóza, rhamnóza, galaktóza, arabinóza a fruktóza. Flavonolové aglykony jsou přítomny v čajích v zanedbatelném množství kvůli jejich malé rozpustnosti ve vodě [24]. U quercetinu, kaempferolu a myricetinu byla prokázána schopnost inhibovat růst nádorů vyvolaných vlivem karcinogenu u krys a myši [24].

Rutin a některé další glykosidy flavonoidů vykazují antioxidační schopnosti, mají vliv na pružnost a permeabilitu krevních kapilár. Rutin (dříve vitamin P) se proto používá ve farmaceutických preparátech a potravních doplncích. Spolu s některými flavonoidními látkami zvanými bioflavonoidy zvyšuje hladinu askorbové kyseliny v různých živočišných orgánech tím, že ji buď chrání před oxidací katalyzovanou ionty kovů nebo zvyšuje její utilizaci v organismu. Přirozené zdroje askorbové kyseliny obsahující flavonoidy (např. šípky, kde je značné množství rutinu) jsou proto účinnější než syntetický vitamin C [20].

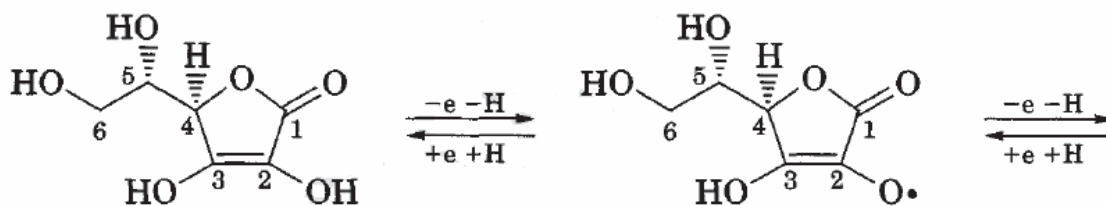


Myricetin: R1=R2=R3=OH
Quercetin: R1=R2=OH, R3=H
Kaempferol: R1=OH, R2=R3=H

Obr. 23: Struktura flavonolů čaje [23]

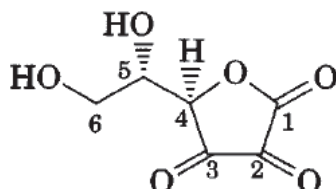
3.3.6 Kyselina L-askorbová

Kyselina L-askorbová se vyskytuje ve velkém množství v rostlinách i zvířatech. Čistý vitamin C je ve vodě rozpustná, silně redukující, opticky aktivní, bílá krystalická látka. Biosyntéza kyseliny L-askorbové v rostlinách, stejně tak i chemická syntéza začíná D-glukózou. Nejdůležitější chemická reakce kyseliny L-askorbové je její oxidace na dehydro-L-askorbovou kyselinu. Vitamin C je redoxní systém obsahující nejméně tři sloučeniny: kyselinu L-askorbovou, monodehydro-L-askorbovou a dehydro-L-askorbovou [25].



(1) L-Ascorbic acid

(2) Monodehydro-L-ascorbic acid (free radical)



(3) Dehydro-L-ascorbic acid

Obr. 24: Vitamin C redoxní systém [25]

Oxidace a ztráty vitamínu C během zpracování potravin je v centru zájmu specialistů na výživu, producentů i konzumentů potravin. Vitamin C je používán jako index zdravotní kvality ovoce, ve srovnání s jinými prospěšnými látkami je ale mnohem náchylnější k degradaci během zpracování a skladování. Kvůli labilní povaze vitamínu C jsou procesy přípravy potravin navrhovány tak, aby docházelo k co nejmenší ztrátě vitamínu C [26].

Degradace kyseliny L-askorbové ve vodném roztoku závisí na mnoha faktorech jako pH, teplota, přítomnost kyslíku nebo kovů. Oblast pH, ve které je kyselina L-askorbová nejvíce stabilní, je mezi hodnotami 4 až 6. L-askorbová kyselina je citlivá na teplo. V přítomnosti kyslíku a tepla je růst rychlosti oxidace úměrný rostoucí teplotě. Dehydro-L-askorbová kyselina, počáteční oxidační produkt, podléhá ireversibilní hydrolyze na 2,3-dioxo-L-gulonovou kyselinu, která je dále oxidována na oxalovou kyselinu a L-threonovou kyselinu. Mnoho kovů, především měď, katalyzují oxidaci kyseliny L-askorbové [25].

Kyselina askorbová je silné redukční činidlo a působí v biologických systémech jako nejsilnější přirozený antioxidant. Je také nezbytná pro aktivitu hydroxylázy, která katalyzuje posttranslační konverzi prolinu na hydroxyprolin a lysinu na hydroxylysin. Tato posttranslační hydroxylace je zásadní pro tvorbu kolagenu, který je základním proteinem ve spojovací tkáni. Vitamin C zastává také funkci v metabolismu aminokyselin, v absorpci železa a zvyšuje odolnost organismu proti infekci. Klasický případ nedostatku vitamínu C je skorbut [27].

3.4 Antimutagenní aktivita

3.4.1 Antimutagenita/genotoxicita

Role potravních faktorů v prevenci nejrozšířenějších chronických degenerativních onemocnění je předmětem intenzivního výzkumu mnoha laboratoří na celém světě. Výsledky epidemiologických studií a testů na laboratorních zvířatech naznačují, že potraviny konzumované většinou populace obsahují určité složky, které mohou mít vliv na snížení výskytu rakoviny [28]. Aktivní složky stravy jsou zástupci rozdílných chemických skupin a mohou působit jako aktivní prevence i proti jiným nemocem. Mechanismus působení mnoha z nich je stále neznámý, ačkoliv se zdá, že některé jsou antioxidanty a jako takové mohou vylučovat volné radikály tvořené buď během zpracování potravy nebo biologickými procesy v těle [28].

Poněvadž potrava obsahuje často i oxidanty a některé mutagenně působící látky, je velmi důležité dodávat organismu různorodou, nutričně vyváženou dietu, ve které antimutageny a antioxidanty budou převažovat nad oxidanty a mutageny. Sloučeniny a komplexní směsi s antimutagenní aktivitou mohou působit paralelně na různých úrovních. Jako inhibitory mohou zamezit tvoření mutagenů, stejně tak endogennímu tvoření nitrosoaminů. Jako blokátory mohou zamezit biotransformaci promutagenů na reaktivní metabolit, inhibováním metabolické aktivace stimulačními detoxifikačními enzymy nebo odstraňováním reaktivních molekul [29].

In vitro a in vivo experimenty na zvířatech a lidech vedly k identifikaci řady potenciálních antimutagenů ve stravě, ale epidemiologické studie prokázaly antikarcinogenitu jen u některých složek stravy. Vysoká míra konzumace ovoce a zeleniny je spojena se snižujícím se rizikem různých typů rakoviny. Pokud jsou antimutageny testovány jako jednotlivé látky, mnoho z nich ukazuje antimutagenní aktivitu v Amesově testu (i jiných zkouškách), ale málo je známo o komplexní aktivitě, kdy tyto látky jsou v potravě a reagují s jinými složkami jídla v našem zažívacím traktu [29].

3.4.1.1 Mutageneze a rakovina

Rozmanitost živých organismů a jejich úspěch v osidlování většiny zemského povrchu závisí na genetických změnách akumulovaných během miliónů let, neboť tyto dovolily organismům přizpůsobit se měnícím se podmínkám a osídlit nové typy životního prostředí. Přesto pokud uvažujeme z krátkodobého hlediska jednotlivce, jsou mutace ve většině případů škodlivé, obzvláště u mnohobuněčných organismů, kde jsou více pravděpodobné takové změny, které narušují komplexitu organismu, jeho vývoj nebo fyziologii. Většina změn v DNA je pouze dočasná, protože jsou okamžitě opravovány reparačními mechanismy DNA. Jen vzácně udělají replikace nebo opravné mechanismy chybu, která umožní zafixování změny v DNA. Tato trvalá změna se nazývá mutace a může mít dalekosáhlé následky. Mutace v jediném nukleotidovém páru může být příčinou zániku celého organismu, pokud k ní dojde v životně důležitém úseku DNA [30].

Je zřejmé, že ve velkém organismu nedojde k významnému poškození, pokud se příležitostně jedna buňka chová neadekvátně. Ale závažné a potenciálně letální poškození se objevují v případě, že se u jedné buňky vyskytnou genetické změny, které jí umožní, aby přežila a dělila se v okamžiku, kdy by neměla, a vytvářela tak dceřiné buňky, které se budou chovat stejně negativním způsobem. Organizace tkáně a případně těla jako celku

může být poté poškozena expanzí klonu abnormálních buněk. Rakovinné buňky jsou charakterizovány dvěma dědičnými vlastnostmi: (1) ony samy i jejich potomstvo se rozmnožují i bez přítomnosti stimulů k dělení a (2) kolonizují oblasti, které jsou normálně vyhrazené pro jiné buňky [30].

Mutace jsou v přírodě v podstatě spontánním procesem, který nelze zcela eliminovat. Dokonce i v prostředí bez tabákového kouře, radioaktivity a jiných vnějších mutagenů, které nás ohrožují, bude spontánně docházet k mutacím řádově asi 10^{-6} mutací na gen na buněčné dělení – tato hodnota je dána základními omezeními přesnosti replikace DNA a její opravy. V průběhu života se v lidském těle odehraje přibližně 1016 buněčných dělení, takže v každém jednotlivém genu genomu dojde pravděpodobnosti vzniku mutace přibližně v 1010 případech u každého lidského jedince. Z tohoto pohledu pak není problém rakoviny v jejím vzniku, ale v tom, proč vzniká tak vzácně. Vysvětlení, které je podpořeno velkým množstvím důkazů, je takové, že k přeměně normální buňky na rakovinnou je třeba více než jedné mutace. Obvykle je třeba pěti nebo šesti nezávislých mutací, které se musí odehrávat v jedné buňce, aby získala všechny potřebné vlastnosti pro karcinogenní charakter [30].

Mnoho objevů bylo skutečně díky molekulám DNA a proteinům vzniklých technikami rekombinantní DNA. Ani kompletní nukleotidová sekvence genu nebo trojrozměrná struktura proteinu však nestačí k odvození fyziologické role proteinu. Genetika přesto našla vhodné řešení. Mutanty, které postrádají určitý protein, mohou pomoci odhalit funkci tohoto proteinu v buňce. Genetický výzkum se nejnáze provádí na organismech, které se rychle dělí a je snadné je v laboratoři geneticky pozměnit, nejčastějšími modely jsou proto bakterie, kvasinky, hlístice a drosofila [30].

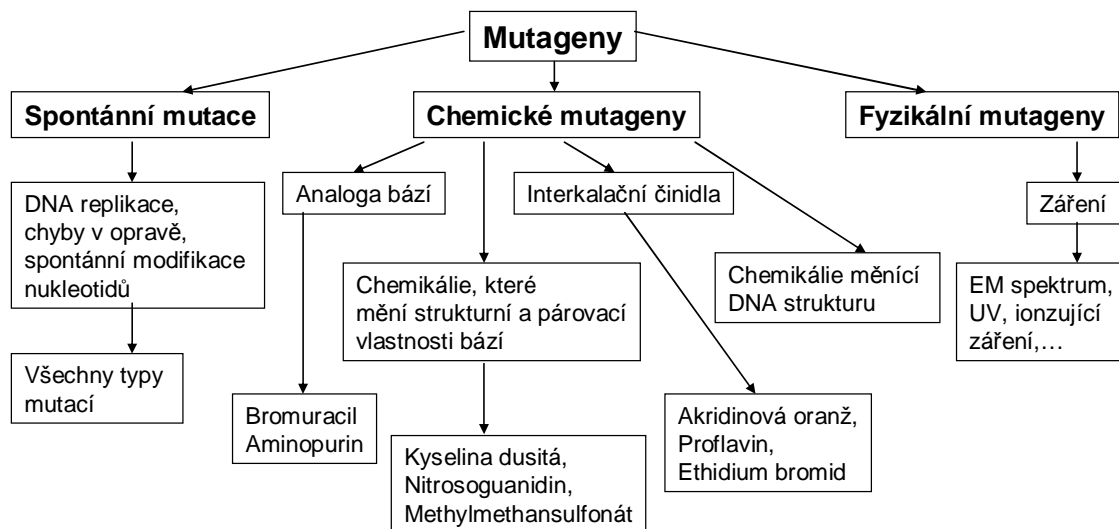
3.4.1.2 Rozdělení mutací a mutageny

Mutace je definována jako dědičná změna genetického materiálu (např. DNA). V mnoha buněčných organismech se musí rozlišovat mezi změnami v gametách (gametické mutace) a změnami v tělních buňkách (somatické mutace) [31].

Při detekci lidských gametických mutací a měření rychlosti mutací člověka je problém v diploiditě. Mnoho pokročilých mutací (z normálního genu na mutantní formu) je recesivní a tak nebude detekováno, pokud má zygota dvě kopie mutantní alely. Reverzní mutace z mutanta zpátky na normální gen se obecně vyskytuje méně [31].

Mutace nebo dědičné změny genetického materiálu mohou být velké (na úrovni chromosomu) nebo bodové změny (mutace nejsou viditelné jako cytologické abnormality). Později mohou zahrnovat právě jednotlivý nukleotidový pár v DNA. Typy malých mutací lze rozdělit na substituci bází a na posunové mutace. Substituci bází lze rozdělit na dva typy mutací: transice (purin na purin, pyrimidin na pyrimidin) a transverze (purin na pyrimidin nebo pyrimidin na purin). U posunových mutací dochází k inserci nebo delecii jednoho nebo více nukleotidů v kódující oblasti genu. Toto způsobuje změnu čtecího rámce, jelikož kodony jsou skupiny tří nukleotidů, jsou zde tři možnosti čtecích rámců pro každý gen [31].

Mutagen je přírodní, nebo v lidském těle vzniklý činitel (fyzikální nebo chemický), který může pozměnit strukturu nebo sekvenci DNA. Následující schéma zobrazuje stručné rozdělení možných mutagenů.



Obr. 24: Rozdělení mutagenů podle typu a mechanismu působení

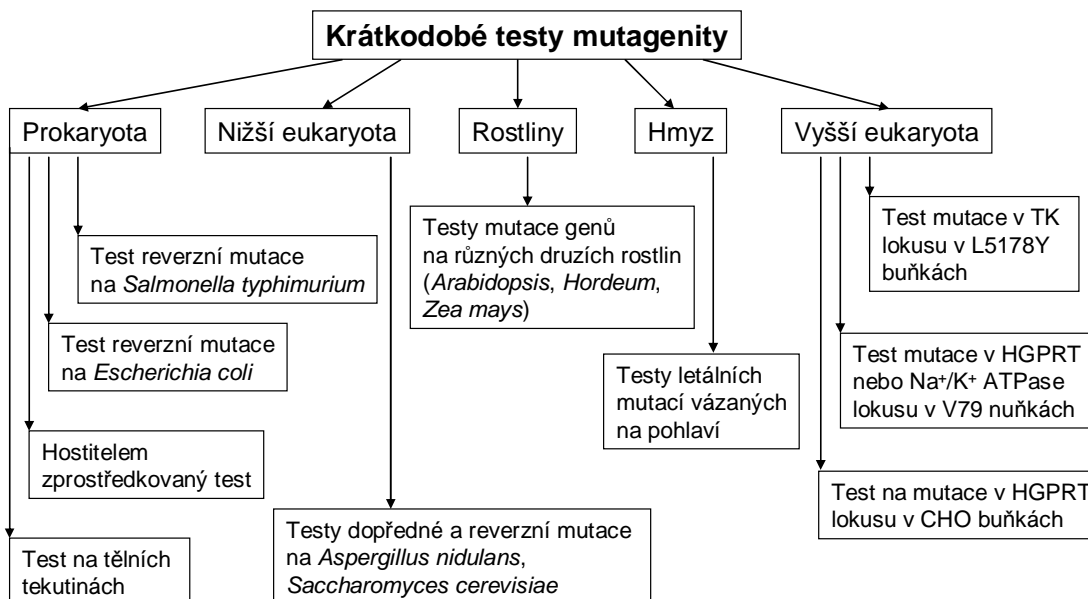
3.4.1.3 Definice 4-NQO

4-nitroquinolin-1-oxid je látka používaná při výzkumu rakoviny pro způsobení nádorů laboratorních zvířat. Toto je prováděno za účelem testování nových potravin, léků a postupů používaných při prevenci rakoviny [32].

3.4.2 Testy používané při výzkumu antimutagenních/genotoxických účinků látek

V dřívějších letech se zdálo, že existuje pouze malá nebo žádná korelace mezi mutagenitou a karcinogenitou. Málo mutagenů se ukázalo být karcinogeny. S několika výjimkami, karcinogeny testované na mutagenitu primárně v mikrobiálních testech a postrádající kapacitu pro metabolickou aktivaci, byly určeny jako nemutageny. S rostoucím poznáním metabolismu karcinogenních chemikálií bylo zjištěno, že mnoho karcinogenů podléhá aktivaci savčími enzymovými systémy. Tento objev byl následován vývojem in vivo systémů, a také in vitro testováním reaktivních forem karcinogenních chemikálií [33].

Bylo vyvinuto několik krátkodobých in vitro testů pro detekci genotoxických činitelů. Tyto testy měří rozdílné genetické výsledky za použití prokaryot, nižších eukaryot, hmyzu, buněk v kultuře a celých zvířecích systémů [33]. V následujícím schématu je znázorněno základní rozdělení testů genotoxicity.



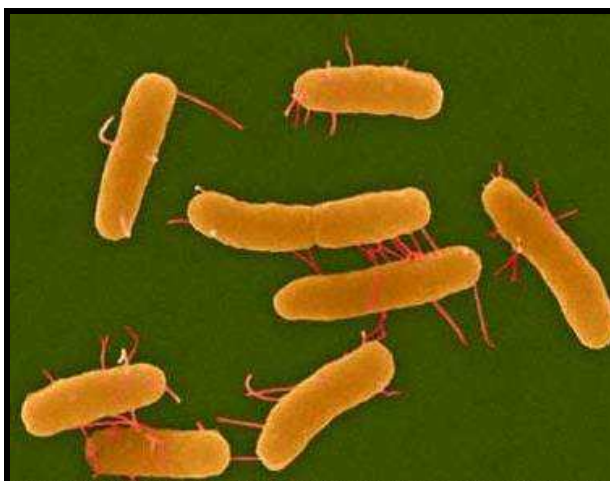
Obr. 25: Základní rozdělení testů na mutagenitu podle mechanismu působení

3.4.2.1 Amesův test (Test reverzní mutace na *Salmonella typhimurium*)

Amesův test je velmi citlivá biologická metoda pro měření mutagenní účinnosti chemických látek. Amesův test sám o sobě nevyjadřuje riziko rakoviny, nicméně účinnost mutagenů v tomto testu koreluje s karcinogenitou mnoha chemikálií u hlodavců [34].

Test byl vyvinut v roce 1975 Brucem Amese a jeho kolegy na University of California at Berkley. Amesova metoda je založena na indukujícím růstu v geneticky pozměněném kmenu bakterie *Salmonella typhimurium*. K růstu speciálního kmene je nutná aminokyselina histidin. I když je studovaný mutagen přidán k bakteriím, některé pozměněné salmonelly podléhají mutacím. Následuje zvláštní typ mutací – bakterie může růst tak jako originální nezměněný „divoký“ kmen bez histidinu. Protože se mutantní bakterie vrací k původnímu fenotypu s ohledem na histidin jako nutrient, jsou tyto bakterie nazývány jako revertanti [34].

Amesův test se hodnotí jako počet specificky rostoucích bakteriálních kolonií, které jsou mírou mutagenní aktivity působící chemikálie. Tato hodnota je často vyjádřena jako počet revertantů na mikrogram čisté chemikálie (mutagenu) nebo na gram potravin obsahující tento mutagen. Některé čisté mutageny mají za následek stovky revertantů na mikrogram, ale mnoho látek, které byly testovány např. ve vařeném mase, produkují až stovky tisíc revertantů na mikrogram [34]. Test se zahajuje vložením kolem 100 milionů bakterií salmonely na Petriho misku obsahující médium, ve kterém chybí aminokyselina histidin. Několik bakterií bude spontánně revertovat i v nepřítomnosti mutagenu. Počet těchto reverzních kolonií udá základní linii, oproti které se bude testovat celý pokus. Na jiné misky se stejným médiem je aplikována bakterie, mutagen a savčí enzymy požadované pro metabolismus. (Přídavek těchto enzymů nám dává mnohem realističtější měření mutagenity látek pro savce.) Reverzní bakterie rostou za tvorby viditelných kolonií. Pro Amesův test lze použít řadu modifikovaných kmenů *S.typhimurium*, nejběžnější jsou dva kmeny - bakterie TA98 a TA100 [34].



Obr. 26: Morfologie bakterie *Salmonella typhimurium* [35]

3.4.2.2 Test na *Saccharomyces cerevisiae* D7

Buňky *Saccharomyces cerevisiae* D7 mají kompletní eukaryotický buněčný cyklus a v závislosti na podmínkách mohou existovat v haploidním nebo diploidním stádiu. U testovacího kmene *Saccharomyces cerevisiae* D7 může být detekováno několik typů mutací [36].

Mitotický crossing-over

Crossing-over neboli překřížení je proces, při kterém dochází ke genetické rekombinaci, kdy je část chromatidy zaměněna odpovídajícím fragmentem homologní chromatidy ze stejného chromosomového páru. Detekce takové mutace v tomto systému u kmene D7 je založena na akumulaci červeného pigmentu v buňkách s blokovanou purinovou syntézou. Alely účastnící se crossing-overu jsou ADE2-40/ADE2-119. Alela ADE2-40 blokuje purinovou syntézu a buňky ADE2-40/ADE2-40 tvoří červené kolonie, buňky ADE2-119/ADE2-119 se jeví jako růžové. Buňky s oběma geny (nemutované-ADE2-40/ADE2-119) rostou na syntetickém médiu s omezeným obsahem adeninu ve formě bílých kolonií [36].

Reverzní (zpětné) mutace

Princip detekce těchto mutací je stejný jako u mutací v Amesově testu. Reverzní mutace mohou mít dva typy mechanismu. Jedná se o reverzi k původnímu volnému genotypu, nebo tato mutace je způsobena další, potlačující mutací, která kompenzuje původní změnu. Kmen D7 umožňuje detekci reverzní mutace v alelách ILV1-92/ILV1-92. Detekce je založena na růstu mutovaných buněk na syntetickém médiu bez obsahu izoleucinu [36].

Genová konverze

Genové konverze se u kmene D7 detekují na alele TRP5-12/TRP5-27 (v genech pro produkci tryptofanu). Detekce takové konverze je podobná jako u zpětné mutace, tedy mutované buňky tvoří prototrofní kolonie schopné růst na selektivním médiu bez obsahu tryptofanu [36]. U tohoto testovacího systému je možné využít rovněž metabolické aktivace

promutagenů jako u Amesova testu pomocí S9 frakce jaterního homogenátu a koenzymu NADPH a glukosa-6-fosfátu [36].



Obr. 27: Morfologie kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* D7

3.5 Metodické postupy

3.5.1 Extrakce

Rozpuštěné látky lze oddělit extrakcí kapalinou kapalinou. Mnohdy je však třeba oddělit látky přítomné v tuhém vzorku. V tomto případě není možné upravit složky vzorku tak, aby se podpořila nebo potlačila extrakce, jako je tomu u rozpuštěných látek, dělení je pak závislé především na rozpustnosti sloučeniny v určitém rozpouštědle. Extrakce tuhé látky kapalinou se používá nejčastěji pro biologické a přírodní vzorky, ale mohou být takto děleny i anorganické látky. Extrakce tuhých látek je obvykle zdoluhavá, protože difúze extrahované látky tuhou fází je pomalá. Proto se dává přednost kontinuální extrakci, např. v Soxhletově extraktoru. Extrakci lze rovněž podpořit mikrovlnným ohřevem rozpouštědel, která jsou v kontaktu s tuhým vzorkem. Extrakci látek z tuhé fáze lze podpořit též ultrazvukem [37].

3.5.2 HPLC

Chromatografie je separační metoda, tedy metoda, při které se oddělují – separují složky obsažené ve vzorku. Svým určením je to především metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi. Čas, jaký stráví v jedné nebo druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Během separace se v koloně vytváří a porušuje fázová rovnováha mezi mobilní a stacionární fází. Složka má při ustavení rovnováhy ve stacionární fázi koncentraci c_s a v mobilní fázi c_m . Poměr mezi těmito koncentracemi je v ideálním případě konstantní a nazývá se distribuční konstanta K_D , protože charakterizuje distribuci složek [38].

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} \quad (1)$$

Pro oddělení dvou složek je nutné, aby se od sebe lišily svými distribučními konstantami. Distribuční konstanta závisí na teplotě. Zvolíme-li konstantní teplotu, pak se závislost koncentrace složky ve stacionární fázi na koncentraci složek v mobilní fázi nazývá izoterma [38]. Vysoké účinnosti se dosahuje použitím stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem [37].

Systémy se značně sníženou polaritou stacionárních fází a polárními mobilními fázemi se označují jako systémy s obrácenými fázemi. RP-HPLC umožňuje separaci velkého počtu organických sloučenin, ale i komplexů elektricky neutrálních, resp. s omezenou polaritou. Stacionární fáze pro kapalinovou chromatografii se plní do trubic různé délky a průměru, zhotovených z nerezové oceli, tvrzeného skla a plastů [39].

Mechanismus separace na reverzních chemicky vázaných fázích je kombinací tří interakcí: interakce solutu s mobilní fází, interakce mobilní fáze se stacionární fází, rozdělování solutu mezi mobilní a stacionární fázi. Rozhodující roli hraje interakce s mobilní fází, která je dána hydrofobními interakcemi a interakcemi namířenými proti nim. Jejich velikost závisí na polaritě solutu, na permitivitě a na povrchovém napětí mobilní fáze [37].

Z kolony je eluát veden do detektoru. Signál detektoru se vyhodnocuje počítačem nebo některým jiným vyhodnocovacím zařízením [37]. Pro identifikaci látky je podstatné umístění maxima píku v chromatogramu. Toto umístění lze vyjádřit retenčními daty: retenční čas a retenční objem [38]. Pro kvantitativní analýzu se používá plocha a výška píku, které rostou s obsahem složky ve vzorku.

3.5.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda určování hmotností atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné a záporné ionty. Při vhodné interpretaci výsledků měření má metoda velmi dobrou vypovídací schopnost o struktuře analyzovaných látek. Těžiskem analytického využití hmotnostní spektrometrie je především stopová analýza organických látek s důrazem na zjištění jejich struktury [37].

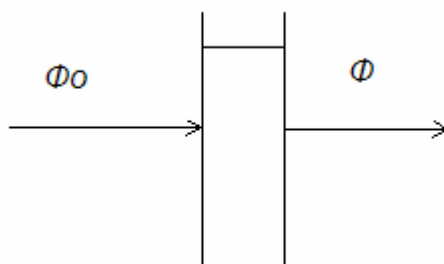
Spojení hmotnostního spektrometru se separačními metodami (zejména plynovou a kapalinovou chromatografií) výrazně zvyšuje selektivitu a umožňuje provádět identifikaci komponent vzorku ve složité matrici. Hmotnostní spektrometr zde vystupuje jako strukturně selektivní detektor umožňující kromě obvyklé registrace zón látek eluovaných z kolony provést i jejich identifikaci na základě zaznamenaného hmotnostního spektra [37].

Hmotnostní spektrometr má několik základních součástí. Iontový zdroj slouží k převedení analyzované látky do ionizovaného stavu. V prostoru iontového zdroje dochází i k většině fragmentačních reakcí vedoucích k destrukci chemických vazeb vzniklého iontu. Hmotnostní analyzátor slouží jako disperzní prvek a umožňuje rozdělit v prostoru nebo čase směs iontů o různých poměrech hmotnosti ku náboji (m/z), produkovanou v iontovém zdroji. Detektor, na který je směřován proud iontů po průchodu hmotnostním analyzátozem, poskytuje analogový signál úměrný počtu dopadajících iontů. Ten je po digitalizaci převeden do počítače a vhodným programovým vybavením zpracován do formy hmotnostních spekter [37].

3.5.4 Spektrofotometrie UV-VIS

Podstatou ultrafialové a viditelné spektrofotometrie je absorpce ultrafialového nebo viditelného záření (200-800 nm) zředěnými roztoky molekul. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Proto molekulová absorpční spektra v ultrafialové a viditelné oblasti jsou svou podstatou elektronová spektra [38].

Transmittance T je relativní část prošlého záření. Absorbance je záporný dekadický logaritmus transmittance [38].



Obr. 28: Absorpce při průchodu záření kyvetou

$$A = -\log T = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} \quad (2)$$

A...absorbance

T...transmittance

Φ_0 ...dopadající zářivý tok

Φ ...prošlý zářivý tok

Je-li absorpce záření nulová, je nulová i absorbance. S rostoucí absorpcí roste absorbance. Absorpce je přímo úměrná koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy [38].

Lambert-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l \quad (3)$$

A...absorbance

ε_λ ...molární absorpční koeficient (l/mol.cm)

c...látková koncentrace (mol/l)

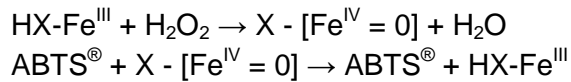
l...tloušťka absorbující vrstvy (cm)

3.5.5 Celková antioxidační aktivita

Pro stanovení antioxidační aktivity lze použít řadu různých metod. U komplexních přírodních směsí se často používá metoda využívající stabilní radikál ABTS. Tato spektrofotometrická technika hodnotí relativní schopnost antioxidantů odstraňovat 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin sulfonát) - ABTS®, a to ve srovnání s antioxidační kapacitou standardu 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylové kyseliny. Radikálový kation ABTS^{•+} je modrozelený chromogen s charakteristickou absorpcí při 660 nm. Radikálový

kation je produkovaný ferrylmyoglobinovým radikálem generovaným z metmyoglobinu a H_2O_2 v přítomnosti peroxidázy. V přítomnosti antioxidantů absorbance klesá [40].

Princip metody charakterizují následující rovnice:



$\text{HX-Fe}^{\text{III}}$ = Metmyoglobin

$\text{X - [Fe}^{\text{IV}} = \text{O}]$ = Ferrylmyoglobin

$\text{ABTS}^{\text{®}}$ = 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin sulfonát)

3.6 Senzorická analýza

Senzorickou analýzou se rozumíme hodnocení potravin bezprostředně našimi smysly, včetně zpracování výsledků lidským centrálním nervovým systémem. Analýza probíhá za takových podmínek, kdy je zajištěno objektivní, přesné a reprodukovatelné měření. Osoby, které se aktivně zúčastňují sensorické analýzy, se nazývají hodnotitelé nebo posuzovatelé. Soubor těchto osob se nazývá porota nebo panel. Jako konsument se označuje hodnotitel, který není speciálně odborně vzdělán, takže jeho názory a postoje i výsledky jsou blízké názorům a výsledkům skutečných spotřebitelů [41]. Vlastní analýzy by měly probíhat pouze na specializovaných pracovištích. Musí být eliminovány negativní vlivy, které při vlastní analýze mohou a často působí na hodnotitele.

Při sensorickém posouzení každý člověk hodnotí potraviny komplexně použitím všech smyslů. Teprve školením je schopen rozpoznávat jednotlivosti. Při sensorické analýze se hodnotí u potravin vjemy zrakové, sluchové, chuťové, čichové, taktilní, teplotní a bolesti. Psychika člověka je uzpůsobena tak, že nejprve hodnotí přijatelnost, příjemnost vjemu [41]. Pokud se při hodnocení vzorku nezaměřujeme pouze na jednu jeho vlastnost, ale hodnotíme vzorek celý, postupujeme podle toho, jak je vzorek hodnocen při běžné konzumaci. Jako první se hodnotí barva a vzhled, dále jsou hodnoceny čichové podněty, textura.

Časové nároky na analýzu jsou poměrně malé a výsledky lze jednoduše zpracovat statistickými parametrickými metodami. Senzorická analýza potravin patří mezi základní kontrolní metody kvality potravinářských surovin, přídatných a pomocných látek i hotových výrobků. Kvalitu potravin lze také definovat jako shodu výrobku se standardy, stanovenými legislativou nebo technickými normami, nebo s požadavky spotřebitele.

4 CÍL PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce je studium antioxidačních a antimutagenních účinků bylinných a ovocných čajů běžně užívaných v české populaci. Ve vybraných druzích čajů budou stanoveny skupinové i individuální parametry charakterizující antioxidační status, antimutagenní účinky budou testovány na kvasinkovém kmeni *Saccharomyces cerevisiae* D7. Součástí práce bude i orientační sensorická analýza čajů.

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- zpracování literární rešerše zaměřené na:
 - přehled složení a pozitivních zdravotních účinků ovocných a bylinných čajů;
 - přehled antioxidantů v různých typech bylinných a ovocných čajů;
 - přehled metod stanovení významně zastoupených antioxidantů a antioxidační aktivity;
 - optimalizace metod extrakce a stanovení vybraných antioxidantů pomocí spektrofotometrických metod, HPLC a LC/MS; stanovení antioxidační a antimutagenní aktivity;
- screeningová studie – analýza antioxidantů, antioxidační a antimutagenní aktivity ve vybraných ovocných a bylinných čajích; srovnání vlivu dlouhodobého uchovávání na aktivitu vybraných antioxidačních parametrů;
- orientační sensorická analýza čajů s využitím dvou věkově odlišných souborů hodnotitelů.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie, mikroorganismy, přístroje a pomůcky

5.1.1 Chemikálie

5.1.1.1 *Celkové polyfenoly a flavonidy*

Folin-Ciocalteuovo činidlo, RNDr. Jan Kulich (ČR)

Uhličitan sodný, Sigma-Aldrich (Německo)

Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (Německo)

Dusitan sodný, Lachema (ČR)

Chlorid hlinitý, Lachema (ČR)

Hydroxid sodný, Lach-Ner, s.r.o (ČR)

Katechin, Sigma-Aldrich (Německo)

5.1.1.2 *TAS*

Total antioxidant status kit, Randox Laboratories (Velká Británie)

5.1.1.3 *HPLC*

Methanol gradient HPLC, Scharlau Chemie S.A. (Španělsko)

Acetonitril supragradient HPLC, Scharlau Chemie S.A. (Španělsko)

Ethanol pro UV, ML Chemica (ČR)

Kyselina fosforečná, Lachema (ČR)

Octan sodný dihydrát, Lach-Ner, s.r.o. (ČR)

Quercetin dihydrát, Sigma-Aldrich (Německo)

Katechin, Sigma-Aldrich (Německo)

Epikatechin, Sigma-Aldrich (Německo)

Epikatechin gallát ze zeleného čaje, min. 98%, Sigma-Aldrich (Německo)

Morin, Sigma-Aldrich (Německo)

Rutin, Sigma-Aldrich (Německo)

Kaempferol, Sigma-Aldrich (Německo)

Myricetin, Sigma-Aldrich (Německo)

Luteolin, Sigma-Aldrich (Německo)

Kyselina L-askorbová, Sigma-Aldrich (Německo)

5.1.1.4 *Kultivace*

Baktopenon, HiMedia Laboratories (Indie)

Sušený kvasničný extrakt, HiMedia Laboratories (Indie)

Glukóza, Lach-Ner, s.r.o. (ČR)

Agar, HiMedia Laboratories (Indie)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Lach-Ner, s.r.o. (ČR)

Dihydrogenfosforečnan draselný, Lach-Ner, s.r.o. (ČR)

Síran amonný, Lach-Ner, s.r.o. (ČR)

Síran hořečnatý heptahydrát, Chemapol (ČR)

5.1.1.5 Testy antimutagenity

Adenin, Serva Electrophoresis GmbH (Německo)
L-tryptofan, Serva Electrophoresis GmbH (Německo)
Isoleucin, Serva Electrophoresis GmbH (Německo)
Ampicilin Na – sůl, Serva Electrophoresis GmbH (Německo)
Aceton, Lachema (ČR)
4-nitrochinolin-N-oxid, Sigma-Aldrich (Německo)
Inositol, HiMedia Laboratories (Indie)
Riboflavin, Serva Electrophoresis GmbH (Německo)
Thiamin.HCl, Serva Electrophoresis GmbH (Německo)
Pyridoxin.HCl, Serva Electrophoresis GmbH (Německo)
Kyselina nikotinová, Serva Electrophoresis GmbH (Německo)
Kyselina 4-aminobenzoová, Serva Electrophoresis GmbH (Německo)
Panthotenát vápenatý, Sigma-Aldrich (Německo)
Biotin 99%, Sigma-Aldrich (Německo)

5.1.2 Přístroje a pomůcky

Spektrofotometr VIS, Helios δ , Unicam (Velká Británie)
Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (Německo)
Analytické váhy, Boeco (Německo)
Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (Německo)
Laminární box Aura Mini, Bio Air Instruments (USA)
Termostat Memmert, Memmert GmbH + Co. KG (Německo)
Mikroskop, LIIO (Německo)
Sestava HPLC od firmy Ecom spol. s.r.o. (ČR)

- programátor gradientu GP 5
- čerpadlo LCP 4020
- dávkovací ventil smyčkový C a D
- termostat kolon LCO 101
- spektrofotometrický detektor LCD 2084
- integrátor Data Apex CSW v. 1.7.

HPLC kolona SUPELCOSIL™ LC-18 25 cm \times 4,6 mm, 5 μ m, Supelco (USA)
HPLC kolona HYPERSIL APS-2 NH₂ 150 cm \times 4,6 mm, 5 μ m, Chromservis (ČR)
Membránové filtry Chromafil® PET-20/15 MS, Macherey - Nagel (Německo)
Hmotnostní spektrometr LCQ Advantage Max, Thermo Finnigan (Velká Británie)

5.1.3 Mikroorganismy

Kvasinkový kmen *Saccharomyces cerevisiae* D7, který byl poskytnut z Katedry genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě.

5.1.4 Materiál - druhy čaje – ovocné/bylinné

Některé čaje byly zakoupeny ve specializovaném obchodě, část čajů byla zakoupena v síti supermarketů. V následující tabulce je uveden seznam použitých čajů a výrobců.

Tabulka 1: Výrobci zakoupených čajů použitých pro analýzu

Název čaje	Výrobce
Sypané čaje	
Heřmánek květ	Valdemar Grešík – Natura s.r.o.
Máta peprná nať	Valdemar Grešík – Natura s.r.o.
Mateřídouška nať	Valdemar Grešík – Natura s.r.o.
Divizna květ	Valdemar Grešík – Natura s.r.o.
Třezalka nať	Valdemar Grešík – Natura s.r.o.
Jablečník nať	Valdemar Grešík – Natura s.r.o.
Šípek plod	Valdemar Grešík – Natura s.r.o.
Meduňka nať	Valdemar Grešík – Natura s.r.o.
Tymián nať	Valdemar Grešík – Natura s.r.o.
Kopřiva nať	Valdemar Grešík – Natura s.r.o.
Lípa květ	Vičková Helena
Jitrocel list	Vičková Helena
Bez černý květ	Apotheke TEA
Porcované čaje	
Šípek	PĚKNÝ-UNIMEX s.r.o. (Vitka)
Meduňka	PĚKNÝ-UNIMEX s.r.o. (Vitka)
Heřmánek	PĚKNÝ-UNIMEX s.r.o. (Vitka)
Lípa	PĚKNÝ-UNIMEX s.r.o. (Vitka)
Máta	PĚKNÝ-UNIMEX s.r.o. (Vitka)
Borůvka	PĚKNÝ-UNIMEX s.r.o. (Vitka)
Černý rybíz	PĚKNÝ-UNIMEX s.r.o. (Vitka)
Citrón	PĚKNÝ-UNIMEX s.r.o. (Vitka)
Ovocná směs	PĚKNÝ-UNIMEX s.r.o. (Vitka)
Apple & Cinnamon Twist	London Fruit & Herb company
Mateřídouška	Herbex
Třezalka tečkovaná	Apotheke TEA
Kopřiva dvoudomá	Apotheke TEA
Višeň	Zlatý šálek
Pomeranč	Jemča
Hruška máslovka	MOKATE S.A.
Jablko jadernička	MOKATE S.A.

5.2 Analytické a separační metody – stanovení antioxidantů

5.2.1 Extrakce aktivních složek

Extrakce sušených čajů byla provedena podle návodů na baleních doporučených výrobcem. Porcované čaje byly zality 100 ml horké destilované vody a po pětiminutové extrakci byly sáčky s čaji vyjmuty. Sypané čaje byly taktéž připraveny podle návodu na balení, a to extrakcí jedné lžičky sypaného čaje ve 100 ml horké vody. Čaj byl poté přefiltrován přes membránový filtr Chromafil® PET-20/15 MS. Sypané čaje byly předem zváženy a výsledky jednotlivých analýz přepočítány na hmotnosti jednotlivých čajů. Extrakce pro všechny typy analýz byla stejná, s výjimkou extrakce čajů pro stanovení antimutagenní aktivity (používán 6% extrakt čajů) a stanovení kyseliny askorbové, kde byly čaje zality pouze 50 ml horké vody.

5.2.2 TAS

Ke stanovení celkové antioxidační kapacity byla použita diagnostická souprava Total Antioxidant Status Kit firmy RANDOX Laboratories. Analýza byla provedena podle příloženého návodu od výrobce. Souprava obsahuje pufr, chromogen (metmyoglobin, ABTS®), substrát (hydrogen peroxid), standard (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid). Pro analýzu byly použity čajové extrakty připravené standardním postupem (viz. kap. 5.2.1), bylo je však nutno před analýzou několikrát naředit podle potřeby. Smícháním jednotlivých chemikálií podle návodu byly připraveny blank, standard, vzorek a měřeny na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. Blank byl připraven stejným postupem jako vzorek a standard, pouze za použití dvakrát deionizované vody. Všechny vzorky byly měřeny ve zúžených kyvetách při teplotě 37°C, proti vzduchu.

Naměřené hodnoty absorbancí byly dosazeny do rovnic:

$$A_2 - A_1 = \Delta A \quad (4)$$

A₁...absorbance před přidáním substrátu

A₂...absorbance po přidání substrátu (po 3 minutách)

$$\text{Faktor} = \frac{\text{koncentrace standardu}}{(\Delta A \text{ blank} - \Delta A \text{ standard})} \quad (5)$$

$$\text{TAS mmol/l} = \text{Faktor} \cdot (\Delta A \text{ blank} - \Delta A \text{ vzorek}) \quad (6)$$

5.2.3 Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení celkového množství polyfenolů v čajových extraktech bylo provedeno za použití Folin-Ciocalteuovy metody [19]. Pro analýzu bylo použito zředěné Folin-Ciocalteuovo činidlo (1:9), nasycený roztok NaCO₃ a kyselina gallová jako standard.

Folin-Ciocalteuovo činidlo bylo zředěno destilovanou vodou v poměru 1:9 a 1 ml tohoto zředěného činidla byl napipetován do zkumavek. Dále byl do zkumavek pipetován 1ml destilované vody a 50 µl přefiltrovaných čajových extraktů. Směs byla promíchána a ponechána 5 minut reagovat. Poté bylo do každé zkumavky přidáno 1 ml nasyceného roztoku NaCO₃, promícháno a ponecháno 15 minut stát. Dále byly vzorky analyzovány spektrofotometrickou metodou při vlnové délce 750 nm. Byla sestavena kalibrační křivka

kyseliny gallové v rozmezí koncentrací 0,1 – 1 mg/ml a pomocí této kalibrační křivky byly vzorky kvantitativně vyhodnoceny. Slepý vzorek byl připravován souběžně s ostatními vzorky stejnou metodou.

5.2.4 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení celkového množství flavonoidů v čajových extraktech bylo provedeno za použití orientační metody s hlinitou solí a dusitanem. Pro analýzu byl použit 5% roztok dusitanu sodného, 10% roztok chloridu hlinitého, 1 mol/l roztok hydroxidu sodného a 1 mol/l roztok katechinu jako standardu.

Nejprve bylo do zkumavky napipetováno 0,5 ml extraktu čaje, poté přidáno 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% NaNO₂. Směs byla řádně promíchána a ponechána 5 minut reagovat. Dále bylo do zkumavek pipetováno 0,2 ml 10% AlCl₃, roztok byl opět důkladně promíchán a ponechán 5 minut stát. Nakonec bylo do zkumavek přidáno 1,5 ml NaOH a 1 ml H₂O, promícháno a ponecháno 15 minut reagovat. Vzorky byly analyzovány spektrofotometrickou metodou při vlnové délce 510 nm. Byla sestavena kalibrační křivka katechinu v rozmezí 0,05 – 0,5 mg/ml a pomocí této kalibrační křivky byly vzorky kvantitativně vyhodnoceny. Jako slepý vzorek byl použit fyziologický roztok.

5.2.5 HPLC analýza flavonoidů

Analýza všech čajů HPLC metodou proběhla po extrakci účinných látek vodou a přefiltrování přes membránový filtr Chromafil® PET-20/15 MS. Vzorky byly na kolonu přivedeny přímým nástřikem vodného extraktu.

Analýza katechinů byla provedena na koloně s reverzní fází C18 SUPELCOSIL™ LC-18 o zrnění 5 µm a rozměrech 250 mm x 4,6 mm. Byla použita dávkovací smyčka 20 µl a eluce probíhala izokraticky při průtoku 0,75 ml/min a teplotě 30°C. Mobilní fází byla směs methanolu a redestilované vody v poměru 45:55. Jednotlivé vzorky byly detekovány na spektrofotometrickém detektoru při vlnové délce 280 nm. Za stejných podmínek separace i detekce byly stanoveny kalibrační závislosti standardů katechinu, epikatechinu, epikatechin-3-gallátu.

Analýza ostatních flavonoidů byla provedena na stejné koloně (viz výše) se stejnou dávkovací smyčkou 20 µl, průtokem 0,75 ml/min, teplotou 30°C a izokratickou elucí. Mobilní fází byla směs acetonitrilu, methanolu, redestilované vody a kyseliny fosforečné v poměru 30:20:49,5:0,5. Jednotlivé vzorky byly detekovány na spektrofotometrickém detektoru při vlnové délce 370 nm. Za stejných podmínek separace i detekce byly stanoveny kalibrační závislosti standardů rutinu, morinu, quercetinu, kaempferolu, myricetinu, luteolinu.

5.2.6 HPLC analýza kyseliny askorbové

Kyselina L-askorbová byla stanovena v ovocných čajích a čaji šípkovém. Extrakt čajů byl připraven zalitím sáčků 50 ml horké vody a filtrací přes membránový filtr Chromafil® PET-20/15 MS. Vzorky byly na kolonu nanášeny přímým nástřikem vodného extraktu o teplotě 30°C. Analýza kyseliny L-askorbové byla provedena na koloně HYPERSIL APS-2 NH₂ o zrnění 5 µm a rozměrech 150 cm x 4,6 mm. Byla použita dávkovací smyčka 20 µl a eluce probíhala izokraticky při průtoku 0,6 ml/min a teplotě 30°C. Jako mobilní fáze byla

použita směs 0,05M octanu sodného a acetonitrilu v poměru 95:5. Detekce probíhala spektrofotometricky při vlnové délce 254 nm. Za stejných podmínek separace a detekce byla stanovena kalibrační závislost standardu kyseliny L-askorbové. Kyselina L-askorbová pro stanovení kalibrační závislosti byla připravena v roztoku 2% HCl.

5.2.7 Stanovení látek polyfenolického typu metodou LC-MS

Hmotnostní spektrometr LCQ Advantage Max s elektrosprejovou ionizací a analyzátozem iontová past byl optimalizován na polyfenolickou látku kyselinu chlorogenovou, jejíž kvazi-molekulární ion o m/z 353.5 byl stanoven v záporném módu. Parametry ladící metody jsou uvedeny v tabulce:

Parametr MS	Záporný mód
množství sušícího plynu (arb)	30
množství přidavného sušícího plynu (arb)	10
napětí na kapiláře ESI (kV)	4,0
teplota na vstupní kapiláře (°C)	250
napětí na vstupní kapiláře (V)	-47,00

Výluh připravený z 1,8 g bylinného čaje máty peprné sypané - nať ve 100 ml vody byl aplikován na chromatografickou kolonu SUPELCO pomocí dávkovacího ventilu s dávkovací smyčkou o objemu 20 µl. Separace vzorku byla provedena izokratickou elucí mobilní fází acetonitril: 1% kyselina octová v poměru 50:50 dávkované průtokem 0,4 ml/min. HPLC kolona byla temperována na 30 °C. Jednotlivé složky vzorku byly detekovány hmotnostním spektrometrem v režimu MS full scan.

5.3 Testy antimutagenity/genotoxicity - *S. cerevisiae* D7

Pro testování antimutagenní aktivity jednotlivých druhů čaje byl použit kmen kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* D7 z Katedry genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě. Antimutagenní účinky nejsou prokazatelné přímo, ale projevují se v inhibici růstu kvasinkových kolonií za přítomnosti mutagenu a antimutagenu na selektivním médiu. Selektivní médium je připraveno tak, že chybí určitá aminokyselina, v tomto případě isoleucin. Inkubací mutantního kvasinkového kmene dochází k Ile-reverzi a růstu kvasinek na médiu. Za přítomnosti antimutagenu (extraktu čaje) dochází k inhibici růstu kolonií.

5.3.1 Kultivace testovacího kmene

Kultivace kvasinek kmene *Saccharomyces cerevisiae* D7 probíhala na tekutém optimálním médiu (YPD) o složení:

Baktopepton	1,2 g
Sušený kvasničný extrakt	1,2 g
Glukóza	1,2 g
Destilovaná voda	120 ml
Agar (pro pevné médium)	2,4 g

Médium bylo sterilizováno 30 minut při teplotě 121°C a tlaku 0,1 MPa. Po ochlazení bylo médium zaočkováno čtyřmi kličkami kvasinek. Připravená buněčná suspenze byla kultivována 16 - 18 hodin v termostatu při 28°C, po tomto časovém úseku byla buněčná suspenze připravena pro testy antimutagenity. Pokud byl do média přidán agar, bylo určeno pro delší uchovávání kvasinkové kultury při teplotě 2 – 8 °C.

5.3.2 Postup stanovení antimutagenní aktivity

5.3.2.1 Média

Při stanovení antimutagenních účinků čajů na testovacím mikroorganismu *Saccharomyces cerevisiae* D7 byla použita následující média:

Pevné médium

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,71 g
KH ₂ PO ₄	1,41 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,71 g
Glukóza	14,14 g
Agar	14,14 g
Destilovaná voda	660 ml
Vitaminový roztok	7,6 ml

Vitaminový roztok

Inositol	100 mg
Roboflavin	30 mg
Thiamin	10 mg
Pyridoxin	6 mg
Kyselina nikotinová	6 mg
Kyselina aminobenzoová	6 mg
Panhotenát vápenatý	6 mg
Biotin	0,1 mg
Destilovaná voda	40 ml

Vitaminový roztok byl přidán po sterilizaci média a po mírném vychlazení.

Selektivní médium pro sledování reverzní mutace (Ile-reverze)

Pevné médium	660 ml
Adenin	37,72 mg
L-tryptofan	37,72 mg

Aminokyseliny byly rozpuštěny v 50 ml sterilované vody a přidány do média po mírném vychlazení.

Fosfátový pufr

NaHPO ₄ ·12H ₂ O	7,1367 g
KH ₂ PO ₄	1,8150 g
Destilovaná voda	500 ml

Smícháním navážek NaHPO₄·12H₂O a KH₂PO₄ byl připraven pufr o pH = 7.

5.3.2.2 Stanovení antimutagenity

Buněčná suspenze, která byla připravena kultivací *S. cerevisiae* 16-18 hodin při 28°C v tekutém médiu (kap. 4.3.1), byla v exponenciální fázi růstu rozdělena do zkumavek po 10 ml. Suspenze byla centrifugována 5 minut při teplotě 20°C a otáčkách 4500 ot/min. Buňky byly dvakrát promyty fosfátovým pufrům a centrifugovány. Nakonec bylo k buňkám přidáno 10 ml fosfátového pufru a suspenze byla dobře promíchána. Pro způsobení mutace byl použit mutagen 4-N-nitrochinolin-N-oxid (4-NQO) o koncentraci 0,06 mg/ml v 99,5% acetonu. K 10 ml buněčné suspenze bylo přidáno 5 µl ampicilinu o koncentraci 100 µl/ml a 100 µl mutagenu. Následně bylo do směsi pipetováno 300 µl 6% extraktu čaje. Suspenze byla inkubována 20 hodin při teplotě 28°C a následně centrifugována 5 minut při teplotě 20°C a otáčkách 4500 ot/min a dvakrát promyta fosfátovým pufrům.

Na selektivní médium pro hodnocení Ile-reverze bylo nanášeno 100 µl buněčné suspenze o koncentraci 107 buněk·ml⁻¹. Po 10 dnech inkubace Petriho misek v termostatu při 28°C byl vyhodnocen počet narostlých kolonií (obr. 27 a 28).

Při každé zkoušce antimutagenity byly zahrnuty tyto testovací vzorky:

Název	Přítomné složky
Pozitivní kontrola	Buněčná suspenze, 4-NQO 0,06 mg/ml v 99,5% acetonu
Negativní kontrola	Buněčná suspenze, 99,5% aceton
Spontánní reverze	Buněčná suspenze
Antimutagenní aktivita čajů	Buněčná suspenze, 4-NQO, 6% extrakt čaje
Letální kontrola	Buněčná suspenze, 6% extrakt čaje

Každé měření bylo provedeno třikrát, byl vypočten průměr ze všech tří měření a směrodatná odchylka. Antimutagenní účinek čajů je hodnocen jako procento inhibice růstu kolonií a lze ho vypočítat podle rovnice:

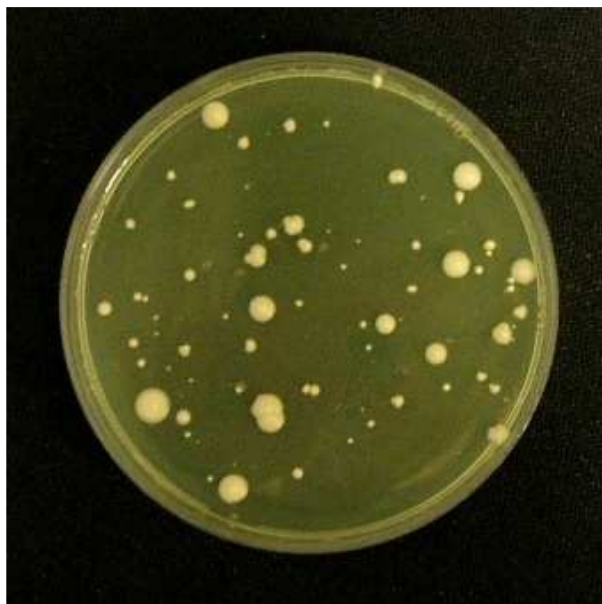
$$\% \text{inhibice} = 100 - [(X_1/X_2) \cdot 100] \quad (9)$$

X_1 je počet kolonií na Petriho misce v přítomnosti mutagenu a antimutagenu (extraktu čaje).

X_2 je počet kolonií na Petriho misce pouze v přítomnosti mutagenu.



Obr. 29: Petriho miska s koloniemi kvasinek na selektivním médiu po kultivaci za přítomnosti mutagenu (pozitivní kontrola)



Obr. 30: Petriho miska s koloniemi kvasinek na selektivním médiu po kultivaci za přítomnosti mutagenu a extraktu čaje (antimutagenní aktivita čajů)

5.4 Senzorická analýza

Metoda byla provedena ve dvou nezávislých testovacích skupinách. Jednou skupinou byli senioři studující Univerzitu třetího věku VUT v Brně. Druhou skupinu tvořili studenti maturitního ročníku Gymnázia Zastávka. Výběr souborů byl proveden za účelem srovnání spotřebitelské přijatelnosti ovocných a bylinných čajů generačně vzdálenými skupinami s různými stravovacími tradicemi a návyky.

Každý hodnotitel obdržel senzorický dotazník obsahující 2 tématické části (viz příloha 18). Poté byly postupně předloženy hodnotitelům jednotlivé druhy ovocných a bylinných čajů, které ochutnávali a následně ohodnotili jejich senzorické parametry. K jakostním parametrům, které byly hodnoceny podle stupnice od nejlepší po nejméně přijatelné, patřily:

- Barva – zda je příjemná a odpovídá bylince/ovoci, z níž/něhož má být vyrobena
- Vůně – jestli je příjemná, odpovídá výchozí surovině a jsou-li cítit cizorodé látky
- Chuť – zda hodnotiteli vyhovuje celková chuť předložené šťávy.

Dotazníky byly nakonec vyhodnoceny a výsledky matematicky zpracovány.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro analýzu byly vybrány čaje bylinné a ovocné. Bylinné čaje byly zakoupeny v porcované a sypané formě za účelem srovnání obsahu účinných látek. Čaje byly vybrány podle oblíbenosti v české populaci, na základě dostupnosti v supermarketech (Billa, Interspar, Hypertnova) a také podle předpokládaného obsahu účinných látek.

Na základě literárních údajů [42], [43] bylo vybráno 13 bylinných sypaných čajů, 8 bylinných porcovaných čajů a 9 ovocných čajů.

Tabulka 2: Rozdělení zakoupených čajů použitých pro analýzu

Použité ovocné a bylinné čaje		
Bylinné čaje porcované	Bylinné čaje sypané	Ovocné čaje
Meduňka	Meduňka	Černý rybíz
Lípa	Lípa	Citrón
Heřmánek	Heřmánek	Pomeranč
Máta	Máta	Borůvka
Šípek	Šípek	Jablko-London
Třezalka	Třezalka	Hruška
Mateřídouška	Mateřídouška	Jablko-Lahoda
Kopřiva	Kopřiva	Višeň
	Tymián	
	Jitrocel	
	Divizna	
	Černý bez	
	Jablečník	

Ve vybraných vzorcích čaje byla analyzována série parametrů popisující antioxidační aktivitu těchto komplexních biologických směsí. Jako skupinové parametry byly analyzovány: celková antioxidační aktivita, celkové polyfenoly a celkové flavonoidy. K popisu antioxidačních vlastností lze použít i stanovení individuálních antioxidantů a srovnat se skupinovými parametry. Individuální antioxidanty převážně fenolické povahy byly analyzovány metodou HPLC na reversní fázi, identifikace byla verifikována metodou LC/MS. Ve vybraných vzorcích čaje byla rovněž stanovena antimutagenní aktivita pomocí kvasinkového testovacího systému *S.cerevisiae* D7.

V rámci práce bylo provedeno srovnání výše uvedených charakteristik u různě balených čajů (porcované a sypané). Dále byl sledován vliv dlouhodobého uchovávání ve stabilních podmínkách podobných běžné domácnosti na obsah aktivních látek.

Závěrem byla provedena orientační sensorická analýza čajů s využitím dvou věkově odlišných hodnotitelských souborů.

6.1 Stanovení celkové antioxidační aktivity a obsahových látek v ovocných a bylinných čajích

6.1.1 Stanovení celkové antioxidační kapacity

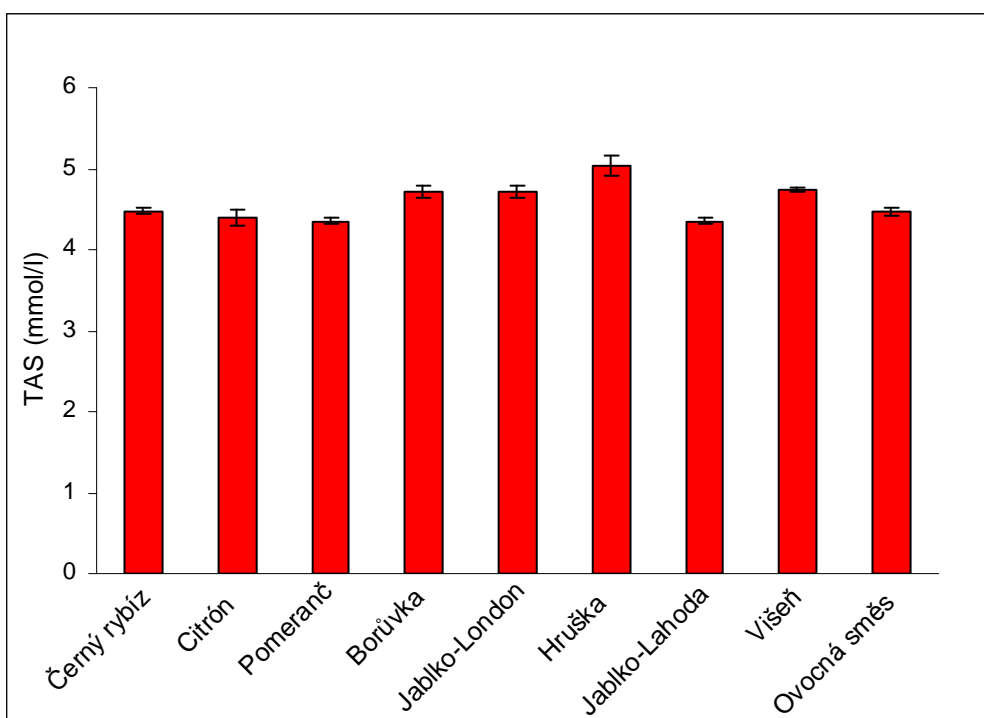
Celková antioxidační aktivita byla stanovena pomocí soupravy „Total Antioxidant Status kit“ od firmy Randox. Stanovení je založeno na principu zhasení barevného radikálového kationu antioxidantem. Koncentrace produktu radikálové reakce byla měřena spektrofotometricky, naměřené absorbance byly dosazeny do rovnice (kap. 5.2.2) a byla vypočtena celková antioxidační aktivita jednotlivých vzorků. Každé měření bylo provedeno třikrát a z těchto tří měření byla vypočtena směrodatná odchylka.

Extrakty byly připraveny zalitím jedné porce čaje nebo jedné lžičky čaje 100 ml horké vody a nechány 5 minut vyluhovat. Naměřené výsledky a porovnání hodnot TAS porcovaných a sypaných čajů jsou uvedeny v tabulkách 3,4 a grafech 1,2.

Tabulka 3: Stanovení celkové antioxidační kapacity extraktů ovocných čajů

Druh čaje	TAS (mmol/l) duben 2007
Černý rybíz	4,474 ± 0,038
Citrón	4,394 ± 0,099
Pomeranč	4,353 ± 0,037
Borůvka	4,716 ± 0,081
Jablko-London	4,716 ± 0,068
Hruška	5,038 ± 0,120
Jablko-Lahoda	4,353 ± 0,033
Višeň	4,745 ± 0,024
Ovocná směs	4,471 ± 0,048

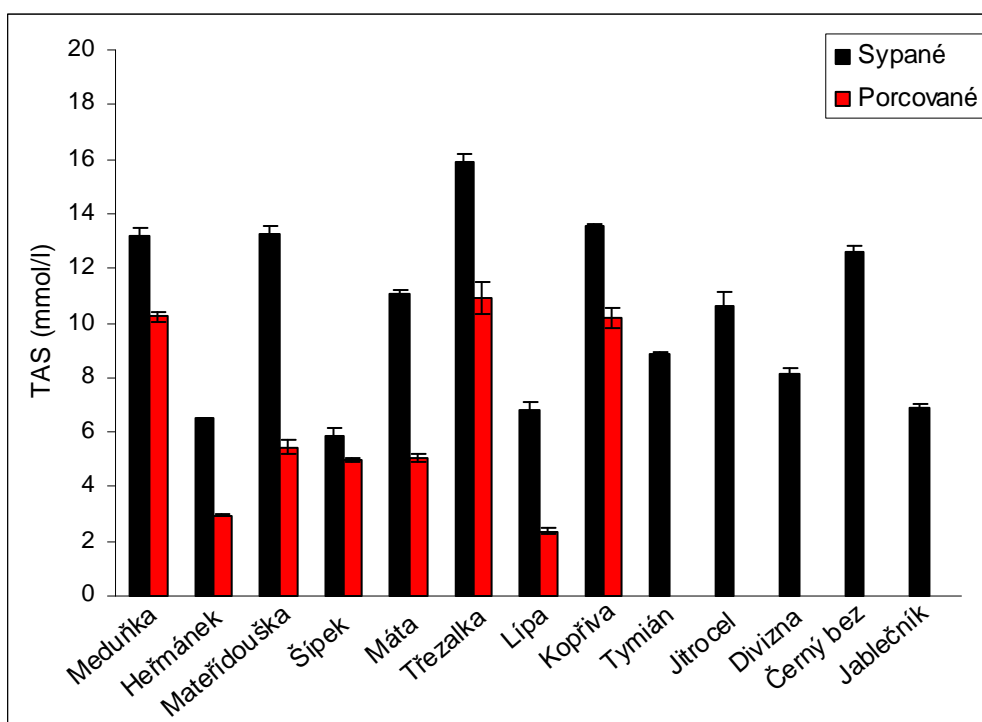
Stanovení celkové antioxidační aktivity u ovocných čajů ukázalo velmi podobné výsledky u všech vzorků ovocných čajů, které se pohybovaly v rozmezí od 4,353 mmol/l do 5,038 mmol/l. Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena u hruškového čaje a dále pak vysokou antioxidační aktivitu prokazovaly čaje z borůvky, višně a jablka (Jablko-London). Nejnižší hodnota antioxidační aktivity byla naměřena u čaje Pomeranč a Jablko-Lahoda. Podobné hodnoty TAS mohou být způsobeny podobným složením ovocných čajů. Z kapitoly 3.2.3 o ovocných čajích vyplývá, že téměř všechny ovocné čaje se skládají ze tří hlavních komponent – šípku, jablka a ibišku. Jelikož tyto tři složky mohou zastávat v čajích až více než 70%, antioxidační aktivita bude tedy závislá zejména na poměru těchto tří složek dále na původu a obsahu aktivních látek. TAS byla také změřena u čaje z čistého šípku, který sám o sobě nevykazoval příliš vysokou antioxidační aktivitu v porovnání s ostatními bylinnými čaji, ale jeho aktivita ($4,971 \pm 0,074$) se téměř shodovala s hodnotami u všech ovocných čajů obsahujících šípek. Z toho vyplývá, že se bude šípek velkou měrou podílet na celkových hodnotách TAS. Jablko, ibišek i šípek jsou rovněž známy svým vysokým obsahem vitamínu C, který rovněž může velmi ovlivnit hodnoty antioxidační aktivity. Přímá korelace mezi obsahem vitamínu C a TAS však nebyla prokázána.



Graf 1: Stanovení celkové antioxidační aktivity ovocných čajů

Tabulka 4: Stanovení celkové antioxidační kapacity extraktů bylinných sypaných a bylinných porcovaných čajů

Druh čaje	TAS (mmol/l) duben 2007 sypané čaje	TAS (mmol/l) duben 2007 porcované čaje
Meduňka	13,182 ± 0,292	10,223 ± 0,188
Heřmánek	6,500 ± 0,052	2,951 ± 0,047
Mateřídouška	13,244 ± 0,323	5,452 ± 0,248
Šípek	5,886 ± 0,260	4,971 ± 0,074
Máta	11,044 ± 0,139	5,05 ± 0,118
Třezalka	15,931 ± 0,272	10,904 ± 0,598
Lípa	6,823 ± 0,283	2,373 ± 0,120
Kopřiva	13,558 ± 0,090	10,183 ± 0,335
Tymián	8,901 ± 0,068	-
Jitrocel	10,655 ± 0,451	-
Divizna	8,115 ± 0,231	-
Černý bez	12,593 ± 0,218	-
Jablečník	6,865 ± 0,155	-



Graf 2: Porovnání celkové antioxidační aktivity bylinných sypaných a bylinných porcovaných čajů

Celková antioxidační aktivita byla stanovena u třinácti bylinných sypaných čajů a osmi porcovaných bylinných čajů stejného typu. V tabulce 4 lze pozorovat, že nejvyšší hodnoty TAS vykazovaly extrakty z třezalky, kopřivy, meduňky a mateřídoušky. Nejvyšší hodnoty TAS u jmenovaných bylin odpovídají hodnotám jak u sypaných, tak u porcovaných čajů. Třezalka a meduňka se rovněž projevují velmi vysokými hodnotami celkových polyfenolů, které mohou mít vliv na hodnoty celkové antioxidační aktivity (viz dále). Nejnížší hodnoty TAS vykazovaly v tomto testu lípa, heřmáněk a šípek, což odpovídá také velmi nízkým hodnotám polyfenolů a flavonoidů stanovených v extraktech těchto třech čajů. Jedním z cílů této studie je porovnání aktivních látek v sypaných čajích a v porcovaných čajích. Z grafu 2 je možno vypožorovat, že všechny sypané čaje vykazovaly jednoznačně vyšší antioxidační aktivitu než čaje porcované téhož druhu. Tento rozdíl TAS může být způsoben tím, že porcované čaje jsou rozdraceny na menší části a čaj má větší plochu pro styk se vzduchem a může docházet k rychlejší oxidaci. Tato myšlenka je v rozporu s některými výzkumy, které přisuzují vyšší antioxidační aktivitu porcovaným čajům se zdůvodněním, že porcované čaje s menšími částicemi mají větší plochu styku s vodou a po zalití dochází k rychlejší extrakci aktivních látek.

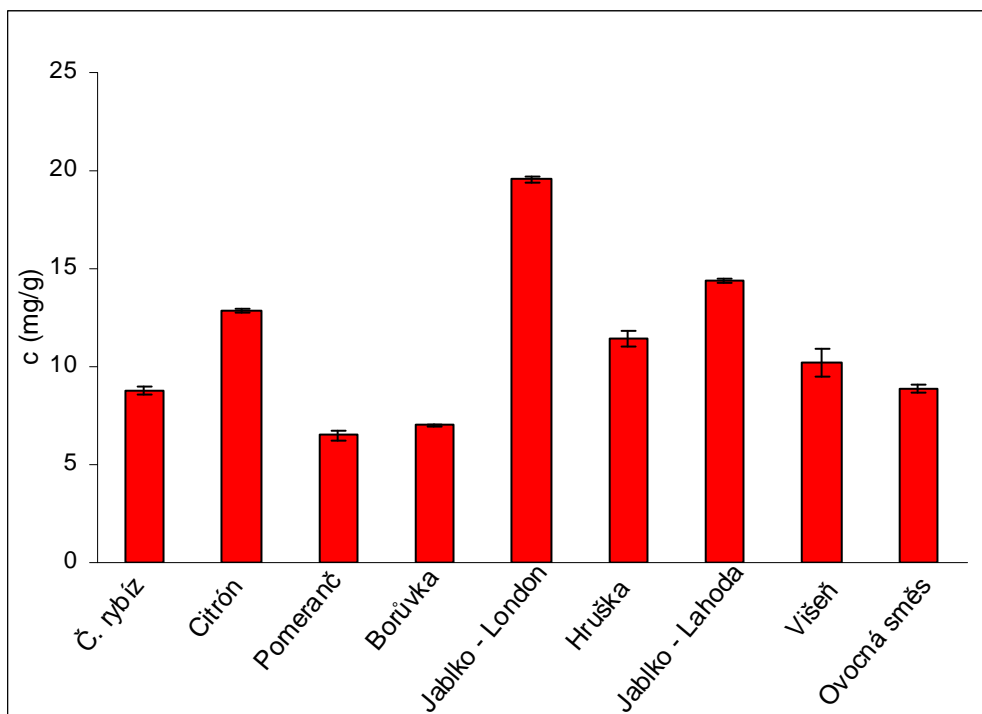
Ze srovnání antioxidační aktivity ovocných čajů s čaji bylinnými je patrné, že bylinné čaje několikanásobně převažují svými hodnotami nad čaji ovocnými, navíc hodnoty TAS u bylinných čajů jsou značně rozdílné podle typu byliny. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že u bylin obsahuje každá matrice řadu různých chemicky odlišných látek a druhově závislou distribuci antioxidantů, kdežto všechny ovocné čaje mají velmi podobný základ čajové směsi (jablko, šípek, ibišek). Tato směs však neobsahuje tolik účinných látek jako čaje bylinné.

6.1.2 Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení celkových polyfenolů bylo provedeno pomocí Folin-Ciocalteuovy metody. Detekce byla provedena spektrofotometricky a výpočet celkového obsahu polyfenolů byl proveden s použitím kalibrační závislosti standardu kyseliny gallové (viz příloha č. 1). Regresní rovnice pro výpočet celkové koncentrace polyfenolů byla $y = 1,7042x + 0,0976$. Výsledky jsou vypočteny jako průměrná hodnota ze tří opakovaných měření každého extraktu a stejně tak směrodatná odchylka je vypočtena z těchto tří měření.

Tabulka 5: Celkový obsah polyfenolů v ovocných čajích

Druh čaje	Koncentrace polyfenolů březen 2007 (mg/g)
Černý rybíz	8,778 ± 0,243
Citrón	12,866 ± 0,119
Pomeranč	6,488 ± 0,242
Borůvka	7,022 ± 0,050
Jablko-London	19,541 ± 0,168
Hruška	11,418 ± 0,387
Jablko-Lahoda	14,365 ± 0,088
Višeň	10,208 ± 0,720
Ovocná směs	8,855 ± 0,215



Graf 3: Stanovení obsahu celkových polyfenolů v ovocných čajích

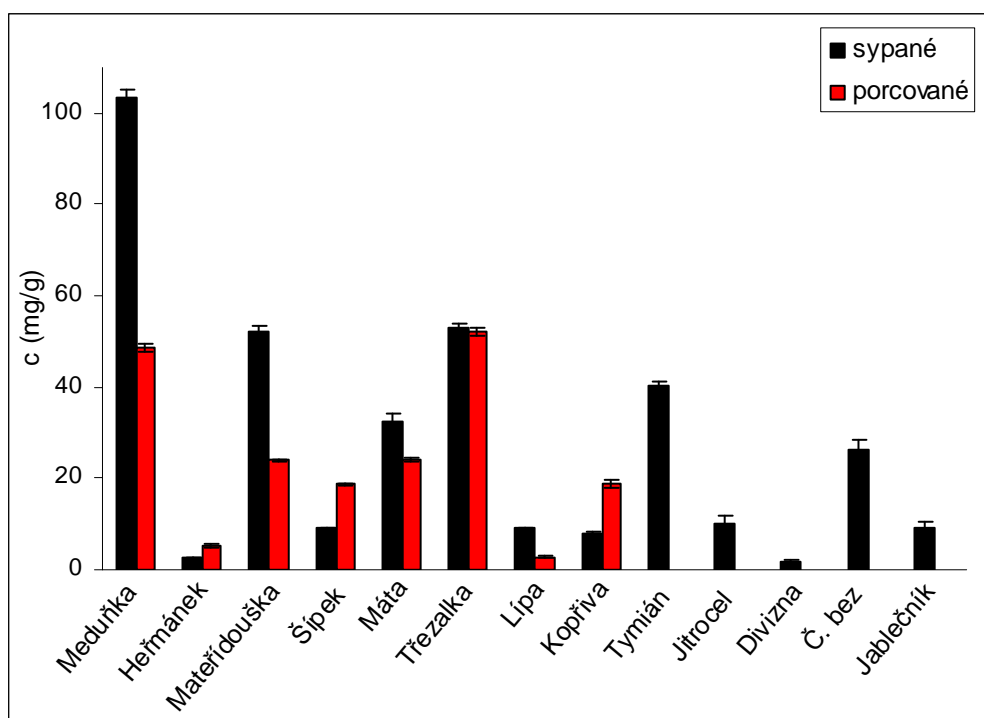
V tabulce 5 a grafu 3 je možné vidět, že nejvyšší obsah polyfenolů u ovocných čajů byl naměřen u obou jablečných čajů a citrónu. Vysoký obsah polyfenolů v jablečných čajích je pravděpodobně způsoben vysokým obsahem jablečné dužiny. U čaje Jablko – Lahoda je součástí směsi až 77% jablečné dužiny. U čaje Jablko – London je deklarován obsah 29% jablečné dužiny a 24% skořice, která také může ovlivnit celkový obsah polyfenolů. Nejnižší obsah polyfenolů byl naměřen v čaji z pomeranče.

Tabulka 6: Celkový obsah polyfenolů v bylinných sypaných čajích a bylinných porcovaných čajích

Druh čaje	Koncentrace polyfenolů březen 2007 (mg/g) sypané čaje	Koncentrace polyfenolů březen 2007 (mg/g) porcované čaje
Meduňka	103,642 ± 1,383	48,737 ± 0,791
Heřmánek	2,542 ± 0,286	5,213 ± 0,487
Mateřídouška	52,079 ± 1,174	23,921 ± 0,292
Šípek	9,012 ± 0,105	18,731 ± 0,219
Máta	32,429 ± 1,615	24,083 ± 0,447
Třezalka	52,939 ± 0,875	52,114 ± 1,047
Lípa	9,080 ± 0,221	2,784 ± 0,169
Kopřiva	7,996 ± 0,186	19,058 ± 0,877
Tymián	40,229 ± 1,096	-
Jitrocel	10,202 ± 1,621	-
Divizna	1,748 ± 0,241	-
Černý bez	26,472 ± 1,979	-
Jablečník	9,237 ± 1,464	-

V extraktech ovocných a bylinných čajů byly zjištěny koncentrace polyfenolů ve velmi širokém rozsahu. Hodnoty celkových polyfenolů se pohybovaly v rozmezí od 1,748 mg/g až do 103,642 mg/g.

Z tabulky 6 a grafu 4 je patrné, že nejvyšší obsah polyfenolů u bylinných porcovaných čajů byl naměřen extraktech z třezalky a meduňky. Nejnižší obsah polyfenolů byl naměřen v extraktech z lípy a heřmánku. Nejvyšší obsah polyfenolů v sypaných bylinných čajích byl naměřen opět v extraktech z meduňky a třezalky. Velmi vysoký obsah polyfenolů byl také naměřen v extraktech z mateřídoušky, tymiánu a máty. Meduňka v tomto testu projevuje velmi výjimečné vlastnosti, co se týká obsahu celkových polyfenolů. Některé byliny převyšuje více než padesátinásobně.



Graf 4: Porovnání obsahu celkových polyfenolů v bylinných sypaných a bylinných porcovaných čajích

V grafu 4 je znázorněno porovnání polyfenolů v porcovaných a sypaných čajích. Je zde vidět, že ve většině případů, s výjimkou heřmánku, šípku a kopřivy, byl naměřen výrazně vyšší obsah polyfenolů v sypaných čajích. Z toho lze usuzovat, že obal porcované formy pravděpodobně působí jako filtr nebo sorbent, který zadrží část aktivních látek daných čajů. Dalším důvodem menšího obsahu polyfenolických látek v extraktech z porcovaných čajů může být větší plocha listů, protože jsou nadrceny na menší částičky a tím může docházet k rychlejší oxidaci polyfenolů a ztrátě antioxidačních účinku během skladování čaje. Tato myšlenka si ale odporuje s teorií uvedenou v kapitole 3.3.5 o flavonoidech, kde je z důvodu větší extrakční plochy čaje očekáván větší obsah vyextrahovaných polyfenolických látek. Důvodem výkyvů může být jednak poněkud omezená citlivost použité metody, ale rovněž odlišná chemická povaha aktivních složek přítomných v extraktech připravených z rozdílných bylin. Polyfenoly v rostlinách mohou být velice rozdílně rozloženy a někdy mohou být přítomny ve velice vysokých nebo naopak velice nízkých koncentracích.

Podle literatury [42] mají různé fenolické sloučeniny různé odezvy v tomto testu. Molární odezva této metody je přibližně úměrná k počtu fenolových hydroxylových skupin v daném substrátu, ale redukující kapacita se zvětšuje, pokud jsou dvě fenolové hydroxylové skupiny v poloze ortho nebo para. Tyto strukturální vlastnosti fenolických sloučenin jsou údajně zodpovědné za antioxidační aktivitu a měření polyfenolů v nálevech může být spojeno s jejich celkovými antioxidačními vlastnostmi.

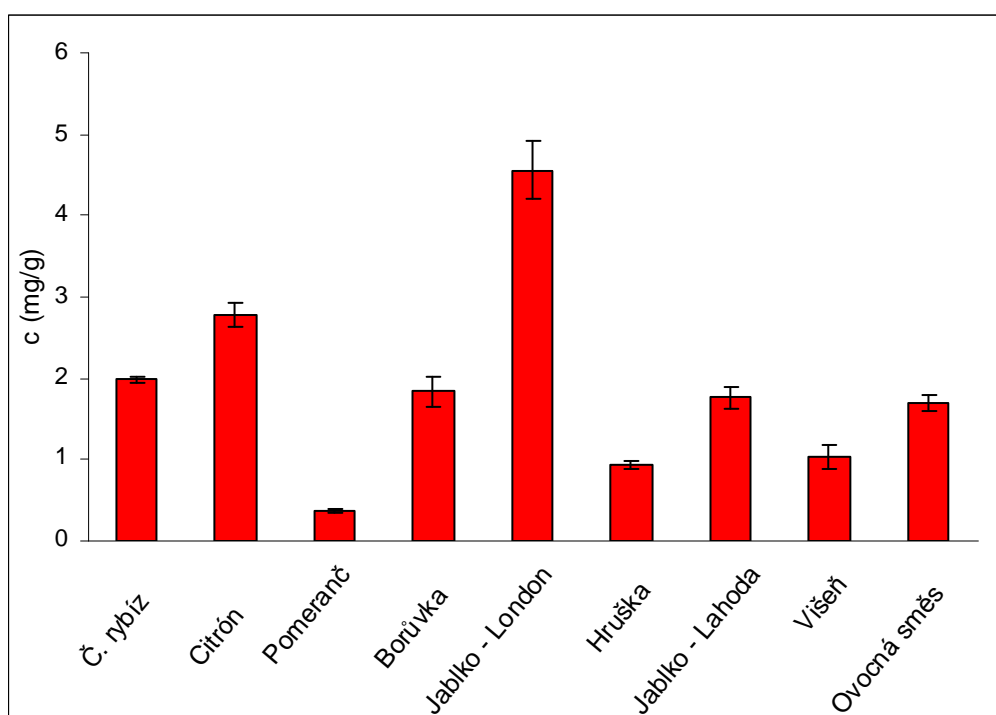
U bylinných porcovaných čajů byla prokázána přímá korelace mezi obsahem polyfenolů a hodnotami celkové antioxidační aktivity ($r = 0,928$). U čajů ovocných a bylinných sypaných však nebyla prokázána korelace mezi celkovým polyfenoly a TAS, takže na celkové hodnotě antioxidační aktivity se zřejmě podílejí významně i jiné než fenolické látky.

6.1.3 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení celkových flavonoidů bylo provedeno pomocí orientační metody s hlinitou solí (viz kap. 5.2.4). Detekce byla provedena spektrofotometricky a výpočet celkového obsahu flavonoidů byl proveden podle kalibrační závislosti standardu katechinu (viz příloha č. 2). Regresní rovnice pro výpočet koncentrace flavonoidů byla $y = 3,5855x + 0,0807$. Výsledky jsou vypočteny jako průměrná hodnota ze tří opakovaných měření každého extraktu.

Tabulka 7: Celkový obsah flavonoidů v ovocných čajích

Druh čaje	Koncentrace flavonoidů březen 2007 (mg/g)
Černý rybíz	1,982 ± 0,034
Citrón	2,782 ± 0,147
Pomeranč	0,372 ± 0,023
Borůvka	1,838 ± 0,185
Jablko-London	4,558 ± 0,363
Hruška	0,936 ± 0,043
Jablko-Lahoda	1,759 ± 0,137
Višeň	1,028 ± 0,144
Ovocná směs	1,699 ± 0,105



Graf 5: Stanovení obsahu celkových flavonoidů v ovocných čajích

Nejvýznamnější vliv na zdraví člověka mají flavonoidy díky svým antioxidačním a chelatačním schopnostem. Předností jejich antioxidačních vlastností je inhibice tvorby a oxidace LDL, čímž se projevuje jejich kardioprotektivní efekt. Ochranná role flavonoidů v lidské stravě byla také hlavním cílem řady výzkumných studií [44]. Například, vysoký příjem flavonoidů předurčuje nižší úmrtnost na choroby koronárních artérií a nižší výskyt infarktu myokardu u starších mužů [44].

U stanovení obsahu celkových flavonoidů vykazovaly nejvyšší hodnoty ovocné čaje Jablko-London ($4,558 \pm 0,363$) a čaj Citrón. Nejnižší obsah flavonoidů byl naměřen v čaji z pomeranče a hrušky. U čaje Jablko-London byla prokázána nejvyšší hodnota flavonoidů a rovněž vykazoval nejvyšší hodnoty v testu pro stanovení celkových polyfenolů. Byla prokázána korelace mezi obsahem flavonoidů a polyfenolů v ovocných čajích ($r = 0,5796$).

Tabulka 8: Celkový obsah flavonoidů v bylinných sypaných čajích a bylinných porcovaných čajích

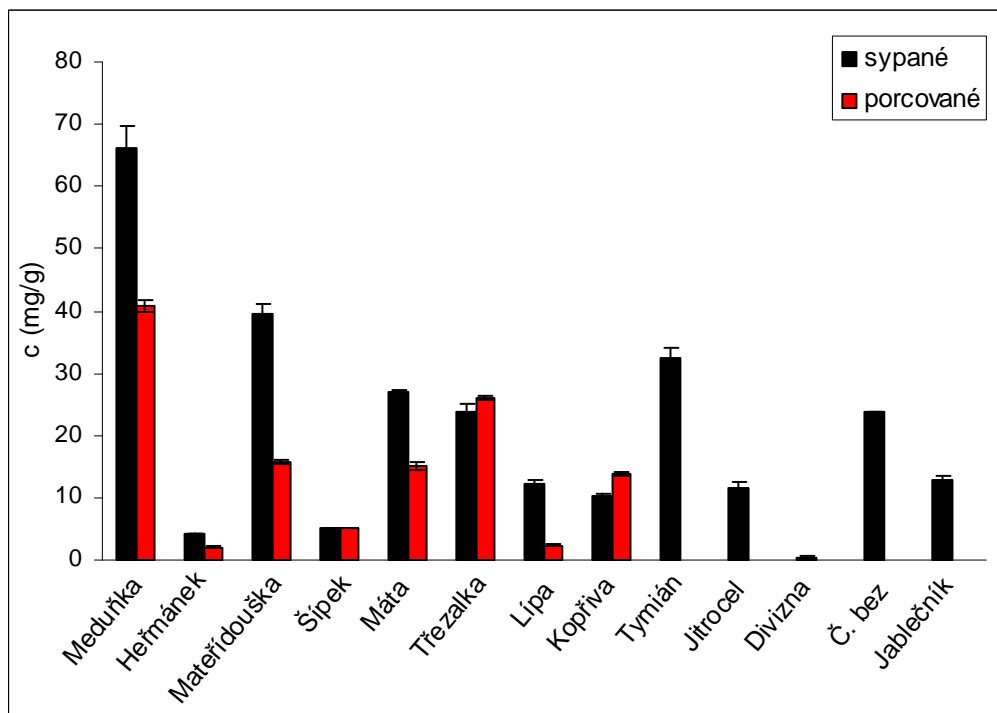
Druh čaje	Koncentrace flavonoidů březen 2007 (mg/g) sypané čaje	Koncentrace flavonoidů březen 2007 (mg/g) porcované čaje
Meduňka	$66,138 \pm 3,736$	$40,689 \pm 0,984$
Heřmánek	$4,213 \pm 0,038$	$1,976 \pm 0,120$
Mateřídouška	$39,663 \pm 1,543$	$15,657 \pm 0,274$
Šípek	$5,154 \pm 0,119$	$5,194 \pm 0,096$
Máta	$26,908 \pm 0,495$	$14,995 \pm 0,677$
Třezalka	$23,875 \pm 1,227$	$26,034 \pm 0,195$
Lípa	$12,272 \pm 0,719$	$2,297 \pm 0,136$
Kopřiva	$10,160 \pm 0,517$	$13,743 \pm 0,317$
Tymián	$32,403 \pm 1,78$	-
Jitrocel	$11,485 \pm 0,900$	-
Divizna	$0,430 \pm 0,080$	-
Černý bez	$23,630 \pm 0,090$	-
Jablečník	$13,009 \pm 0,492$	-

Při stanovení celkových flavonoidů v bylinných sypaných čajích byl naměřen nejvyšší obsah těchto látek v extraktu z meduňky ($66,138 \pm 3,736$). Z celého testu pro stanovení celkových flavonoidů byla meduňka nejúčinnější ze všech testovaných čajů. Také čaje z mateřídoušky, máty a tymiánu vykazovaly vysoké hodnoty flavonoidů.

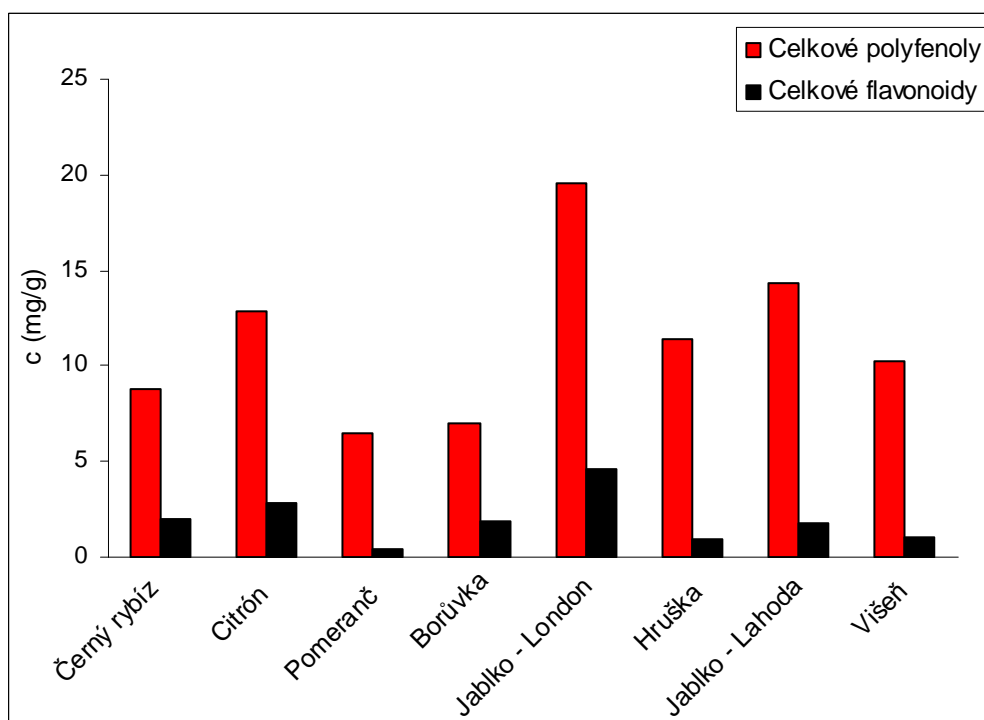
Nejnižší hodnoty celkových flavonoidů byly naměřeny v čajích z lípy, heřmánku a divizny, což odpovídá rovněž velmi nízkým hodnotám naměřených v testech pro stanovení celkové antioxidační aktivity a stanovení celkových polyfenolů. Rovněž šípek vykazoval velmi nízké hodnoty obsahu celkových flavonoidů ($5,154 \pm 0,119$). Nízký obsah těchto aktivních látek mohl zapříčinit také celkově velmi nízké hladiny flavonoidů v ovocných čajích, jichž je šípek významnou složkou.

V grafu 6 je znázorněno porovnání bylinných sypaných a bylinných porcovaných čajů. Téměř ve všech případech byl vyšší obsah flavonoidů v sypaných čajích. U meduňky byl obsah flavonoidů v sypaných čajích vyšší o 38% než v čajích porcovaných. Výjimkou byly

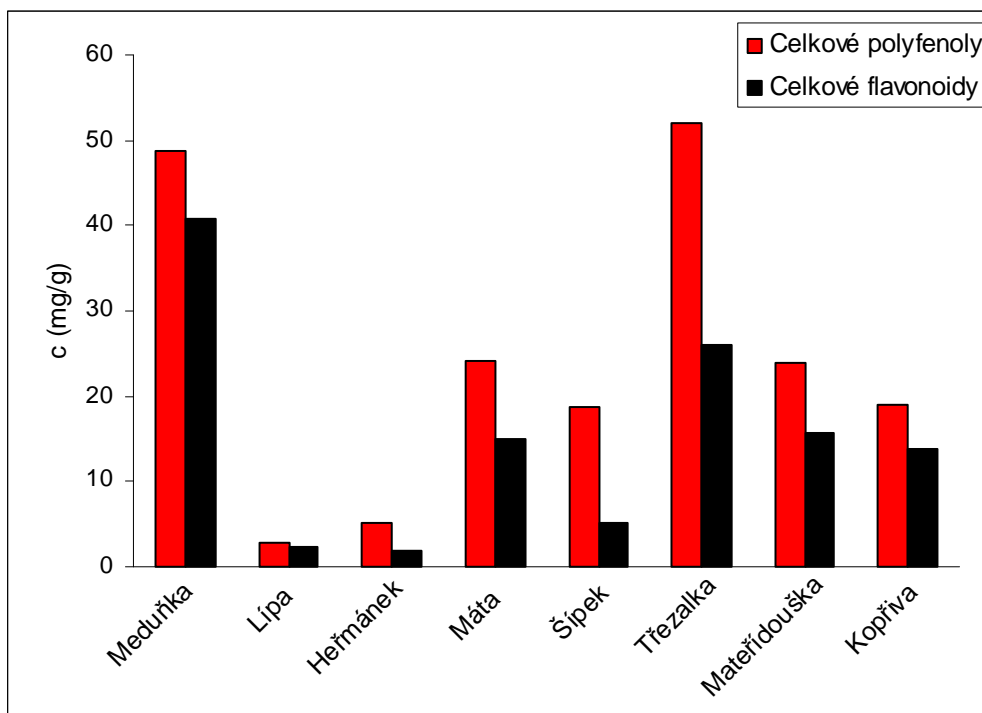
čaje z třezalky a kopřivy, kde byl prokázán poněkud vyšší obsah flavonoidů u porcovaných čajů.



Graf 6: Porovnání obsahu celkových flavonoidů v bylinných sypaných a bylinných porcovaných čajích



Graf 7: Porovnání obsahu celkových polyfenolů a flavonoidů v ovocných čajích



Graf 8: Porovnání obsahu celkových polyfenolů a flavonoidů v bylinných porcovaných čajích

V grafech 7 a 8 je uvedeno porovnání obsahu polyfenolů a flavonoidů v ovocných čajích a bylinných porcovaných čajích. Z těchto grafů vyplývá jaký obsah z celkových polyfenolů zastávají v jednotlivých čajích flavonoidy. U ovocných čajů je to menší část, nejvyšší procento tvoří flavonoidy v čaji Jablko-London (23%). U bylinných čajů flavonoidy tvoří mnohem větší procento účinných polyfenolických látek. U meduňky je to až 83%, vykazuje ve všech testech velmi vysoké hodnoty jak celkových polyfenolů a flavonoidů, tak celkové antioxidační aktivity. Byla prokázána rovněž přímá korelace mezi obsahem celkových polyfenolů a flavonoidů u porcovaných čajů ($r = 0,839$) a u ovocných čajů ($r = 0,5796$).

6.1.4 HPLC analýza flavonoidů

Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu vzorků čaje byla použita HPLC metoda (viz kap. 5.2.5). Pro analýzu byly použity vodné extrakty čajů, kdy buď jedna porce nebo jedna lžička u sypaných čajů byla zalita 100 ml horké vody. Stanovovány byly látky flavonoidního typu. Obsahy aktivních látek byly odečteny z kalibračních závislostí, které byly sestaveny za použití příslušných standardů. Ze standardů katechinů byl měřen (-)-katechin, epikatechin, epikatechin gallát a z ostatních flavonoidů rutin, morin, quercetin, kaempferol, luteolin a myricetin (tabulka 9, přílohy 3,4,5,6,7,8).

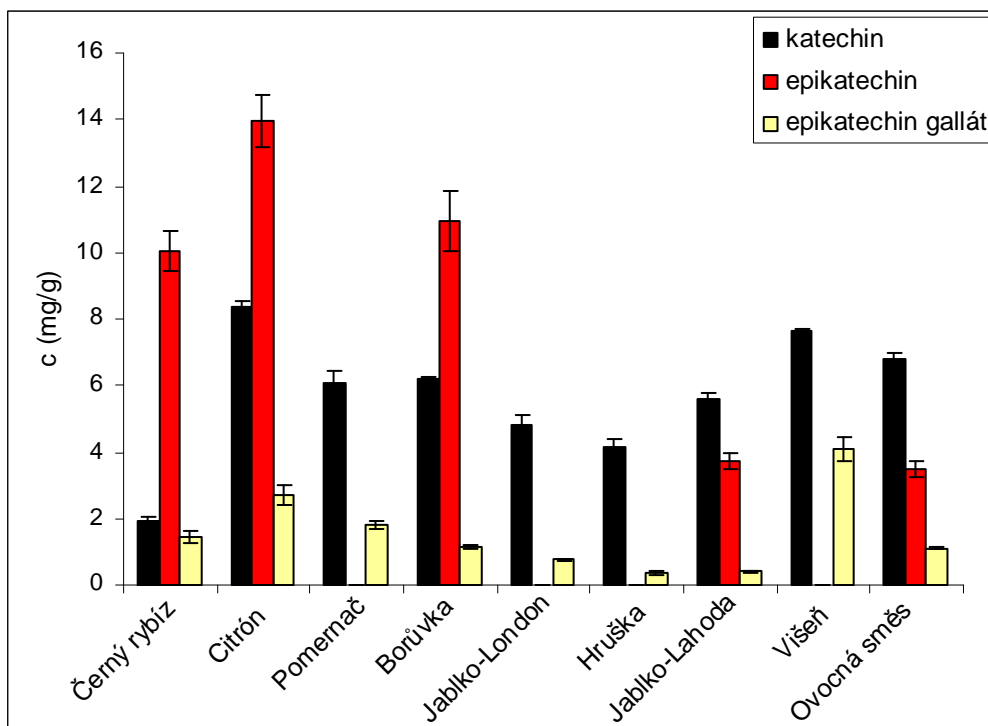
Všechny vzorky byly proměřeny třikrát a z naměřených hodnot byla vypočtena průměrná hodnota a směrodatná odchylka. Byl stanoven obsah jednotlivých flavonoidních látek a také porovnán obsah těchto látek v porcovaných a sypaných čajích.

Tabulka 9: Kalibrační závislosti použitých standardů

Standard	Regresní rovnice	Regresní koeficient
Katechin	$y \text{ (mV.s)} = 40376x \text{ (mg/ml)}$	$R^2 = 0,9936$
Epikatechin	$y \text{ (mV.s)} = 55044x \text{ (mg/ml)}$	$R^2 = 0,992$
Epikatechin gallát	$y \text{ (mV.s)} = 201533x \text{ (mg/ml)}$	$R^2 = 1$
Rutin	$y \text{ (mV.s)} = 115416x \text{ (mg/ml)}$	$R^2 = 0,9909$
Morin	$y \text{ (mV.s)} = 149312x \text{ (mg/ml)}$	$R^2 = 0,9923$
Quercetin	$y \text{ (mV.s)} = 297508x \text{ (mg/ml)}$	$R^2 = 0,9959$
Kaempferol	$y \text{ (mV.s)} = 465209x \text{ (mg/ml)}$	$R^2 = 0,9866$
Myricetin	$y \text{ (mV.s)} = 417595x \text{ (mg/ml)}$	$R^2 = 0,9993$
Luteolin	$y \text{ (mV.s)} = 216431x \text{ (mg/ml)}$	$R^2 = 0,995$

Tabulka 10: Obsah katechinu, epikatechinu a epikatechin gallátu v ovocných čajích

Druh čaje	Koncentrace katechinu duben 2007 (mg/g)	Koncentrace epikatechinu duben 2007 (mg/g)	Koncentrace epikatechin gallátu duben 2007 (mg/g)
Černý rybíz	1,913 ± 0,123	10,044 ± 0,592	1,421 ± 0,187
Citrón	8,356 ± 0,195	13,956 ± 0,764	2,703 ± 0,290
Pomeranč	6,081 ± 0,682	-	1,822 ± 0,114
Borůvka	6,208 ± 0,069	10,934 ± 0,893	1,164 ± 0,058
Jablko-London	4,808 ± 0,492	-	0,761 ± 0,040
Hruška	4,164 ± 0,816	-	0,385 ± 0,062
Jablko-Lahoda	5,606 ± 0,228	3,720 ± 0,230	0,406 ± 0,031
Višeň	7,621 ± 1,218	-	4,112 ± 0,363
Ovocná směs	6,813 ± 0,176	3,488 ± 0,251	1,099 ± 0,029



Graf 9: Obsah katechinu, epikatechinu a epikatechin gallátu v ovocných čajích

Katechin byl detekován ve všech analyzovaných vzorcích v rozsahu 1,541 mg/g (divizna) až 32,024 mg/g (třezalka). Téměř ve všech testovaných souborech katechin výrazně převyšoval obsah ostatních analyzovaných látek katechinového typu. Vysoká koncentrace katechinu v ovocném čaji Citrón odpovídá všem předchozím testům pro stanovení celkové antioxidační aktivity, celkových polyfenolů a flavonoidů, kde Citrón vykazoval nejvyšší hodnoty účinných látek z ovocných čajů.

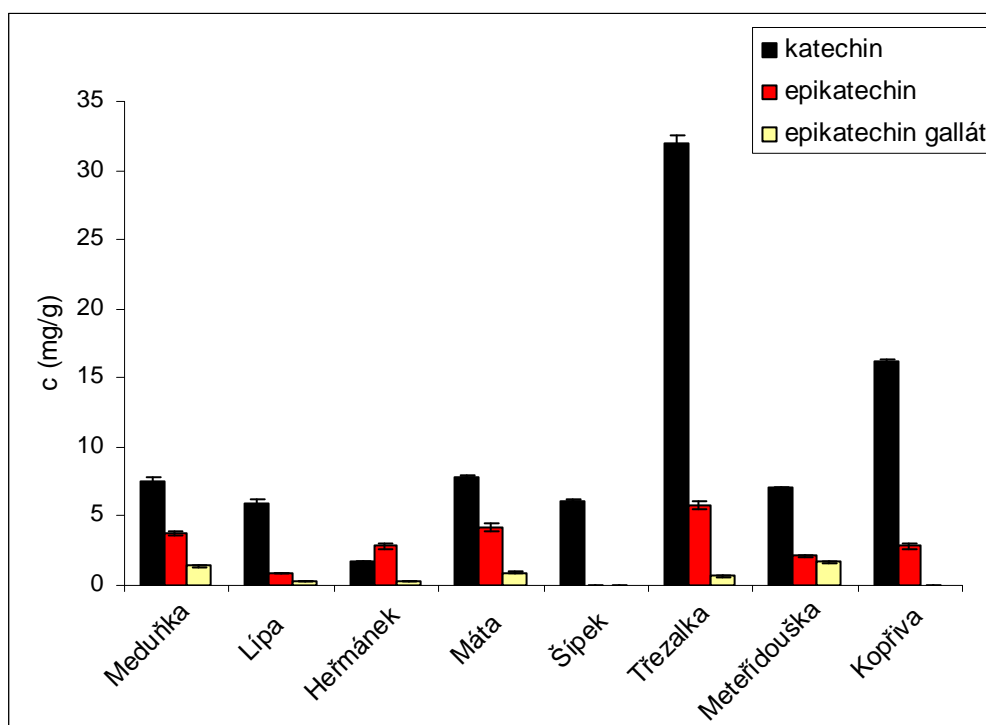
Epikatechin nebyl zjištěn ve všech extraktech ovocných čajů, ale zajímavým poznatkem je, že byl analyzován v relativně vysokých hodnotách v ovocných čajích od jednoho výrobce (černý rybíz, citrón, borůvka a ovocná směs). Od ostatních použitých ovocných čajů se liší ve složení tím, že všechny jmenované čaje obsahují plody jeřabiny, trnky a černého bezu. Přítomnost těchto sušených plodů mohla zapříčinit zvýšený obsah epikatechinu.

Epikatechin gallát byl analyzován ve všech ovocných čajích. Koncentrace této látky však byla relativně nízká při srovnání s obsahem ostatních účinných látek katechinového typu.

Všechny tři analyzované deriváty katechinu byly stanoveny opět pouze v čajích od jednoho výrobce (černý rybíz, citrón, borůvka a ovocná směs) a také v čaji Jablko-Lahoda.

Tabulka 11: Obsah katechinu, epikatechinu a epikatechin gallátu v bylinných porcovaných čajích

Druh čaje	Koncentrace katechinu duben 2007 (mg/g)	Koncentrace epikatechinu duben 2007 (mg/g)	Koncentrace epikatechin gallátu duben 2007 (mg/g)
Meduňka	7,583 ± 0,243	3,749 ± 0,090	1,388 ± 0,039
Lípa	5,919 ± 0,286	0,854 ± 0,037	0,248 ± 0,018
Heřmánek	1,740 ± 0,058	2,823 ± 0,167	0,239 ± 0,005
Máta	7,850 ± 0,108	4,164 ± 0,273	0,900 ± 0,075
Šípek	6,127 ± 0,122	-	-
Třezalka	32,024 ± 0,471	5,816 ± 0,324	0,662 ± 0,064
Mateřídouška	7,102 ± 0,016	2,129 ± 0,090	1,697 ± 0,077
Kopřiva	16,255 ± 0,142	-	-

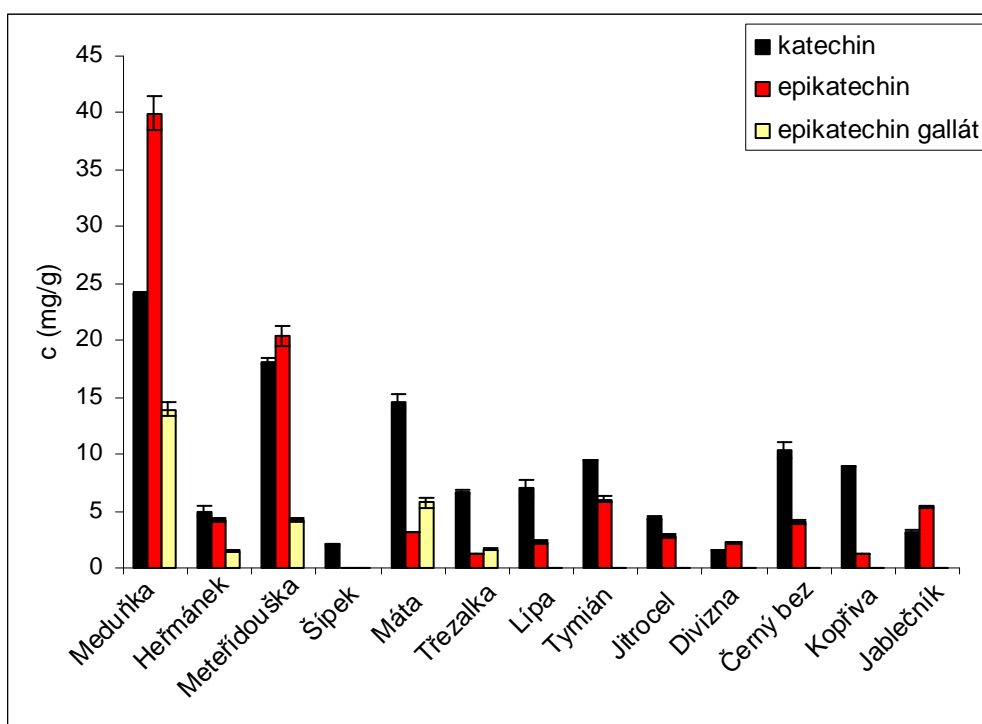


Graf 10: Obsah katechinu, epikatechinu a epikatechin gallátu v bylinných porcovaných čajích

Obsah katechinu v bylinných porcovaných čajích nijak výrazně nepřevyšoval koncentrace stanovené v čajích ovocných. Výjimkou je pouze třezalka, která vykazuje nejvyšší hodnotu obsahu katechinu ze všech vzorků (32,024 ± 0,471). Epikatechin byl naměřen téměř ve všech porcovaných čajích kromě kopřivy a šípku. Z nepřítomnosti epikatechinu v šípku můžeme odvodit poznatek, že zvýšené koncentrace epikatechinu v ovocných čajích jsou zapříčiněny jinými složkami než šípkem, jablkem a ibiškem.

Tabulka 12: Obsah katechinu, epikatechinu a epikatechin gallátu v bylinných sypaných čajích

Druh čaje	Koncentrace katechinu duben 2007 (mg/g)	Koncentrace epikatechinu duben 2007 (mg/g)	Koncentrace epikatechin gallátu duben 2007 (mg/g)
Meduňka	24,120 ± 0,124	39,957 ± 1,491	13,934 ± 0,577
Heřmáněk	4,988 ± 0,407	4,236 ± 0,171	1,452 ± 0,045
Mateřídouška	18,166 ± 0,261	20,396 ± 0,798	4,237 ± 0,145
Šípek	2,069 ± 0,098	-	-
Máta	14,581 ± 0,743	3,161 ± 0,061	5,743 ± 0,456
Třezalka	6,649 ± 0,158	1,265 ± 0,047	1,661 ± 0,081
Lípa	7,038 ± 0,644	2,309 ± 0,125	-
Tymián	9,465 ± 0,025	6,036 ± 0,281	-
Jitrocel	4,417 ± 0,123	2,758 ± 0,152	-
Divizna	1,541 ± 0,018	2,228 ± 0,066	-
Černý bez	10,387 ± 0,696	3,983 ± 0,172	-
Kopřiva	8,966 ± 0,010	1,212 ± 0,049	-
Jablečník	3,201 ± 0,132	5,443 ± 0,149	-

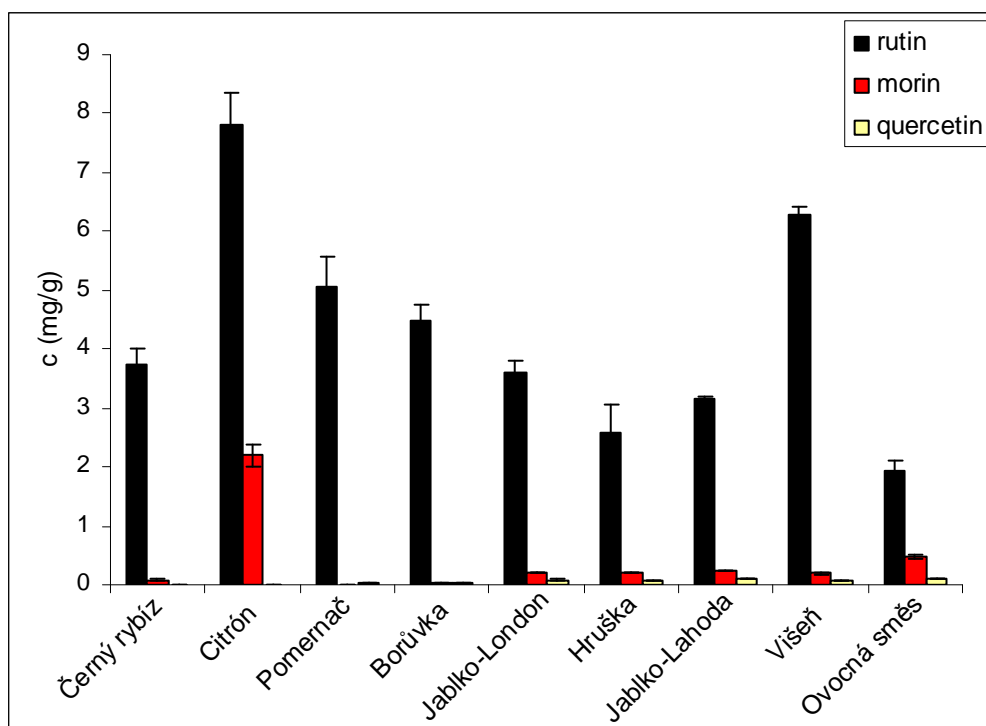


Graf 11: Obsah katechinu, epikatechinu a epikatechin gallátu v bylinných sypaných čajích

V grafu 11 jsou znázorněny obsahy jednotlivých analyzovaných látek katechinového typu. Katechin byl stanoven ve všech vzorcích bylinných sypaných čajů. Zvýšené koncentrace katechinu byly přítomny v extraktech z meduňky, mateřídoušky a máty. Epikatechin byl naměřen ve všech bylinách kromě šípku, čímž je potvrzeno zdůvodnění uvedené výše, o příčině přítomnosti epikatechinu v určitých ovocných čajích. Výrazné zastoupení má epikatechin v meduňce a metřídoušce. Meduňka vykazovala ve všech předchozích testech výrazné hodnoty, které mohly být podpořeny přítomností všech tří stanovovaných katechinů.

Tabulka 13: Obsah rutinu, morinu a quercetinu v ovocných čajích

Druh čaje	Koncentrace rutinu duben 2007 (mg/g)	Koncentrace morinu duben 2007 (mg/g)	Koncentrace quercetinu duben 2007 (mg/g)
Černý rybíz	3,728 ± 0,273	0,075 ± 0,020	0,013 ± 0,000
Citrón	7,795 ± 0,555	2,198 ± 0,189	-
Pomeranč	5,054 ± 0,506	-	0,043 ± 0,004
Borůvka	4,478 ± 0,263	0,038 ± 0,002	0,034 ± 0,006
Jablko-London	3,612 ± 0,206	0,212 ± 0,008	0,076 ± 0,011
Hruška	2,585 ± 0,484	0,216 ± 0,002	0,054 ± 0,001
Jablko-Lahoda	3,163 ± 0,018	0,243 ± 0,003	0,104 ± 0,008
Višeň	6,296 ± 0,136	0,194 ± 0,008	0,057 ± 0,003
Ovocná směs	1,950 ± 0,155	0,479 ± 0,036	0,103 ± 0,004



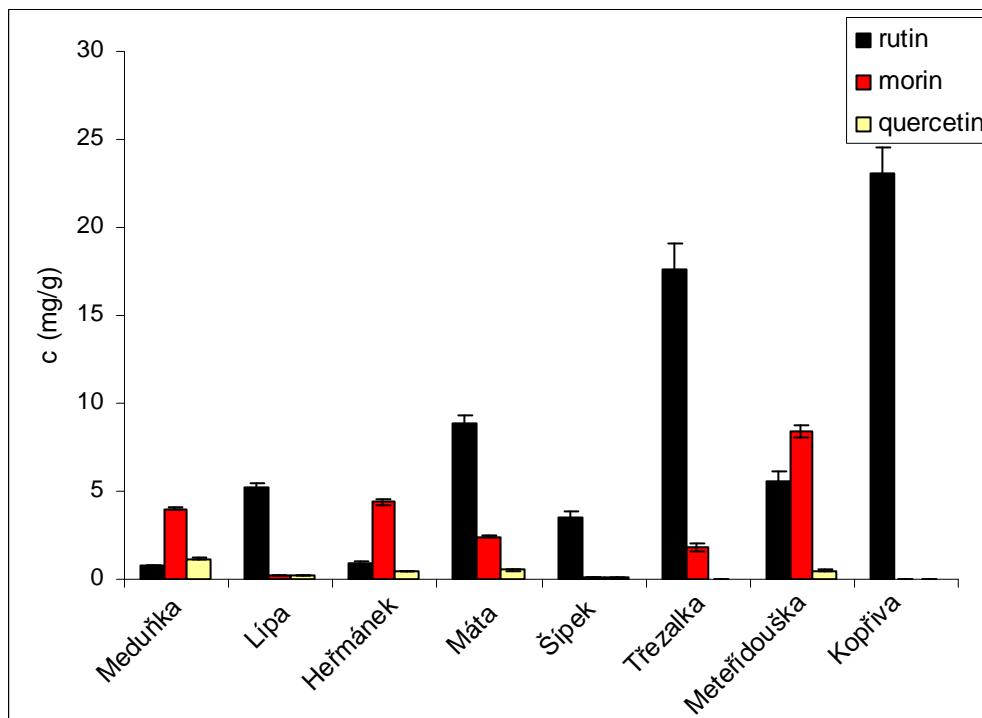
Graf 12: Obsah rutinu, morinu a quercetinu v ovocných čajích

Ve všech čajích byly analyzovány kromě látek katechinového typu i další flavonoidy. Rutin byl stanoven ve všech vzorcích. V ovocných čajích byl rutin přítomen v mnohonásobně vyšších koncentracích než morin a quercetin. Největší hladina rutinu byla stanovena v citrónovém čaji. Vysoký obsah rutinu a rovněž katechinu a epikatechinu v ovocných čajích zapřičiňují pravděpodobně vysoké odezvy citrónového čaje i v předchozích testech.

Obsah morinu byl výrazný pouze u citrónového čaje ($2,198 \pm 0,189$) a obsahy quercetinu byly v porovnání s rutinem téměř zanedbatelné, což je zřejmě způsobeno převažující přítomností quercetinu v glykosidické formě, tedy jako vázaný ve formě rutinu.

Tabulka 14: Obsah rutinu, morinu a quercetinu v bylinných porcovaných čajích

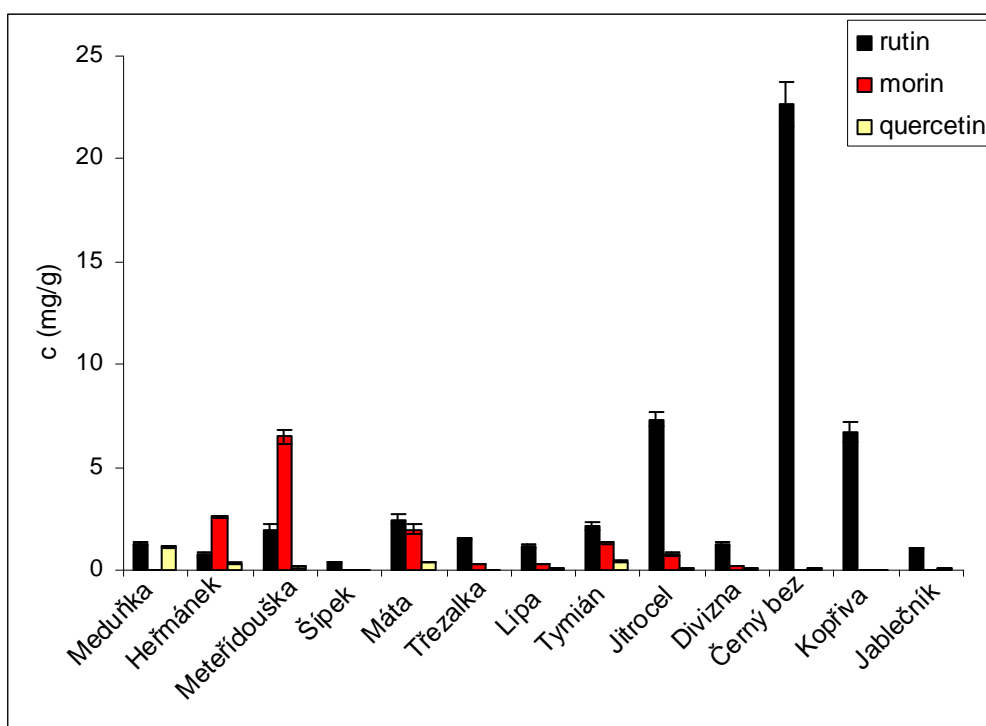
Druh čaje	Koncentrace rutinu duben 2007 (mg/g)	Koncentrace morinu duben 2007 (mg/g)	Koncentrace quercetinu duben 2007 (mg/g)
Meduňka	$0,813 \pm 0,031$	$4,022 \pm 1,721$	$1,166 \pm 0,042$
Lípa	$5,207 \pm 0,224$	$0,247 \pm 1,715$	$0,249 \pm 0,014$
Heřmánek	$0,882 \pm 0,128$	$4,410 \pm 0,177$	$0,450 \pm 0,009$
Máta	$8,827 \pm 0,479$	$2,438 \pm 0,075$	$0,520 \pm 0,022$
Šípek	$3,515 \pm 0,324$	$0,126 \pm 0,015$	$0,063 \pm 0,008$
Třezalka	$17,560 \pm 1,524$	$1,836 \pm 0,226$	-
Mateřídouška	$5,578 \pm 0,542$	$8,428 \pm 0,356$	$0,491 \pm 0,046$
Kopřiva	$23,047 \pm 1,510$	-	-



Graf 13: Obsah rutinu, morinu a quercetinu v bylinných porcovaných čajích

Tabulka 15: Obsah rutinu, morinu a quercetinu v bylinných sypaných čajích

Druh čaje	Koncentrace rutinu duben 2007 (mg/g)	Koncentrace morinu duben 2007 (mg/g)	Koncentrace quercetinu duben 2007 (mg/g)
Meduňka	1,308 ± 0,074	-	1,140 ± 0,064
Heřmánek	0,739 ± 0,091	2,584 ± 0,072	0,320 ± 0,052
Mateřídouška	1,988 ± 0,291	6,475 ± 0,350	0,159 ± 0,025
Šípek	0,404 ± 0,026	-	0,012 ± 0,006
Máta	2,469 ± 0,244	1,992 ± 0,230	0,375 ± 0,029
Třezalka	1,520 ± 0,035	0,264 ± 0,006	0,021 ± 0,003
Lípa	1,178 ± 0,103	0,270 ± 0,006	0,120 ± 0,011
Tymián	2,104 ± 0,185	1,318 ± 0,011	0,409 ± 0,036
Jitrocel	7,323 ± 0,332	0,790 ± 0,066	0,085 ± 0,006
Divizna	1,257 ± 0,136	0,171 ± 0,006	0,084 ± 0,002
Černý bez	22,625 ± 1,075	-	0,058 ± 0,001
Kopřiva	6,720 ± 0,489	-	-
Jablečník	1,062 ± 0,017	-	0,110 ± 0,002



Graf 14: Obsah rutinu, morinu a quercetinu v bylinných sypaných čajích

V grafu 13 a 14 jsou velmi názorně vidět obsahy rutinu, morinu a quercetinu. U bylinných porcovaných čajů byl analyzován nejvyšší obsah rutinu v kopřivovém čaji ($23,047 \pm 1,510$) a v třezalkovém čaji. U bylinných sypaných čajů byl jednoznačně nejvyšší obsah rutinu stanoven v čaji z černého bezu ($22,625 \pm 1,075$). Vysoký obsah rutinu v černém bezu byl rovněž předpokládán v teorii u vedené v kap. 3.2.2 o bylinách. Zvýšená hladina rutinu bude

zřejmě příčinou relativně vysokých hodnot TAS, clekových polyfenolů a flavonoidů u černého bezu v porovnání s ostatními květovými čaji, jako je například lípa nebo heřmánek.

Výraznější obsah morinu byl stanoven pouze ve dvou bylinách a to mateřídoušce a heřmánku. U obou těchto bylin převažuje obsah morinu nad obsahem rutinu, jak u bylinných porcovaných čajů, tak i u bylinných sypaných čajů.

Zvýšený obsah quercetinu byl zaznamenán rovněž pouze u dvou čajů a to meduňky a máty, jinak jsou koncentrace quercetinu u ostatních bylin velmi nízké. I u bylinných čajů tedy převažuje spíše glykosidicky vázaná forma quercetinu – rutin, jen minimum quercetinu se vyskytuje ve volné formě.

Tabulka 16: Obsah myricetinu, luteolinu a kaempferolu v bylinných sypaných čajích

Druh čaje	Koncentrace myricetinu duben 2007 (mg/g)	Koncentrace luteolinu duben 2007 (mg/g)	Koncentrace kaempferolu duben 2007 (mg/g)
Meduňka	-	0,096 ± 0,001	-
Heřmánek	0,017 ± 0,001	0,009 ± 0,0003	0,054 ± 0,001
Mateřídouška	0,028 ± 0,001	0,023 ± 0,001	-
Máta	-	0,007 ± 0,0002	0,064 ± 0,001
Třezalka	0,003 ± 0,001	0,158 ± 0,002	-

Myricetin, luteolin a kaempferol byl detekován ve velmi nízkých koncentracích, a to pouze u pěti druhů sypaných čajů. Koncentrace jsou uvedeny v tabulce 16.

Souhrnně lze konstatovat, že ve všech analyzovaných vzorcích ovocných i bylinných čajů byl stanoven katechin a rutin. Katechin se vyskytoval v nejvyšších koncentracích u bylinných sypaných čajů. Obsah epikatechinu byl analyzován v nevýznamnějším množství v čajích ovocných a epikatechin gallát byl stanoven pouze v některých čajích, a to ve velmi nízkých koncentracích.

Rutin se ve vysokých koncentracích vyskytoval zejména v bylinných porcovaných čajích. U čajů ovocných výrazně převyšoval ostatní látky nekatechinového typu. Morin a quercetin byly stanoveny pouze v některých vzorcích a ve velmi malém množství. V případě quercetinu se s největší pravděpodobností jedná o výskyt v glykosidické formě, tedy vázaný jako aglykon glykosidického derivátu rutinu.

Při analýze vybraných flavonoidů metodou HPLC byla v rámci screeningové studie použita izokratická eluce vzorku. Nevýhodou této metody může být přítomnost směsných píků a tím falešně vyšší hodnoty koncentrace určených flavonoidů zahrnutím jiných látek, které mohou být rovněž detekovány při dané vlnové délce (zejména v případě detekce v UV oblasti).

Z tohoto důvodu byla vybrána jedna bylina a v jejím extraktu bylo detailně analyzováno složení flavonoidů metodou kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií. Tímto způsobem mohly být určeny nejvýznamnější látky přítomné ve vybraném čaji a srovnáno zastoupení identifikované UV/VIS spektrofotometrií s přesnější formou detekce založenou na identifikaci látek podle poměru m/z.

6.1.5 Stanovení látek polyfenolického typu metodou LC-MS

Metoda on-line LC/MS byla použita pouze k analýze jednoho vybraného zástupce čajů, a to za účelem verifikace píků vyhodnocovaných RP/HPLC/UV-VIS a také za účelem srovnání využitelnosti a výpovědní hodnoty, kterou uvedené dvě metody poskytují. Podmínky chromatografické separace byly stejné pro spektrofotometrickou i hmotnostní detekci. Získané výsledky potvrzují, že pomocí hmotnostní detekce s využitím software pro identifikaci látek podle individuálních m/z lze získat podstatně detailnější kvalitativní analýzu a po příslušné kalibraci by rovněž byla možná kvantifikace. Metodu LC/MS však nebylo možné v časovém úseku vymezeném pro diplomovou práci využít ke kompletnímu screeningu a kvantifikaci individuálních flavonoidů ve všech typech analyzovaných čajů.

Stanovení polyfenolických látek ve vodném extraktu máty bylo provedeno na hmotnostním spektrometru LCQ Advantage Max s elektrosprejovou ionizací a analyzátozem iontová past. Přístroj byl optimalizován na polyfenolickou sloučeninu kyselinu chlorogenovou, jejíž kvazi-molekulární ion o m/z 353.5 byl stanoven v záporném módu.

Tabulka 17: Přehled látek analyzovaných v extraktu z máty

Analyzovaná látka	m/z
katechin, epikatechin	289
katechin gallát	441
rutin	609
morin, quercetin	301
fisetin	285
myricetin	317
theaflavin-3-gallát	715
kofein	195
kyselina sinapová	223
luteolin	285
kyselina rozmarýnová	359

V tabulce 17 jsou uvedeny látky, které byly stanoveny metodou LC-MS v extraktu z máty. Flavonoidní látky jako je katechin, epikatechin, rutin, morin, quercetin a luteolin byly stanoveny v mátovém extraktu rovněž metodou HPLC se spektrofotometrickou detekcí (viz kap. 6.1.4), získané výsledky jsou tedy srovnatelné, pokud jde o zastoupení převážné většiny derivátů. Kvantitativní stanovení metodou on-line LC/MS a následné srovnání koncentrací analyzovaných flavonoidů nebylo možné provést, poněvadž hmotnostní detektor nebyl dosud kalibrován na příslušné standardy. Ve vzorku se potvrdilo velké množství kyseliny rozmarýnové, která by měla být podle literatury v mátě přítomná (viz kap. 3.2.2 o bylinách) a rovněž kofeinu. Podle předpokladů měl být ve vzorku máty přítomen menthol – jedna z hlavních obsahových látek máty, nebyl však detekován. Nepřítomnost mentholu lze vysvětlit velmi dlouhou dobou skladování čaje před přípravou extraktu pro LC/MS stanovení a také tím, že menthol je těkavá látka, která mohla ze sušených listů máty vyprchat.

Kromě látek polyfenolického typu byly ve vzorku také analyzovány organické kyseliny, jako je kyselina jablečná a kyselina citrónová. Hmotnostní spektra vybraných analyzovaných látek jsou uvedeny v přílohách č.12-17.

6.1.6 Stanovení kyseliny L-askorbové

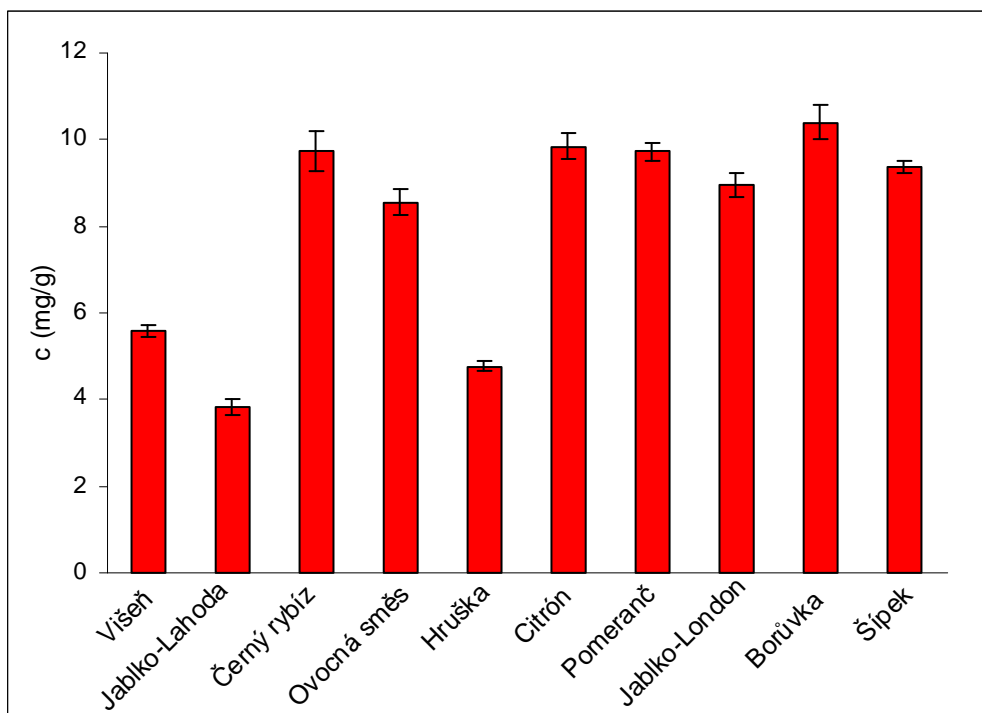
Kyselina askorbová byla stanovena pomocí metody HPLC (viz kap. 5.2.6). Pro analýzu byly použity vybrané extrakty ovocných čajů a šípkového čaje, který je známý vysokým obsahem vitamínu C. Extrakty byly připraveny zalitím sáčků 50 ml horké vody, ponechány 5 minut stát a přefiltrovány přes mikrofiltr. Jako standard byla použita kyselina L-askorbová a byla naměřena a vypočtena kalibrační závislost $y = 142551x$ (viz příloha 11). Podle této regresní rovnice byly vypočteny koncentrace kyseliny askorbové v jednotlivých čajích a jsou uvedeny v následující tabulce a grafu. Každé stanovení bylo provedeno třikrát a byla vypočtena směrodatná odchylka měření.

Tabulka 18: Obsah kyseliny askorbové v ovocných čajích a šípkovém čaji

Druh čaje	Koncentrace kyseliny askorbové (mg/ml)
Višeň	5,575 ± 0,149
Jablko –Lahoda	3,823 ± 0,171
Černý rybíz	9,730 ± 0,452
Ovocná směs	8,560 ± 0,280
Hruška	4,769 ± 0,114
Citrón	9,850 ± 0,306
Pomeranč	9,718 ± 0,222
Jablko-London	8,932 ± 0,276
Borůvka	10,394 ± 0,395
Šípek	9,380 ± 0,150

Kyselina askorbová slouží jako antioxidant k ochraně intracelulárních a extracelulárních složek buňky před poškozením volnými radikály. Kyselina askorbová zachytává volné radikály a tvoří méně reaktivní askorbylové radikály, které mohou být buď redukovány na kyselinu askorbovou nebo oxidovány na dehydroaskorbovou kyselinu. Askorbová kyselina prokázala schopnosti ochraňovat membrány a jiné hydrofobní části buňky před poškozením například regenerací antioxidantů jako je vitamin E [25].

Nejvýznamnější chemickou vlastností kyseliny L-askorbové je vratná oxidace na dehydro-L-askorbovou kyselinu. Degradace kyseliny L-askorbové v vodném prostředí závisí na mnoha faktorech jako je například pH, teplota, přítomnost kyslíku nebo kovů. Vitamin C je velmi citlivý na teplo, v přítomnosti kyslíku a se zvyšující se teplotou stoupá přímou úměrou rychlost oxidace [25].



Graf 15: Koncentrace kyseliny askorbové v jednotlivých ovocných čajích a šípkovém čaji

Dosud bylo vyvinuto a testováno mnoho analytických metod pro stanovení kyseliny askorbové v potravinách, biologických a farmaceutických vzorcích. Chromatografické stanovení HPLC metodou je vhodné pro detekci kyseliny askorbové stejně tak jako dehydroaskorbové. Tato metoda je účinná pro separaci kyseliny askorbové od jejích izomerů [25].

Z tabulky 18 a grafu 15 je vidět, že nejvyšší obsah kyseliny askorbové byl stanoven v čaji z borůvky. Vysoké obsahy vitamínu C byly také analyzovány v čaji z šípku, pomeranče, citrónu, černého rybízu a jablka (Jablko – London). Nejnižší obsah vitamínu C byl analyzován v čaji Jablko-Lahoda a Hruška. Tyto dva čaje jsou od stejného výrobce a jako jediné dva neobsahují květ ibišku v čajové směsi. Původ vitamínu C může být důvodem výkyvů v hladině vitamínu, může záležet na matrici, ze které se vitamin uvolňuje do vodného roztoku. Všechny tři základní složky ovocných čajů - jablko, ibišek a šípek jsou zdrojem velkého množství vitamínu C. Obsah tohoto vitamínu v komponentách sušených ovocných čajů je pravděpodobně mnohem vyšší před zalitím čaje horkou vodou, protože kyselina askorbová podléhá velmi rychle degradaci teplem a přítomností kyslíku. Čím vyšší je teplota, při které je nálev připravován, tím rychleji by měla probíhat degradace vitamínu C. Přestože velká část vitamínu byla zničena zalitím horkou vodou, byl překvapivě analyzován relativně vysoký obsah vitamínu ve všech ovocných čajích i v šípkovém čaji. Tento faktor může ovlivnit i hodnotu celkové antioxidační aktivity.

6.2 Vliv dlouhodobého uchovávání na obsah účinných látek v čajích

V následující kapitole jsou uvedeny výsledky analýzy změn analyzovaných biologicky významných látek a parametrů v čajích dlouhodobě uchovávaných v podmínkách podobných běžnému skladování v domácnosti. Šlo o skladování ve zcela stabilních podmínkách, v klimatizované místnosti se stálou teplotou 20°C, ve tmě a v podmínkách stabilní relativní vlhkosti. Všechna balení čajů byla otevřena k analýze v dubnu 2007 a analýza byla opakována po 1 roce. Přestože balení byla otevřena, byly všechny sáčky s bylinnými sypanými čaji i krabičky s porcovanými řádně uzavřeny a uchovány v uzavřené skříňce. U žádného z čajů nebyl překročena doba minimální trvanlivosti. Zjména u sypaných bylinných čajů se s podobným způsobem uchovávání lze běžně v domácnostech setkat.

6.2.1 Vliv uchovávání čajů na celkovou antioxidační aktivitu

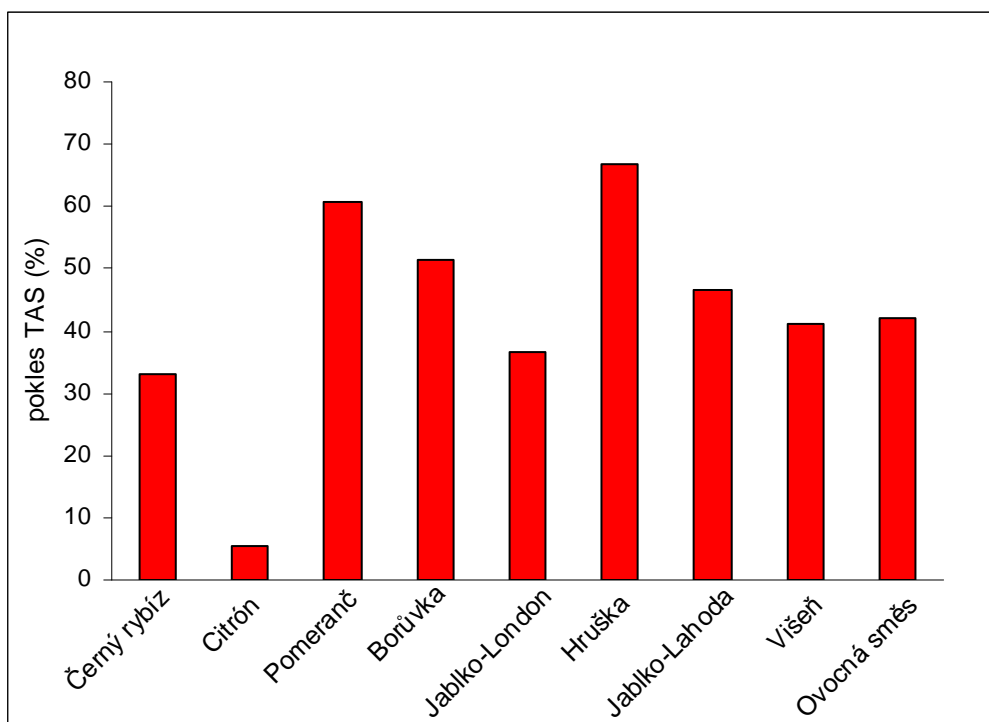
Celková antioxidační aktivita byla stanovena pomocí soupravy Total Antioxidant Status kit od firmy Randox. Měření celkové antioxidační aktivity bylo provedeno poprvé krátce po zakoupení čajů (duben 2007) a podruhé po 1 roce skladování (viz výše). Všechna měření byla provedena třikrát a byla vypočtena směrodatná odchylka. Pokles hodnot celkové antioxidační aktivity byl znázorněn v procentech, čímž lze snadno porovnat stabilitu jednotlivých čajů.

Tabulka 19: Stanovení celkové antioxidační kapacity extraktů ovocných čajů po jednom roce skladování

Druh čaje	TAS (mmol/l) duben 2008	Pokles TAS po roce skladování (%)
Černý rybíz	2,995 ± 0,060	33,060
Citrón	4,148 ± 0,079	5,583
Pomeranč	1,703 ± 0,025	60,879
Borůvka	2,290 ± 0,154	51,436
Jablko-London	2,995 ± 0,116	36,493
Hruška	1,664 ± 0,046	66,976
Jablko-Lahoda	2,329 ± 0,100	46,489
Višeň	2,796 ± 0,105	41,063
Ovocná směs	2,584 ± 0,127	42,208

Z údajů v tabulce 19 a v grafu 16 je vidět pokles hodnot TAS po ročním skladování ovocných čajů při podmínkách podobných běžnému skladování (v suchu a temnu). Ve všech čajích s výjimkou citrónového byl pozorován pokles aktivních látek o více než 30%. Tento pokles může být způsoben složením čaje, protože v matricích jako je jablko a šípek se pravděpodobně budou účinné látky degradovat poměrně rychle. Zajímavé je srovnání dvou jablečných čajů - Jablko-London a Jablko-Lahoda. V čaji Jablko-London došlo k menšímu poklesu hodnoty TAS než v druhém jablečném čaji. Příčinou menšího poklesu je zřejmě nižší obsah jablečné dužiny (29%), kdežto u čaje Jablko-Lahoda je mnohem vyšší procento jablečné dužiny (77%). Z tohoto příkladu lze velice snadno odvodit vliv zastoupení hlavních tří obsahových složek ovocných čajů (šípek, jablečná dužina a ibišek). Nejvyšší stabilitu

(pokles pouze o 5,583%) vykazoval čaj citrónový, který obsahuje až 20% citrónové kůry a rovněž kůru pomerančovou, ze kterých se pravděpodobně účinné látky neuvolňují tak rychle, neb obsahují další stabilizační látky.

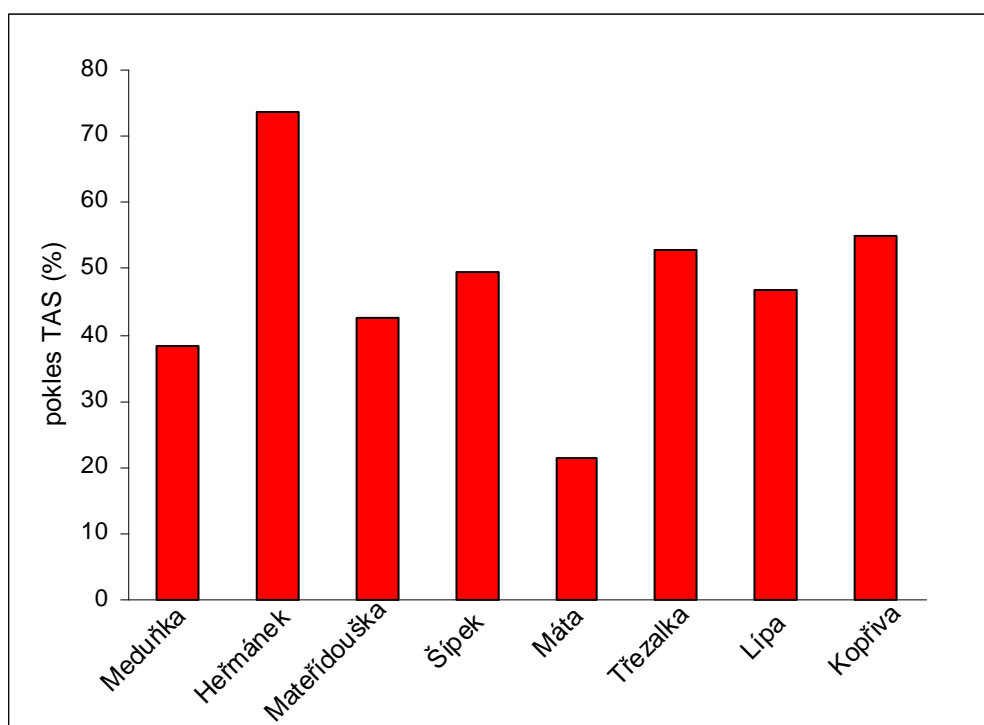


Graf 16: Pokles celkové antioxidační aktivity v ovocných čajích po jednom roce skladování

Tabulka 20: Stanovení celkové antioxidační kapacity extraktů bylinných porcovaných čajů po jednom roce skladování

Druh čaje	TAS (mmol/l) duben 2008	Pokles TAS po roce skladování (%)
Meduňka	6,303 ± 0,074	38,343
Heřmánek	0,778 ± 0,046	73,640
Mateřídouška	3,132 ± 0,082	42,556
Šípek	2,516 ± 0,120	49,387
Máta	3,967 ± 0,101	21,462
Třezalka	5,142 ± 0,037	52,848
Lípa	1,263 ± 0,068	46,773
Kopřiva	4,594 ± 0,053	54,889

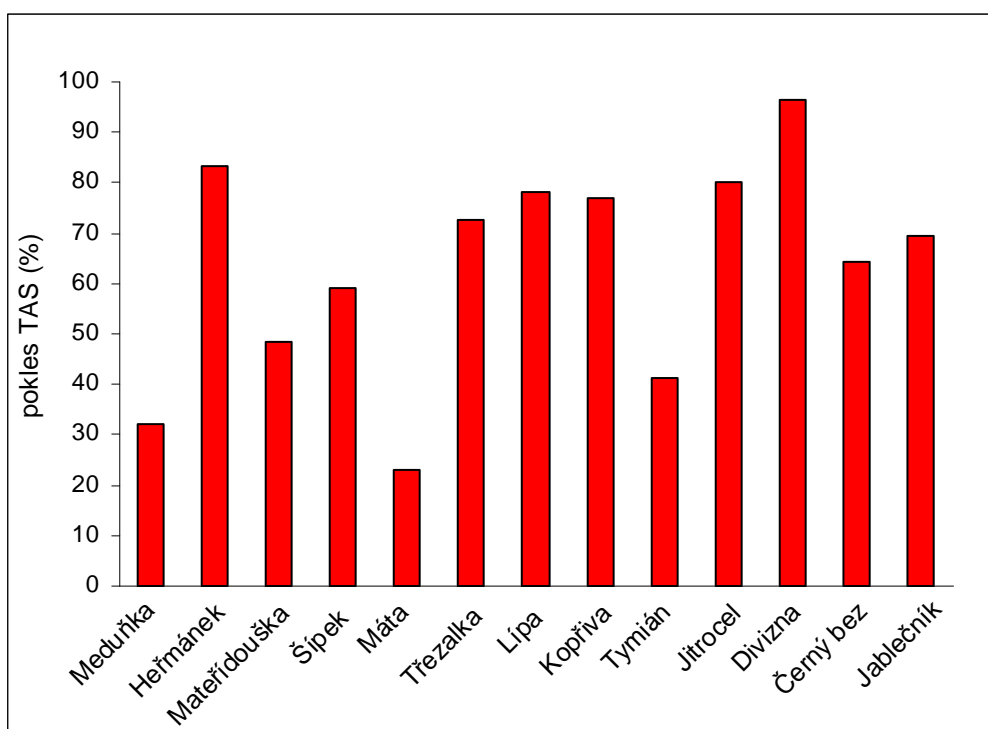
Při stanovení celkové antioxidační aktivity u bylinných porcovaných čajů byl pozorován největší úbytek aktivních látek u čaje z heřmánku, třezalky a kopřivy. Třezalkový, kopřivový a meduňkový čaj vykazovaly při prvním měření porcovaných čajů nejvyšší hodnoty TAS. U třezalky a kopřivy došlo k poklesu o více než 50%, u meduňky to bylo o 38%. Z těchto poznatků lze odvodit, že každá bylinná matrice je jinak stabilní, což závisí na typu a obsahu zastoupených látek. Nejvyšší stabilitu TAS vykazoval čaj z meduňky a máty (pokles 21%).



Graf 17: Pokles celkové antioxidační aktivity v bylinných porcovaných čajích po jednom roce skladování

Tabulka 21: Stanovení celkové antioxidační aktivity extraktů bylinných sypaných čajů po jednom roce skladování

Druh čaje	TAS (mmol/l) duben 2008	Pokles TAS po roce skladování (%)
Meduňka	8,962 ± 0,099	32,008
Heřmáněk	1,075 ± 0,054	83,456
Mateřídouška	6,820 ± 0,036	48,507
Šípek	2,414 ± 0,017	58,995
Máta	8,497 ± 0,084	23,061
Třezalka	4,334 ± 0,103	72,791
Lípa	1,478 ± 0,045	78,334
Kopřiva	3,132 ± 0,052	76,899
Tymián	5,233 ± 0,101	41,216
Jitrocel	2,102 ± 0,013	80,275
Divizna	0,302 ± 0,063	96,278
Černý bez	4,492 ± 0,182	64,329
Jablečník	2,085 ± 0,101	69,634



Graf 18: Pokles celkové antioxidační aktivity v bylinných sypaných čajích po jednom roce skladování

V grafu 18 je vidět, že nejvyšší pokles aktivních látek nastal po roce skladování u čajů z heřmánku, divizny a lípy. Toto je zajímavým poznatkem, jelikož všechny jmenované čaje jsou květové. V matici květů se degradovaly antioxidační látky rychleji než v listových nebo naťových maticích použitých u ostatních bylinných čajů. Nejstabilnější bylinou z této skupiny se ukázala být opět máta (pokles TAS o 23%), stejně tak jako u čajů porcovaných. Rovněž meduňka vykazovala poměrně vysokou stabilitu (pokles o 32%).

Nejstabilnějším čajem z obou testovaných skupin (ovocných a bylinných čajů) se ukázal být čaj citrónový (pokles TAS o 5,5%) a nejméně stabilním květový čaj z divizny (pokles TAS o 96%). Při hodnocení vlivu dlouhodobého uchování na hodnotu TAS je třeba mít na paměti, že se jedná o skupinový parametr, k jehož hodnotě může přispívat v komplexní přírodní matici řada látek různého typu; umožňuje však celkové posouzení oxidační stability jednotlivých extraktů.

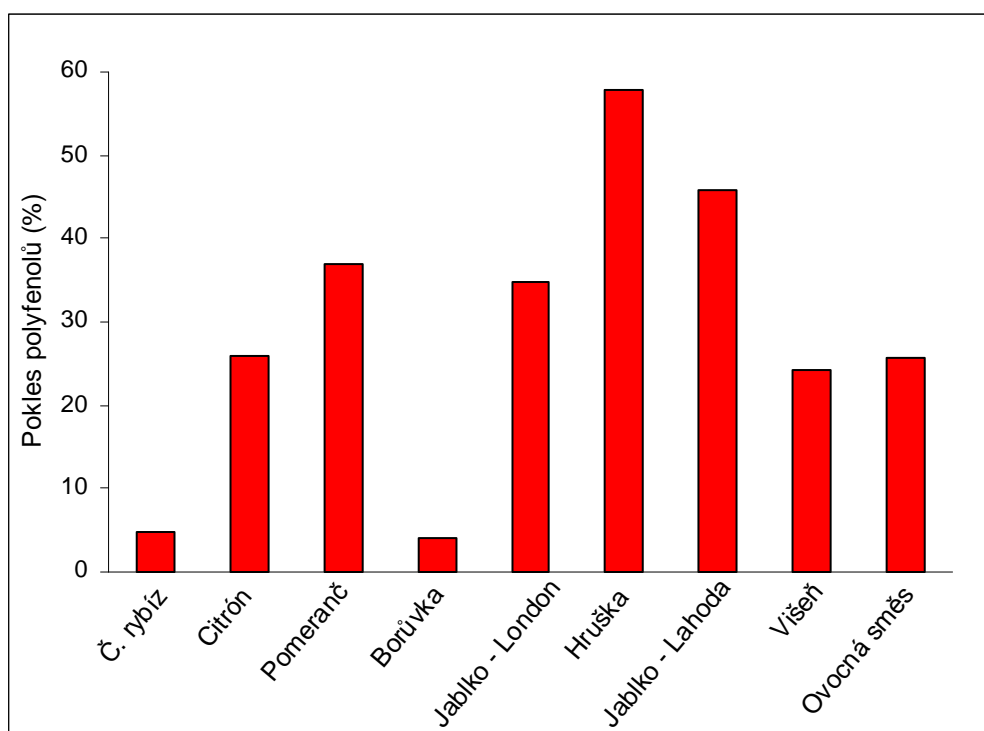
6.2.2 Vliv uchovávání čajů na obsah celkových polyfenolů

Stanovení celkových polyfenolů v průběhu dlouhodobého uchovávání bylo provedeno pomocí Folin-Ciocalteuovy metody (viz kap. 5.2.3). Výsledky jsou vypočteny jako průměrná hodnota ze tří opakovaných měření každého extraktu. Pokles hodnot celkových polyfenolů byl znázorněn v procentech za účelem porovnání stability obsahu polyfenolů u jednotlivých čajů.

Tabulka 22: Stanovení celkových polyfenolů extraktů ovocných čajů po jednom roce skladování

Druh čaje	Koncentrace polyfenolů březen 2008 (mg/g)	Pokles celkových polyfenolů po roce skladování (%)
Černý rybíz	8,347 ± 0,062	4,914
Citrón	9,518 ± 0,616	26,024
Pomeranč	4,095 ± 0,370	36,885
Borůvka	6,729 ± 0,108	4,168
Jablko-London	12,737 ± 0,385	34,819
Hruška	4,803 ± 0,031	57,929
Jablko-Lahoda	7,792 ± 0,154	45,757
Višeň	7,726 ± 0,229	24,319
Ovocná směs	6,575 ± 0,385	25,748

V grafu 19 je velmi znatelně vidět rozdíl hladiny polyfenolů v ovocných čajích po roce skladování. Největší pokles je zaznamenán u hruškového čaje a jablečných čajů London a Lahoda. Tento významný pokles polyfenolů může být způsoben vysokým obsahem jablečné dužiny ve jmenovaných čajích, kde pravděpodobně dochází k rychlejší degradaci polyfenolických látek. Ve shodě s poklesem celkové antioxidační aktivity se projevily jako nejstabilnější ovocné čaje z černého rybízu, borůvky a citrónu. Nejmenší stabilitou se stejně tak jako u TAS projevila hruška. U těchto čajů jsou tedy polyfenolické látky pravděpodobně jedním z hlavních skupin přispívajících k antioxidační aktivitě extraktu.



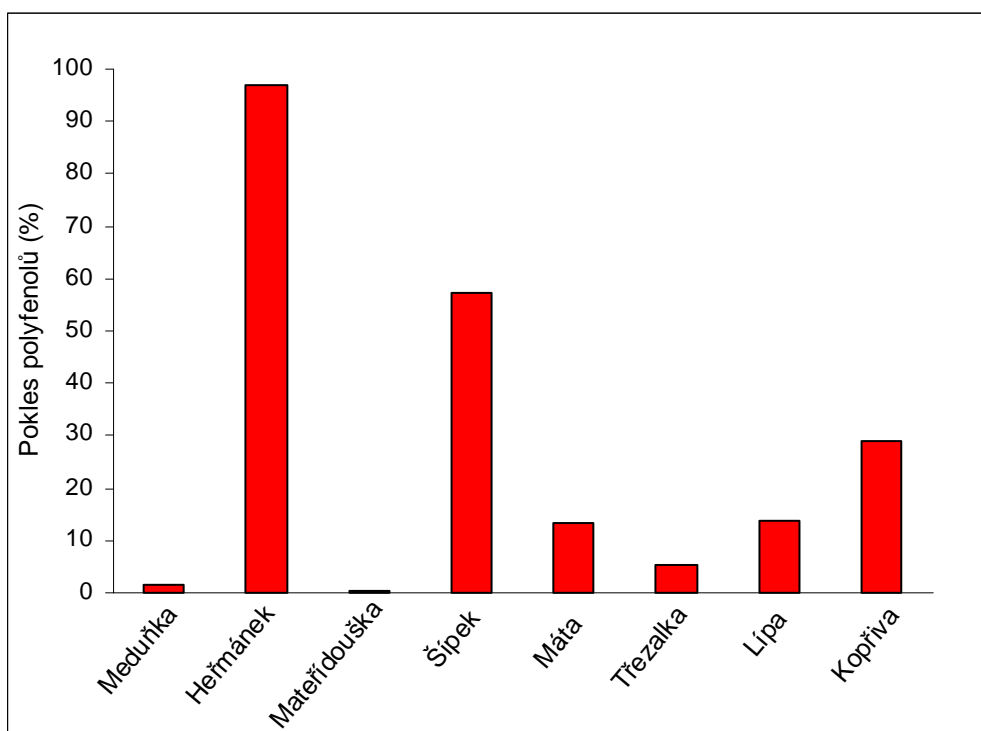
Graf 19: Pokles obsahu celkových polyfenolů v ovocných čajích po jednom roce skladování

Tabulka 23: Stanovení celkových polyfenolů extraktů bylinných procovaných čajů po jednom roce skladování

Druh čaje	Koncentrace polyfenolů březen 2008 (mg/g)	Pokles celkových polyfenolů po roce skladování (%)
Meduňka	47,997 ± 0,246	1,517
Heřmánek	0,160 ± 0,246	96,927
Mateřídouška	23,784 ± 0,267	0,572
Šípek	8,019 ± 0,112	57,188
Máta	20,845 ± 0,801	13,447
Třezalka	49,396 ± 1,746	5,216
Lípa	2,399 ± 0,062	13,833
Kopřiva	13,553 ± 0,246	28,886

Stanovení celkových polyfenolů v bylinných procovaných čajích po roce uchování ukázalo, že ve všech bylinách došlo k poklesu polyfenolů. Tento pokles je pohyboval v rozmezí od 0,6% do 97%. K jednoznačně nejvyššímu poklesu hodnot celkových polyfenolů došlo u heřmánkového čaje. Velký pokles polyfenolů se rovněž projevila i u šípkového čaje (57%). Značný pokles polyfenolů u šípkového čaje může souviset rovněž s velkým poklesem hladiny celkových polyfenolů u téměř všech ovocných čajů, kde je šípek jednou ze tří základních složek. Jako nejstabilnější čaj byla v testu celkových polyfenolů stanovena mateřídouška, u které hladina polyfenolů klesla pouze o 0,6%. Rovněž extrakty z meduňky a třezalky vykazovaly vysokou stabilitu, což souvisí s poměrně vysokým obsahem celkových

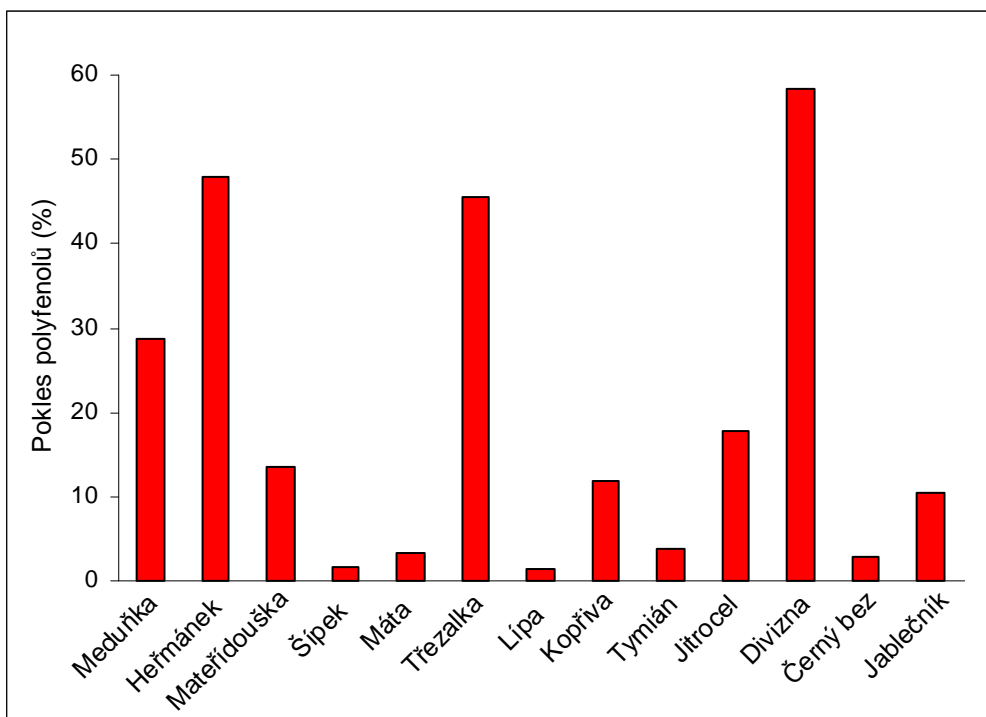
polyfenolů v těchto čajích (viz kap. 6.1.2) a mohlo by svědčit i pro přítomnost dalších stabilizačních látek .



Graf 20: Pokles obsahu celkových polyfenolů v bylinných porcovaných čajích během jednoho roku skladování

Tabulka 24: Stanovení celkových polyfenolů extraktů bylinných sypaných čajů po jednom roce skladování

Druh čaje	Koncentrace polyfenolů březen 2008 (mg/g)	Pokles celkových polyfenolů po roce skladování (%)
Meduňka	73,939 ± 0,342	28,659
Heřmánek	1,324 ± 0,744	47,956
Mateřídouška	45,024 ± 3,081	13,548
Šípek	8,860 ± 0,113	1,689
Máta	31,384 ± 0,702	3,220
Třezalka	28,889 ± 0,913	45,429
Lípa	8,956 ± 0,353	1,365
Kopřiva	7,040 ± 0,116	11,949
Tymián	38,655 ± 0,911	3,912
Jitrocel	8,391 ± 0,886	17,753
Divizna	0,727 ± 0,092	58,427
Černý bez	25,696 ± 1,320	2,929
Jablečník	8,274 ± 0,193	10,426



Graf 21: Pokles obsahu celkových polyfenolů v bylinných sypaných čajích během jednoho roku skladování

Při stanovení obsahu celkových polyfenolů po jednom roce skladování se projevily jako nejméně stabilní květové čaje. K největšímu poklesu polyfenolů došlo v divizně a heřmánku. Rovněž u třezalky byl zaznamenán velmi velký pokles těchto antioxidačních látek. Zajímavé je to, že u bylinných porcovaných čajů se třezalka projevila jako jeden z nejstabilnějších čajů, zatímco u sypaných bylin patří mezi tři nejméně stabilní.

Obecně bylo prokázáno, že k největšímu úbytku polyfenolických látek došlo u čajů ovocných a u bylinných květových čajů. Podobné výsledky byly zjištěny i u hodnot TAS.

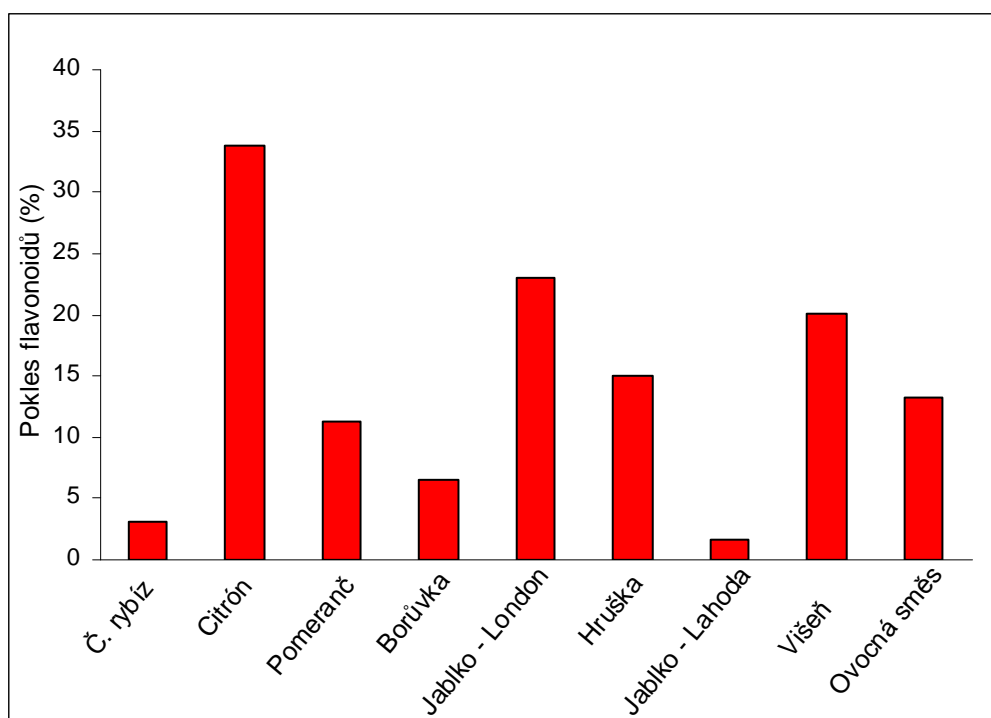
6.2.3 Vliv uchovávání čajů na obsah celkových flavonoidů

Stanovení celkových flavonoidů v průběhu uchovávání bylo provedeno pomocí orientační metody s hlinitou solí (viz kap. 5.2.4). Výsledky jsou vypočteny jako průměrná hodnota ze tří opakovaných měření každého extraktu, pokles hodnot celkových flavonoidů byl znázorněn rovněž v procentech.

Tabulka 25: Stanovení celkových flavonoidů extraktů ovocných čajů po jednom roce skladování

Druh čaje	Koncentrace flavonoidů březen 2008 (mg/g)	Pokles celkových flavonoidů po roce skladování (%)
Černý rybíz	1,919 ± 0,090	3,151
Citrón	1,843 ± 0,111	33,755
Pomeranč	0,330 ± 0,014	11,194
Borůvka	1,718 ± 0,069	6,543
Jablko-London	3,508 ± 0,055	23,036
Hruška	0,795 ± 0,062	15,069
Jablko-Lahoda	1,732 ± 0,056	1,577
Višeň	0,821 ± 0,032	20,062
Ovocná směs	1,475 ± 0,007	13,182

V grafu 22 je velmi názorně vidět, že při analýze obsahu celkových flavonoidů po jednom roce skladování došlo k velmi nízkému poklesu těchto hodnot. K nejvyššímu poklesu flavonoidů došlo u čajů Jablko-London a čaj Citrón. U ovocných čajů nedošlo k poklesu flavonoidů o více než 34%, u většiny čajů úbytek nepřevyšoval 15% původního obsahu flavonoidů. Flavonoidní látky zastávají u ovocných čajů malé procento z látek polyfenolického charakteru ze srovnání změn v průběhu uchovávání lze usoudit, že v ovocných čajích degradují hlavně takové polyfenolické látky, které nejsou flavonoidního typu. Vysokou stabilitu proti degradaci flavonoidů prokázal zejména čaj rybízový, borůvkový a čaj Jablko-Lahoda.

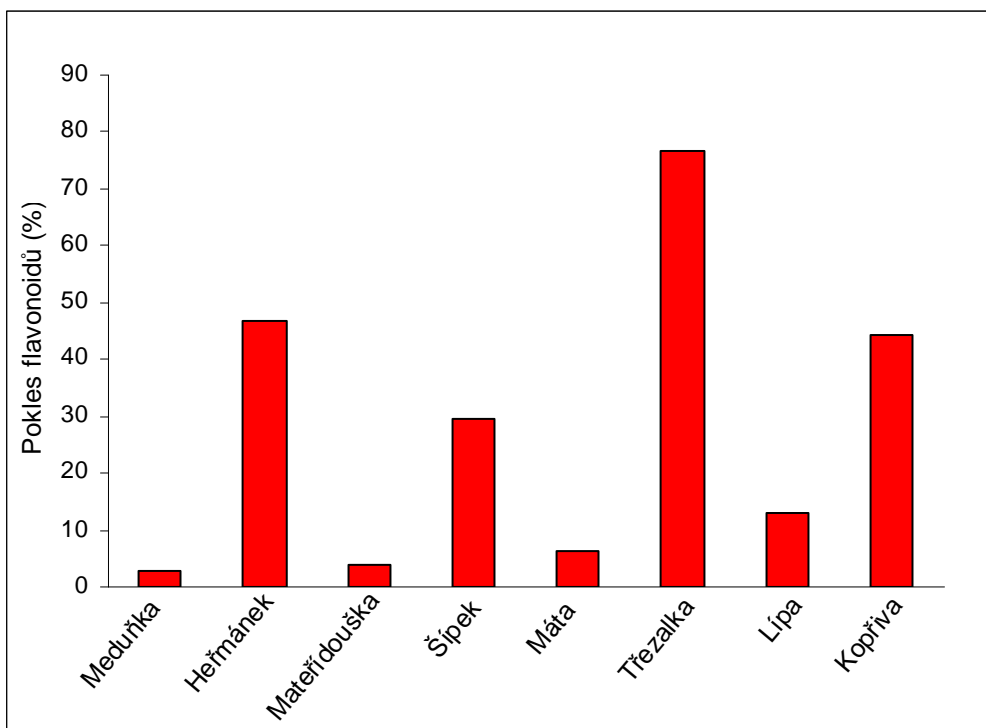


Graf 22: Pokles obsahu celkových flavonoidů v ovocných čajích během jednoho roku skladování

Tabulka 26: Stanovení celkových flavonoidů extraktů bylinných procovaných čajů po jednom roce skladování

Druh čaje	Koncentrace flavonoidů březen 2008 (mg/g)	Pokles celkových flavonoidů po roce skladování (%)
Meduňka	39,583 ± 0,125	2,717
Heřmánek	1,051 ± 0,000	46,816
Mateřídouška	15,031 ± 0,056	3,998
Šípek	3,657 ± 0,023	29,595
Máta	14,030 ± 0,157	6,437
Třezalka	6,074 ± 0,046	76,669
Lípa	1,994 ± 0,019	13,158
Kopřiva	7,637 ± 0,000	44,426

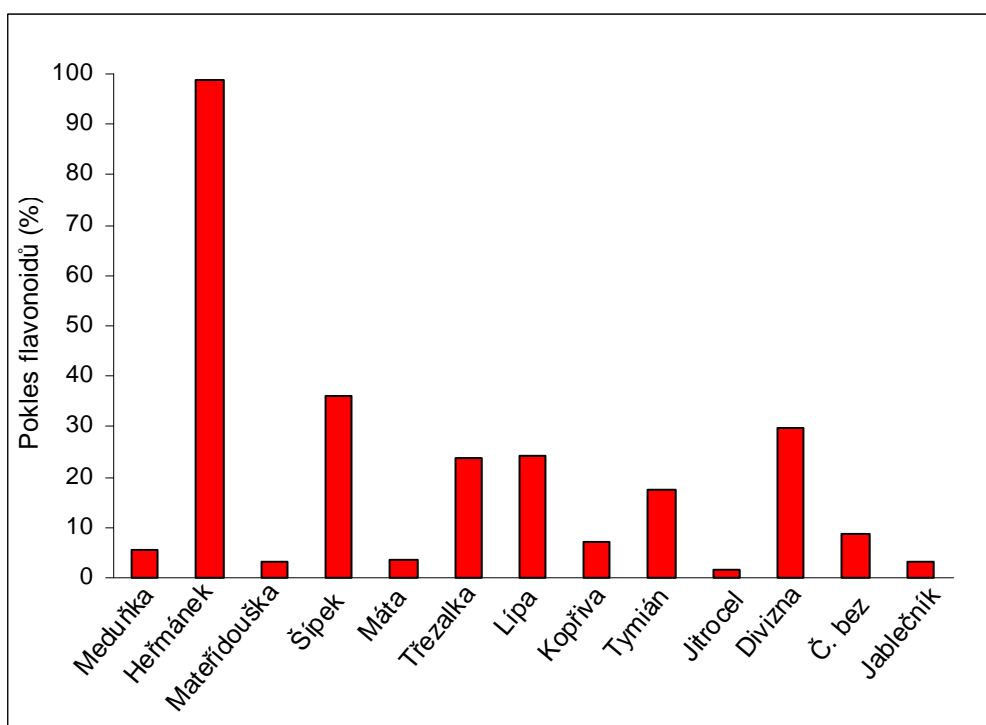
Rovněž u bylinných procovaných čajů bylo provedeno opětovné měření obsahu flavonoidů po roce. Zajímavé je, že u většiny čajů rovněž nedošlo k nijak výraznému poklesu obsahu flavonoidů po roce skladování, podobně jako u ovocných čajů. Výjimkou je pouze čaj z třezalky, kde došlo k poklesu flavonoidů o 77%. Tento jev je pravděpodobně způsoben typem flavonoidů přítomných v čaji z třezalky, které podléhají rychlejší oxidaci. Z hodnot v tabulce 36 lze pozorovat, že v třezalkovém čaji došlo po roce k výraznému poklesu rutinu, což může mít podíl na významném poklesu celkových flavonoidů. Jako velmi stabilní čaje se stejně tak jako u polyfenolů projevíly mateřídouška a meduňka.



Graf 23: Pokles obsahu celkových flavonoidů v bylinných porcovaných čajích během jednoho roku skladování

Tabulka 27: Stanovení celkových flavonoidů extraktů bylinných sypaných čajů po jednom roce skladování

Druh čaje	Koncentrace flavonoidů březen 2008 (mg/g)	Pokles celkových flavonoidů po roce skladování (%)
Meduňka	62,560 ± 0,894	5,410
Heřmánek	0,055 ± 0,012	98,694
Mateřídouška	38,454 ± 0,293	3,049
Šípek	3,301 ± 0,418	35,945
Máta	25,933 ± 0,192	3,624
Třezalka	18,158 ± 0,134	23,946
Lípa	9,317 ± 0,042	24,079
Tymián	26,806 ± 0,367	7,022
Jitrocel	11,321 ± 0,038	17,273
Divizna	0,302 ± 0,021	1,424
Černý bez	21,560 ± 0,198	29,617
Kopřiva	9,446 ± 0,052	8,758
Jablečnick	12,598 ± 0,058	3,157



Graf 24: Pokles obsahu celkových flavonoidů v bylinných sypaných čajích během jednoho roku skladování

Z grafu 24 lze pozorovat, že během roku skladování nedošlo k významnému poklesu flavonoidů ani v sypaných čajích. K jediné významné změně v obsahu flavonoidů došlo v čaji z heřmánek, u kterého došlo k poklesu až o 99%. Velice vysoká degradace antioxidantů v čaji z heřmánek byla dobře pozorovatelná ve všech výše uvedených metodách pro stanovení účinných látek v extraktech. Z tak malého rozdílu hodnot flavonoidů za rok skladování u všech druhů čaje je možné vyvodit závěr, že flavonoidy degradují nebo se oxidují v bylinné matici mnohem pomaleji než ostatní polyfenolické látky.

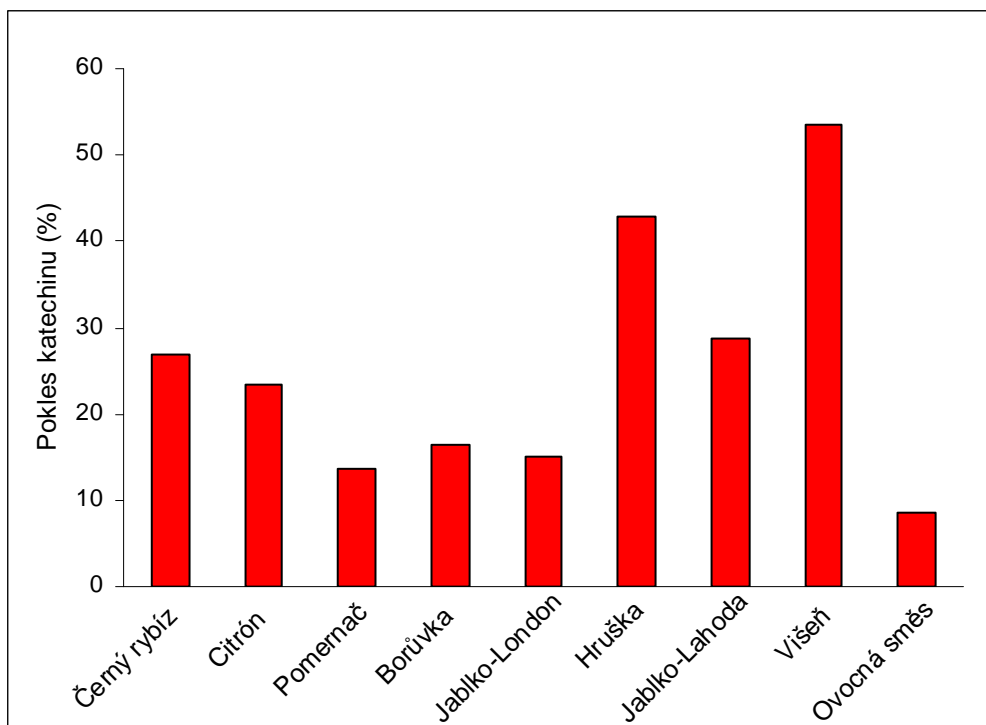
I když v případě celkových polyfenolů i celkových flavonoidů hodnotíme opět skupinové parametry, obecně se obsah flavonoidů v průběhu dlouhodobého uchování mění podstatně méně než obsah celkových polyfenolů. Méně stabilní polyfenolické složky jsou zřejmě jiné než flavonoidní struktury, dokonce se může zdát, že vyšší obsah flavonoidů by mohl působit jako stabilizační faktor pro uchování obsahu celkových polyfenolických látek.

6.2.4 Vliv dlouhodobého uchování čajů na obsah jednotlivých zástupců flavonoidů

Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu vzorků čaje byla použita HPLC metoda (viz kap. 5.2.5). Byl stanoven obsah jednotlivých flavonoidních látek a také porovnán obsah těchto látek v porcovaných a sypaných čajích. Měření vybraných flavonoidů bylo provedeno opakovaně po jednom roce skladování čajů v suchu a temnu. Pro výpočet obsahu vybraných flavonoidů byly použity kalibrační závislosti příslušných standardů flavonoidů (viz kap.6.1.4, tabulka 9).

Tabulka 28: Stanovení obsahu katechinu v ovocných čajích po jednom roce skladování

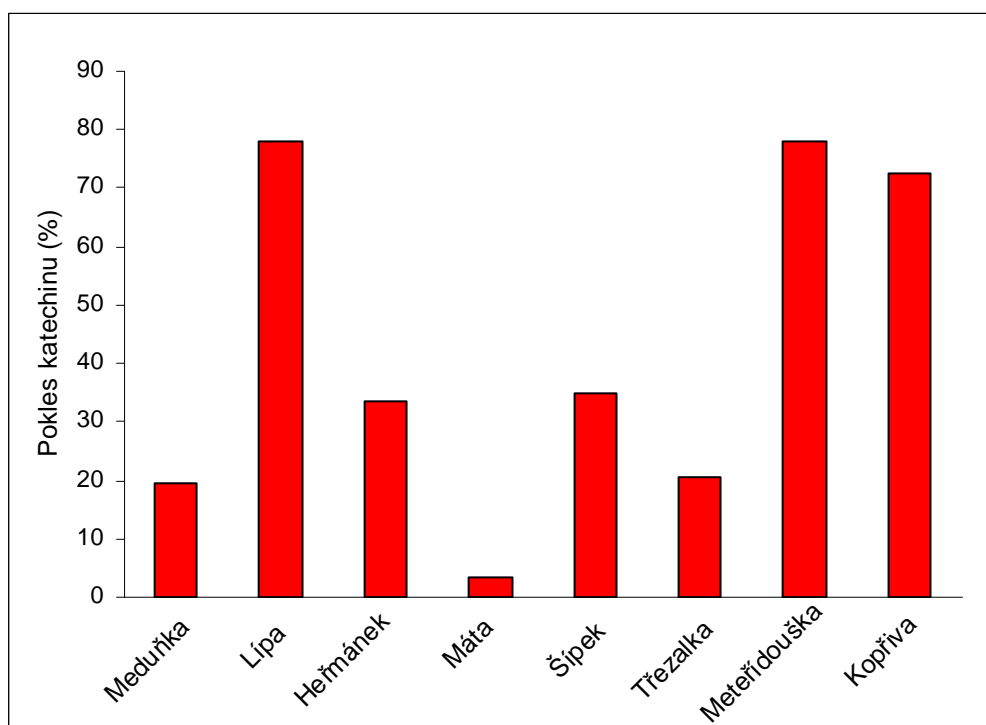
Druh čaje	Koncentrace katechinu duben 2008 (mg/g)	Pokles katechinu po roce skladování (%)
Černý rybíz	1,400 ± 0,073	26,829
Citrón	6,409 ± 0,095	23,295
Pomeranč	5,251 ± 1,170	13,645
Borůvka	5,186 ± 0,108	16,469
Jablko-London	4,079 ± 0,955	15,158
Hruška	2,381 ± 0,686	42,836
Jablko-Lahoda	3,990 ± 0,710	28,829
Višeň	3,542 ± 0,288	53,521
Ovocná směs	6,226 ± 0,101	8,628



Graf 25: Pokles obsahu katechinu v ovocných čajích během jednoho roku skladování

Tabulka 29: Stanovení obsahu katechinu v bylinných porcovaných čajích po jednom roce skladování

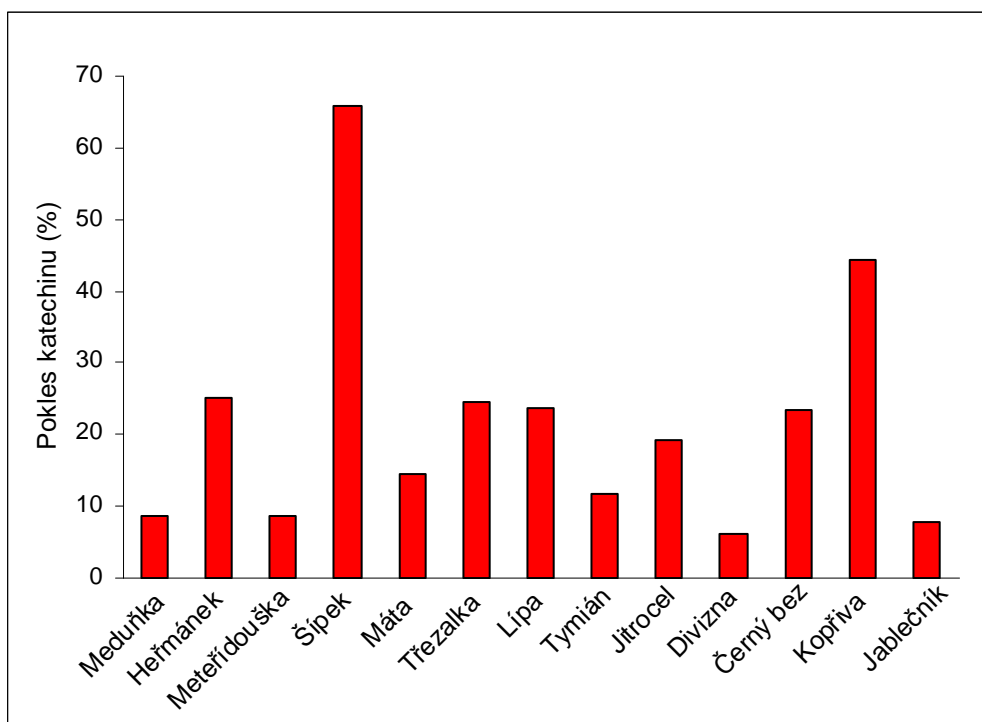
Druh čaje	Koncentrace katechinu duben 2008 (mg/g)	Pokles katechinu po roce skladování (%)
Meduňka	6,114 ± 0,263	19,366
Lípa	1,298 ± 0,025	78,071
Heřmánek	1,158 ± 0,014	33,478
Máta	7,570 ± 0,196	3,563
Šípek	3,995 ± 0,108	34,790
Třezalka	25,402 ± 0,674	20,679
Mateřídouška	1,556 ± 0,085	78,083
Kopřiva	4,454 ± 0,198	72,597



Graf 26: Pokles obsahu katechinu v bylinných porcovaných čajích během jednoho roku skladování

Tabulka 30: Stanovení obsahu katechinu v bylinných sypaných čajích po jednom roce skladování

Druh čaje	Koncentrace katechinu duben 2008 (mg/g)	Pokles katechinu po roce skladování (%)
Meduňka	22,062 ± 0,162	8,533
Heřmánek	3,740 ± 0,521	25,022
Mateřídouška	16,600 ± 0,392	8,622
Šípek	0,709 ± 0,056	65,726
Máta	12,459 ± 0,185	14,554
Třezalka	5,022 ± 0,233	24,470
Lípa	5,367 ± 0,281	23,752
Tymián	8,346 ± 0,160	11,820
Jitrocel	3,562 ± 0,169	19,361
Divizna	1,445 ± 0,052	6,251
Černý bez	7,959 ± 0,170	23,368
Kopřiva	4,984 ± 0,235	44,417
Jablečník	2,952 ± 0,049	7,771



Graf 27: Pokles obsahu katechinu v bylinných sypaných čajích během jednoho roku skladování

Výrazný pokles katechinu byl zaznamenán ve všech čajích. U ovocných čajů došlo k poklesu katechinu relativně rovnoměrně (nad 10%). K nejvýznamnějšímu poklesu u ovocných čajů došlo u višně 53,5% a hrušky 43%. Při stanovení katechinu po jednom roce skladování došlo u bylinných porcovaných čajů k výraznému poklesu u třech bylin: lípy,

mateřídoušky a kopřivy. Změna obsahu katechinu byla stanovena na více než 70% u všech třech jmenovaných vzorků. Jako nejstabilnější se projevila máta, u které klesl obsah katechinu pouze o 3,6%. Rovněž sypaná máta měla velkou stabilitu v průběhu skladování a došlo k poklesu pouze o 14,5%. Tyto výsledky potvrzují stabilitu máty ve všech výše uvedených testech a malý pokles katechinu v mátě může mít vliv na její celkovou stabilitu.

Ve skupině bylinných sypaných čajů byly jako nejméně stabilní stanoveny extrakty z šípku a kopřivy, kde došlo k úbytku katechinu o více jak 40%.

Tabulka 31: Stanovení obsahu epikatechinu a epikatechin gallátu v ovocných čajích po jednom roce skladování

Druh čaje	Koncentrace epikatechinu duben 2008 (mg/g)	Pokles epikatechinu po roce skladování (%)	Koncentrace epikatechin gallátu duben 2008 (mg/g)	Pokles epikatechin gallátu po roce skladování (%)
Černý rybíz	0,338 ± 0,014	96,638	0,270 ± 0,033	81,039
Citrón	0,349 ± 0,010	97,496	0,177 ± 0,009	93,436
Pomeranč	-	-	0,345 ± 0,030	81,074
Borůvka	0,552 ± 0,027	94,951	0,406 ± 0,031	65,130
Jablko-London	-	-	0,332 ± 0,013	56,327
Hruška	-	-	0,286 ± 0,010	25,744
Jablko-Lahoda	0,410 ± 0,034	88,990	0,107 ± 0,008	73,724
Višeň	-	-	3,022 ± 0,275	26,513
Ovocná směs	2,232 ± 0,134	36,006	0,779 ± 0,118	29,130

Tabulka 32: Stanovení obsahu epikatechinu a epikatechin gallátu v bylinných porcovaných čajích po jednom roce skladování

Druh čaje	Koncentrace epikatechinu duben 2008 (mg/g)	Pokles epikatechinu po roce skladování (%)	Koncentrace epikatechin gallátu duben 2008 (mg/g)	Pokles epikatechin gallátu po roce skladování (%)
Meduňka	2,841 ± 0,385	24,227	0,892 ± 0,056	35,749
Lípa	0,765 ± 0,012	10,438	0,215 ± 0,004	13,514
Heřmánek	1,704 ± 0,187	39,641	0,153 ± 0,006	36,035
Máta	2,953 ± 0,163	29,086	0,801 ± 0,069	11,028
Šípek	-	-	-	-
Třezalka	2,719 ± 0,139	53,251	0,621 ± 0,099	6,249
Mateřídouška	2,004 ± 0,092	5,863	0,504 ± 0,040	70,276
Kopřiva	1,659 ± 0,092	42,197	-	-

Tabulka 33: Stanovení obsahu epikatechinu a epikatechin gallátu v bylinných sypaných čajích po jednom roce skladování

Druh čaje	Koncentrace epikatechinu duben 2008 (mg/g)	Pokles epikatechinu po roce skladování (%)	Koncentrace epikatechin gallátu duben 2008 (mg/g)	Pokles epikatechin gallátu po roce skladování (%)
Meduňka	14,013 ± 0,282	64,929	7,489 ± 0,410	46,257
Heřmánek	4,122 ± 0,249	2,688	0,808 ± 0,072	44,322
Mateřídouška	6,019 ± 0,430	70,492	3,665 ± 0,314	13,507
Šípek	-	-	-	-
Máta	2,971 ± 0,158	6,020	1,127 ± 0,105	80,374
Třezalka	0,995 ± 0,034	21,322	0,391 ± 0,007	76,461
Lípa	1,760 ± 0,030	23,784	-	-
Tymián	4,455 ± 0,236	26,198	-	-
Jitrocel	2,574 ± 0,193	6,664	-	-
Divizna	1,167 ± 0,031	47,638	-	-
Černý bez	3,554 ± 0,190	10,771	-	-
Kopřiva	0,954 ± 0,036	21,291	-	-
Jablečník	4,208 ± 0,124	22,688	-	-

Dalšími stanovovanými látkami katechinového typu byl epikatechin a epikatechin gallát. Po roce skladování čajů došlo u ovocných čajů k velmi velkému poklesu epikatechinu, u citrónového čaje to bylo až o 97%. U všech ovocných čajů kromě ovocné směsi, ve kterých byl analyzován epikatechin, došlo k poklesu o více jak 80%. Tento významný pokles epikatechinu mohl být způsobem maticí, ve které se epikatechin vyskytoval. Jak již bylo diskutováno v kap. 6.1.4, výskyt epikatechinu by mohl být zapříčiněn přítomností plodů jeřabiny, trnky a černého bezu v určitých ovocných čajích. V tabulkách 32 a 33 lze pozorovat, že rovněž u bylinných čajů došlo k výraznému poklesu epikatechinu a epikatechin gallátu. U bylinných porcovaných čajů nedošlo k větší změně než 53% u třezalky a u bylinných sypaných čajů prokázala nejmenší stabilitu mateřídouška (pokles o 70%).

Tabulka 34: Stanovení obsahu rutinu v ovocných čajích po jednom roce skladování

Druh čaje	Koncentrace rutinu duben 2008 (mg/g)	Pokles rutinu po roce skladování (%)
Černý rybíz	1,248 ± 0,080	66,538
Citrón	1,847 ± 0,164	76,309
Pomeranč	1,085 ± 0,249	78,542
Borůvka	2,081 ± 0,171	53,526
Jablko-London	1,247 ± 0,027	65,479
Hruška	1,068 ± 0,075	58,680
Jablko-Lahoda	1,219 ± 0,038	61,461
Višeň	2,165 ± 0,151	65,608
Ovocná směs	1,383 ± 0,146	29,084

Tabulka 35: Stanovení obsahu rutinu v bylinných porcovaných čajích po roce skladování

Druh čaje	Koncentrace rutinu duben 2008 (mg/g)	Pokles rutinu po roce skladování (%)
Meduňka	0,366 ± 0,028	55,015
Lípa	0,682 ± 0,022	86,905
Heřmánek	0,763 ± 0,068	13,556
Máta	5,072 ± 0,414	42,539
Šípek	0,316 ± 0,017	91,018
Třezalka	7,178 ± 0,618	59,122
Mateřídouška	2,916 ± 0,205	47,730
Kopřiva	4,092 ± 0,181	82,244

Tabulka 36: Stanovení obsahu rutinu v bylinných sypaných čajích po roce skladování

Druh čaje	Koncentrace rutinu duben 2008 (mg/g)	Pokles rutinu po roce skladování (%)
Meduňka	0,765 ± 0,002	41,567
Heřmánek	0,712 ± 0,022	3,655
Mateřídouška	1,026 ± 0,114	48,407
Šípek	0,215 ± 0,017	46,797
Máta	1,223 ± 0,131	50,467
Třezalka	0,898 ± 0,122	40,952
Lípa	0,492 ± 0,017	58,237
Tymián	0,631 ± 0,204	70,017
Jitrocel	6,610 ± 0,628	9,737
Divizna	0,698 ± 0,114	44,511
Černý bez	15,478 ± 0,725	31,590
Kopřiva	4,680 ± 0,347	30,349
Jablečník	0,594 ± 0,082	44,084

V tabulce 34 jsou vypsány hodnoty poklesu rutinu během roku skladování u ovocných čajů. Ve všech ovocných čajích došlo k velmi výraznému poklesu této látky o více než 50%. Výjimkou je čaj Ovocná směs, kde došlo ke snížení obsahu rutinu pouze o 29%. Nejmenší stabilitou se projevil pomerančový čaj, ve kterém došlo k poklesu o 78,5%.

Z tabulek 35 a 36 lze vypožorovat, že i u bylin docházelo k velké degradaci rutinu během doby skladování. U obou souborů (porcovaných i sypaných) došlo k průměrnému poklesu rutinu nad 50%. Největší stabilitu vykazoval čaj z heřmánku, a to u obou typů balení, jak u porcovaného, tak i u sypaného čaje. Nejvyšší pokles rutinu byl zjištěn u lípového čaje, u porcovaných čajů 87% a u sypaných 58%.

Tabulka 37: Stanovení obsahu morinu a quercetinu v ovocných čajích po jednom roce skladování

Druh čaje	Koncentrace morinu duben 2008 (mg/g)	Pokles morinu po roce skladování (%)	Koncentrace quercetinu duben 2008 (mg/g)	Pokles quercetinu po roce skladování (%)
Černý rybíz	-	100	-	100
Citrón	0,269 ± 0,003	87,743	-	-
Pomeranč	-	-	-	100
Borůvka	-	100	-	100
Jablko-London	0,052 ± 0,001	75,562	0,053 ± 0,003	31,004
Hruška	-	100	-	100
Jablko-Lahoda	0,081 ± 0,009	66,647	-	100
Višeň	-	100	-	100
Ovocná směs	0,193 ± 0,002	59,813	0,056 ± 0,003	46,049

Tabulka 38: Stanovení obsahu morinu a quercetinu v bylinných porcovaných čajích po jednom roce skladování

Druh čaje	Koncentrace morinu duben 2008 (mg/g)	Pokles morinu po roce skladování (%)	Koncentrace quercetinu duben 2008 (mg/g)	Pokles quercetinu po roce skladování (%)
Meduňka	2,481 ± 0,318	38,301	0,274 ± 0,010	76,535
Lípa	0,122 ± 0,004	50,819	0,074 ± 0,008	70,352
Heřmánek	0,611 ± 0,063	86,148	0,061 ± 0,010	86,351
Máta	1,793 ± 0,074	26,473	0,195 ± 0,003	62,390
Šípek	-	100	0,014 ± 0,001	78,268
Třezalka	0,590 ± 0,030	67,862	-	-
Mateřídouška	2,711 ± 0,163	67,836	0,212 ± 0,012	56,874
Kopřiva	-	-	-	-

Tabulka 39: Stanovení obsahu morinu a quercetinu v bylinných sypaných čajích po jednom roce skladování

Druh čaje	Koncentrace morinu duben 2008 (mg/g)	Pokles morinu po roce skladování (%)	Koncentrace quercetinu duben 2008 (mg/g)	Pokles quercetinu po roce skladování (%)
Meduňka	-	-	0,225 ± 0,002	80,267
Heřmánek	0,516 ± 0,037	77,212	0,012 ± 0,002	96,165
Mateřídouška	2,402 ± 0,056	64,634	0,099 ± 0,016	37,862
Šípek	-	-	-	100
Máta	0,743 ± 0,092	53,471	0,360 ± 0,003	3,921
Třezalka	-	100	-	100
Lípa	0,275 ± 0,055	38,506	0,079 ± 0,010	33,614
Tymián	0,348 ± 0,035	78,836	0,097 ± 0,004	76,173
Jitrocel	0,464 ± 0,015	45,116	-	100
Divizna	-	100	0,041 ± 0,001	51,237
Černý bez	-	-	0,033 ± 0,001	42,973
Kopřiva	-	-	-	-
Jablečník	-	-	-	100

V tabulkách 37, 38 a 39 jsou zapsány hodnoty poklesu morinu a quercetinu. Ve většině vzorků došlo k poklesu většímu než 50%. U některých čajů dokonce morin a quercetin po roce nebyly detekovány vůbec. Došlo k úplné degradaci látky, což je znázorněno v tabulkách jako pokles o 100%. U ovocných čajů, došlo k úplnému rozkladu morinu a quercetinu téměř ve všech čajích. Pouze v čaji Ovocná směs poklesl morin o 60% a quercetin o 46%.

Minoritní flavonoidy luteolin, myricetin a kaempferol byly při prvním měření HPLC metodou detekovány v bylinách v tak malém množství, že po roce skladování se je již nepodařilo identifikovat vůbec.

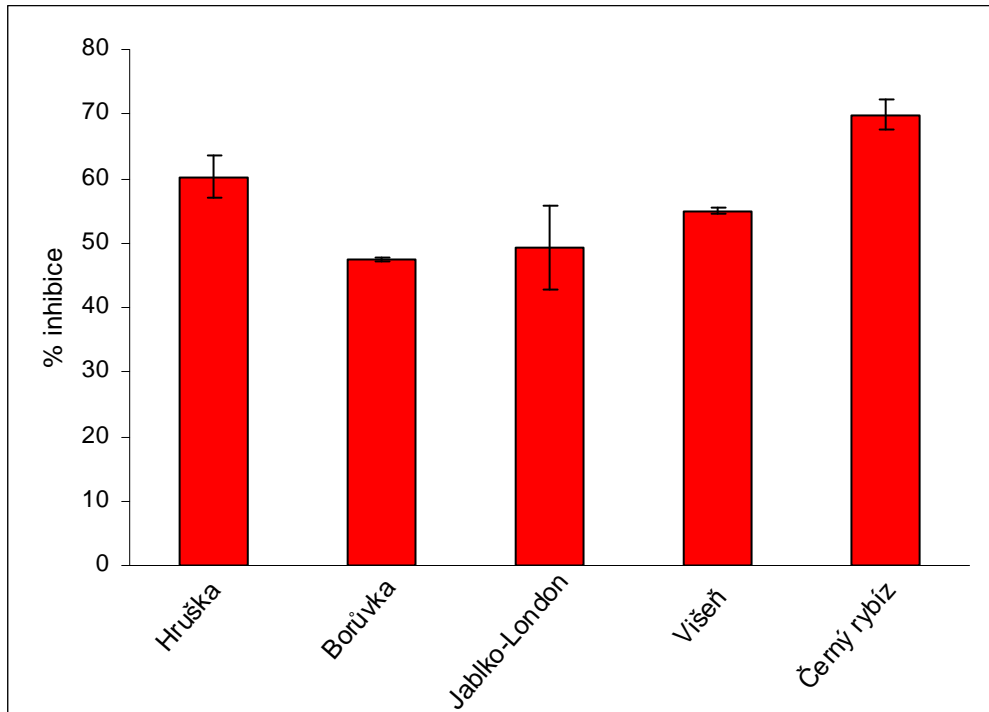
Celkově lze shrnout, že z výsledků HPLC analýzy vybraných typů flavonoidů je patrné, že při skladování čajů dochází k relativně rychlé degradaci některých individuálních flavonoidů v přírodní matrici. Jelikož docházelo u některých flavonoidů k úplné oxidaci těchto látek, při provnání s ostatními testy antioxidační aktivity z toho plyne, že záleží na koncentračním zastoupení jednotlivých flavonoidů, rovněž záleží na typu flavonoidu. Každý flavonoid se projevoval jinou rychlostí degradace. Například porovnáme-li procenta poklesu katechinu a rutinu, došlo k mnohem většímu poklesu rutinu. Z toho lze rovněž vyvodit závěr, že flavonoidy katechinového typu jsou v přírodní matrici stabilnější než ostatní flavonoidy. Při porovnání poklesu flavonoidních látek v ovocných a bylinných čajích dochází k rychlejší oxidaci látek v ovocných čajích, což odpovídá i poklesu hodnot TAS a celkových polyfenolů a flavonoidů po roce. Ovocné čaje se obecně prokázaly jako méně stabilní ve všech použitých testech.

6.3 Stanovení antimutagenních účinků

Antimutagenní účinek extraktů čaje byl hodnocen jako procento inhibice růstu kolonií na Petriho misce bez přítomnosti určité aminokyseliny (Ile-reverze) za přítomnosti mutagenu a extraktu čaje jako antimutagenu. Hodnoceny byly testy, při kterých se hodnota spontánní reverze pohybovala od nuly do deseti kolonií na Petriho misce. V tabulce č. 40, 41 a 42 jsou uvedeny výsledky antimutagenních účinků jednotlivých extraktů čajů. Směrodatná odchylka byla stanovena výpočtem ze tří pokusů. Velmi nízký počet kolonií na miskách letální kontroly byl důkazem, že sledované čajové extrakty nevykazovaly toxické účinky. Pro stanovení antimutagenních účinků extraktů čaje bylo vybráno pět čajů z každé skupiny. Tyto čaje byly vybrány na základě nejlepších výsledků v testech celkové antioxidační aktivity, celkových polyfenolů a flavonoidů. Byl proveden test toxicity vybraných čajů, přičemž toxické účinky extraktů na kvasinice nebyly pozorovány.

Tabulka 40: Procento inhibice růstu kolonií ovocnými čaji

Ovocné čaje	% inhibice
Hruška	60,287 ± 3,227
Borůvka	47,368 ± 0,338
Jablko - London	49,282 ± 6,481
Višeň	55,024 ± 0,338
Černý rybíz	69,856 ± 2,344



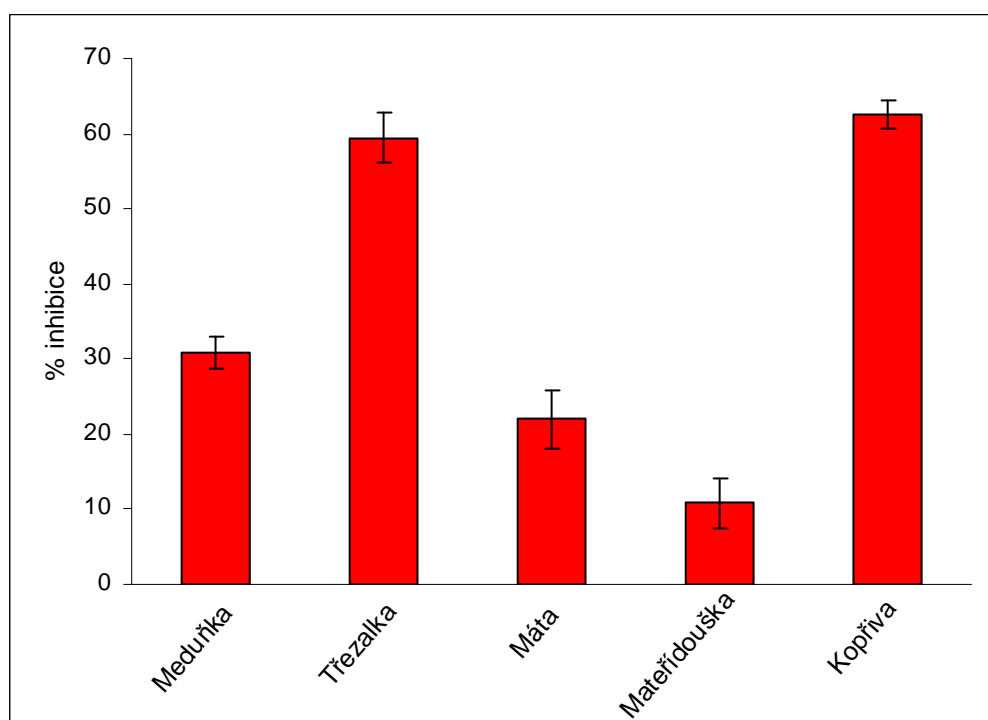
Graf 28: Srovnání antimutagenních účinků ovocných čajů

Pro test antimutagení aktivity bylo vybráno pět ovocných čajů, které prokazovaly nejvyšší hodnoty ve všech testech antioxidační aktivity. Z grafu 28 je jasně patrné, že všechny ovocné čaje vykazují vysoké hodnoty inhibice růstu kolonií. Nejvyšší inhibiční efekt prokázal čaj z černého rybízu a hrušky. Nejnižší hodnotu inhibice měl čaj z borůvky.

Mnoho výzkumů prokázalo antikarcinogenní efekt polyfenolů a flavonoidů na různých nádorových buněčných kulturách a jejich protizánětlivou a antioxidační aktivitu [28]. V předložené práci však nebyla prokázána korelace mezi obsahem polyfenolů, flavonoidů a TAS a antimutagení aktivitou ovocných čajů. Z tohoto poznatku lze usoudit, že nejenom polyfenolické látky jsou zodpovědné za antimutagení efekt ovocných čajů. Jelikož nebyla prokázána ani korelace mezi celkovou antioxidační aktivitou a antimutagení aktivitou, mohou se na antimutagenitě čajů podílet i jiné látky než jen antioxidanty.

Tabulka 41: Procento inhibice růstu kolonií bylinnými porcovanými čaji

Sypané bylinné čaje	% inhibice
Meduňka	30,888 ± 2,184
Třezalka	59,459 ± 3,410
Máta	22,008 ± 3,822
Mateřídouška	10,811 ± 3,410
Kopřiva	62,548 ± 1,969

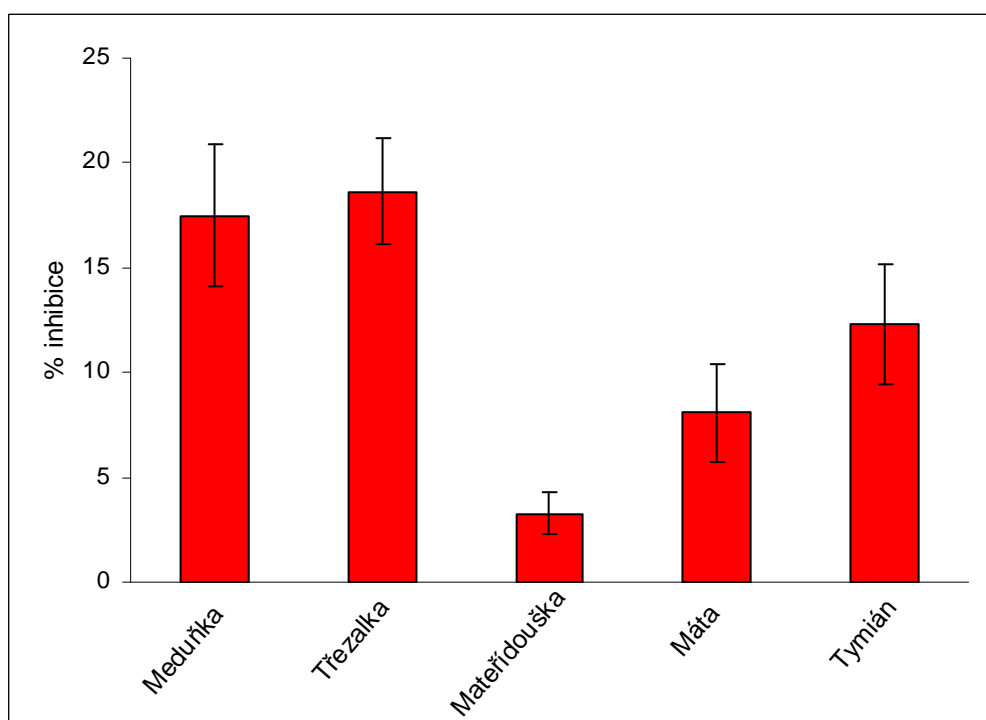


Graf 29: Srovnání antimutageních účinků bylinných porcovaných čajů

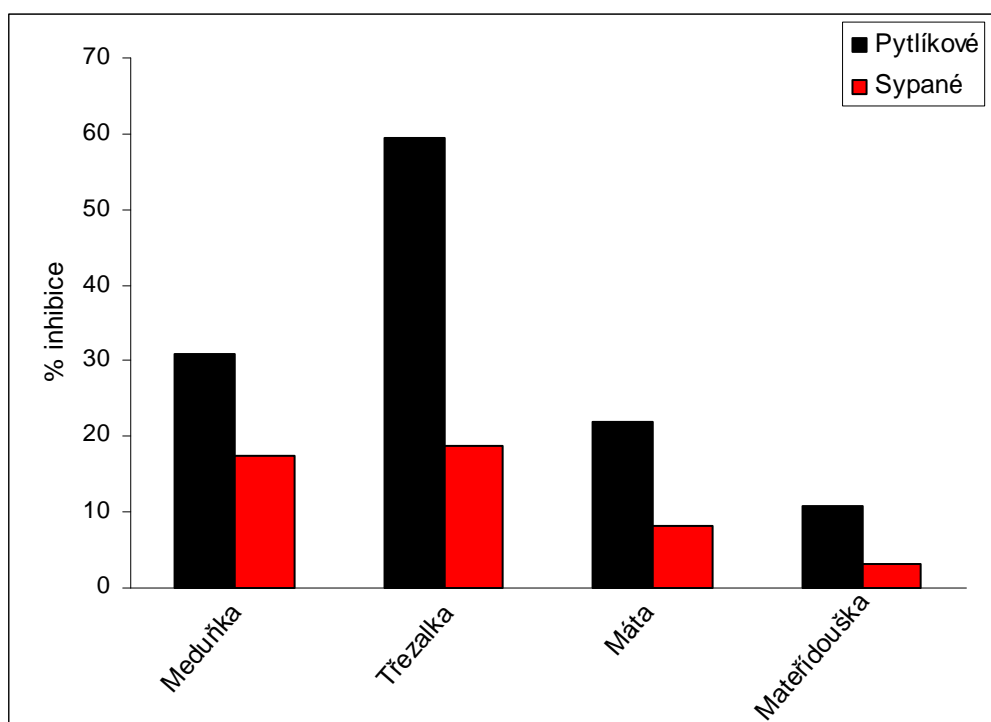
K testu antimutagenní aktivity bylo vybráno také pět bylinných porcovaných čajů a pět bylinných sypaných čajů. Z tabulek 41 a 42 je vidět, že výrazně vyšší antimutagenní aktivitu vykazovaly bylinné porcované čaje. V obou grafech 29 i 30 vykazuje nejnižší procento inhibice růstu kolonií mateřídouška. Přestože mateřídouška vykazuje vysoké hodnoty antioxidační aktivity a vysoký obsah celkových polyfenolů, antimutagenní aktivita je nízká. Tento jev může být způsoben obsahem specifických silic či alkaloidů, které spíše podporují růst kolonií. Protože ani u bylinných čajů nebyla prokázána korelace antimutagenní aktivity a celkové antioxidační aktivity či celkových polyfenolů, je pravděpodobné že slabý antimutagenní efekt mateřídoušky je způsoben jinými obsahovými látkami. U bylinných čajů nejvyšší antimutagenní aktivitu vykazovaly extrakty z kopřivy a třezalky.

Tabulka 42: Procento inhibice růstu kolonií bylinnými sypanými čaji

Sypané bylinné čaje	% inhibice
Meduňka	17,500 ± 3,397
Třezalka	18,654 ± 2,493
Mateřídouška	3,269 ± 0,981
Máta	8,077 ± 2,324
Tymián	12,308 ± 2,865



Graf 30: Srovnání antimutagenních účinků bylinných sypaných čajů



Graf 31: Porovnání antimutagenních účinků bylinných porcovaných čajů a bylinných sypaných čajů.

V grafu 31 bylo porovnáno antimutagenní působení bylinných sypaných a bylinných porcovaných čajů. Ve všech případech bylo prokázán větší účinek u čajů porcovaných. Zajímavým poznatkem je, že při srovnání jiných parametrů porcovaných a sypaných čajů (TAS, celkové polyfenoly a flavonoidy) prokazoval vždy vyšší hodnoty čaj sypaný.

Jedním z aspektů pro posouzení antimutagenní aktivity bylinných extraktů může být také typ mutagenu použitého pro test. Záleží na tom, zda je to mutagen přímý (působí přímo na DNA), nebo nepřímý (způsobuje oxidační poškození). Také záleží na chemické struktuře mutagenu a na jeho polaritě. To, že nebyla prokázána korelace mezi antimutagenním působením a obsahem celkových polyfenolů může být způsobeno tím, že polyfenoly vyextrahované do vody jsou relativně polární a mohou mít slabší ochranné schopnosti proti použitému mutagenu. V závislosti na polaritě se molekula antimutagenu chová hydrofobně nebo hydrofilně. Polární složky vodného extraktu budou raději reagovat s polárními složkami média, zatímco nepolární mutagen bude snáze reagovat s buněčnými matricemi.

Z testu antimutagenity vyplývá, že mnohem lepší antimutagenní účinky vykazovaly čaje ovocné ve srovnání s čaji bylinnými. Oba druhy čajů však mohou být vhodným doplňkem stravy s významnými antioxidační účinky a relativně vysokou antimutagenní aktivitou.

6.4 Seznorická analýza

Senzorická analýza byla provedena za účelem monitoringu chuťové přijatelnosti ovocných a bylinných čajů u dvou významně odlišných souborů hodnotitelů. Jednou skupinou byli senioři studující na Univerzitě třetího věku při VUT v Brně a druhou studenti maturitního ročníku Gymnázia Zastávka. Každý hodnotitel vyplnil sensorický dotazník (viz příloha 18) a hodnotil základní jakostní parametry 5 ovocných čajů a 5 bylinných čajů. Hodnocení jakosti bylo provedeno za použití stupnice od 1 do 5, přičemž jednotlivé stupně hodnocení klesaly od vynikající k nedostačující kvalitě v rozmezí 1-5. :

1. vynikající
2. velmi dobrá
3. dobrá
4. dostačující
5. nedostačující

V následujících tabulkách a grafech jsou uvedeny průměrné hodnoty sensorických parametrů u hodnotitelských skupin a jejich srovnání.

Tabulka 43: Charakteristika hodnotitelských souborů

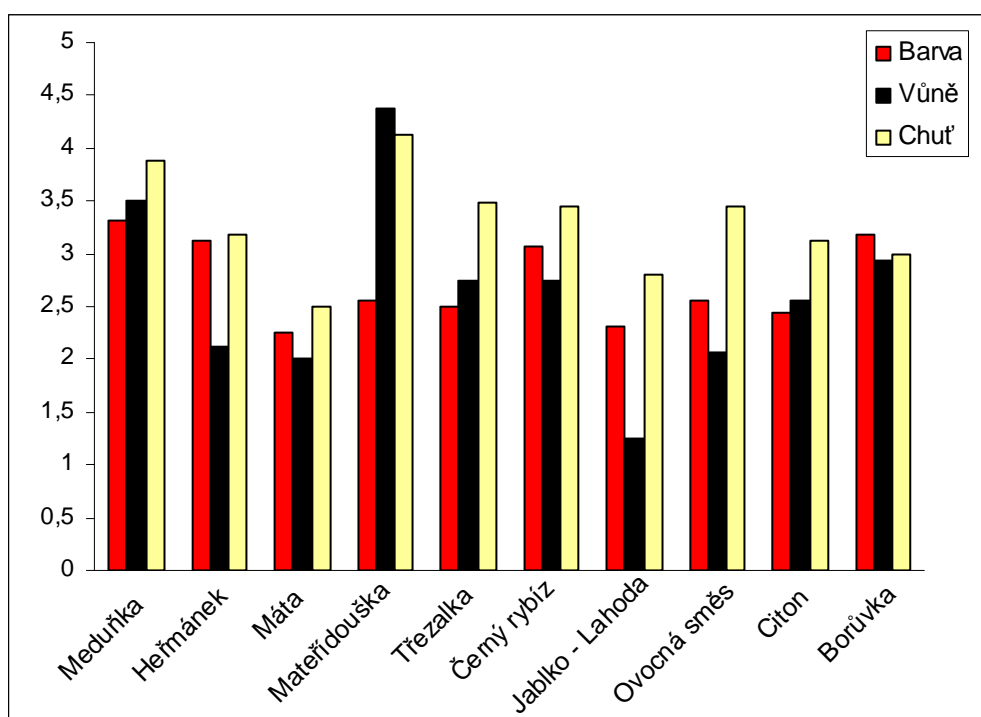
Skupiny	Senioři	Junioři
Počet jedinců	14	16
Průměrný věk	75,12 + 7,63	18,13 + 0,67
Ženy/muži	12/2	7/9
Kuřáci/nekuřáci	0/14	0/16

Tabulka 44: Hodnocení sensorických parametrů jednotlivých čajů juniory

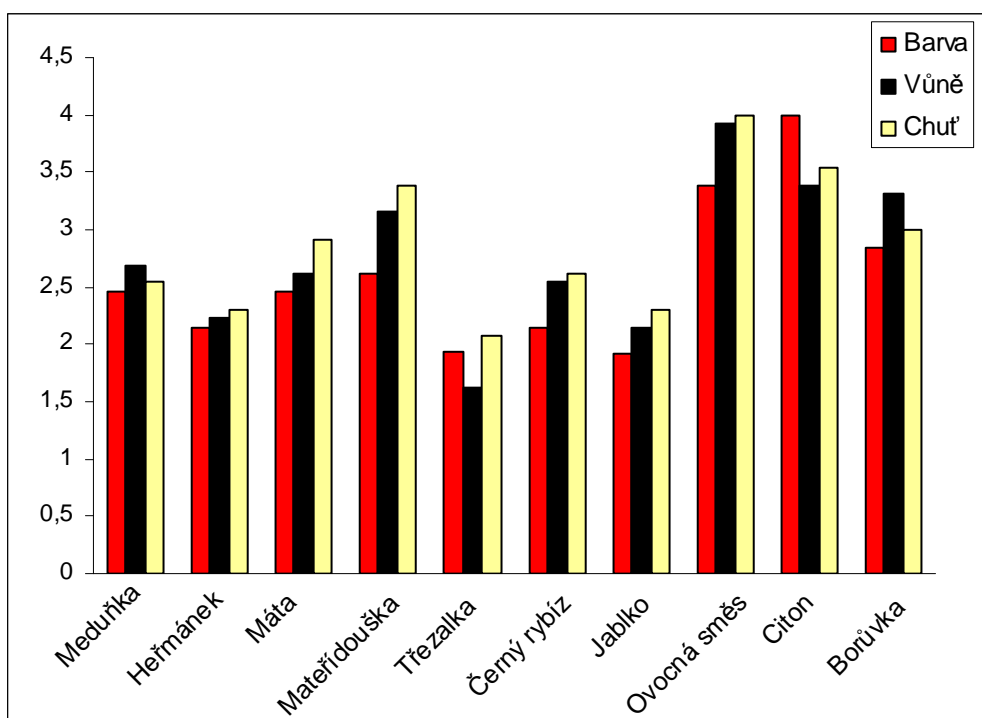
Druh čaje	Barva	Vůně	Chuť
meduňka	3,310	3,500	3,875
heřmánek	3,130	2,130	3,190
máta	2,250	2,000	2,500
mateřídouška	2,560	4,380	4,130
třezalka	2,500	2,750	3,490
černý rybíz	3,060	2,750	3,440
jablko	2,310	1,250	2,810
ovocná směs	2,560	2,060	3,440
citron	2,440	2,560	3,125
borůvka	3,190	2,940	3,000

Tabulka 45: Hodnocení sensorických parametrů jednotlivých čajů seniory

Druh čaje	Barva	Vůně	Chuť
meduňka	2,460	2,690	2,540
heřmánek	2,150	2,230	2,310
máta	2,460	2,620	2,920
mateřídouška	2,620	3,150	3,390
třezalka	1,930	1,620	2,080
černý rybíz	2,150	2,540	2,620
jablko	1,920	2,150	2,310
ovocná směs	3,390	3,920	4,000
citron	4,000	3,390	3,540
borůvka	2,850	3,310	3,000



Graf 32: Hodnocení sensorických parametrů juniory



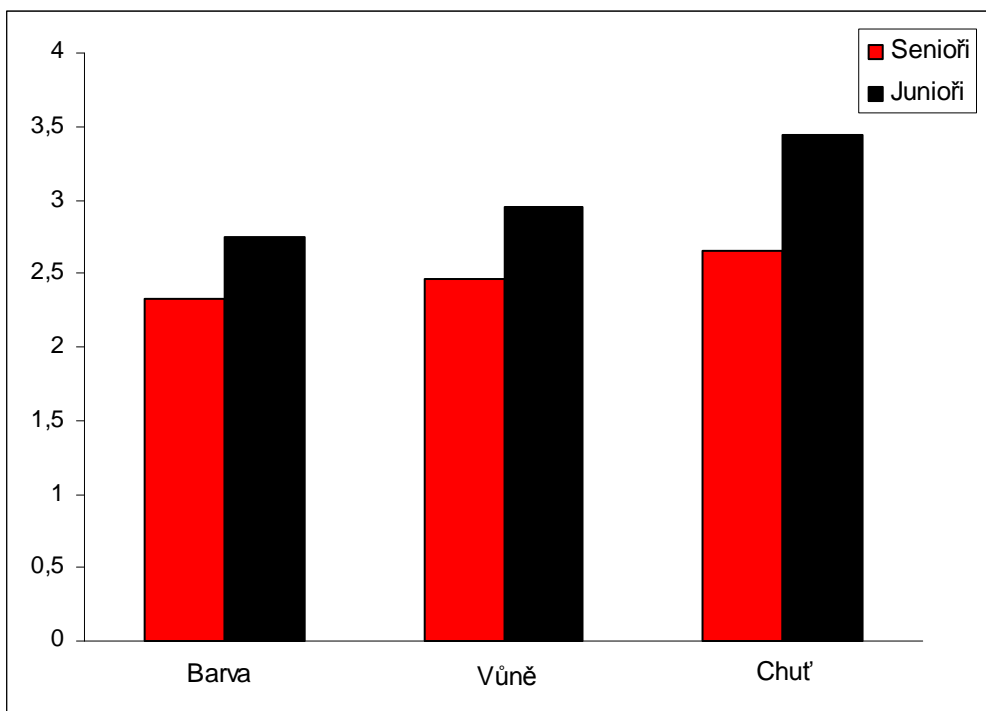
Graf 33: Hodnocení sensorických parametrů seniory

Z grafů 32 a 33 je patrné, že skupina juniorů hodnotila lépe ovocné čaje, zatímco skupina seniorů hodnotila významně lépe bylinné čaje ve srovnání s ovocnými. Senioři byli ve většině případů schopni rozeznat podle vůně a barvy jednotlivé bylinné čaje, přičemž chuťově upřednostňovali čaj z meduňky (7 jedinců ze 14) a z třezalky (5 ze 14). Junioři upřednostňovali spíše chuťově výrazný mátový čaj před jemnějšími bylinnými čaji. Senioři i junioři vybrali z nabízených ovocných čajů jako nejchutnější čaj jablečný, ovocné čaje z červeného ovoce chutnali juniorům významně více než seniorům.

V tabulce 46 je uvedeno průměrné hodnocení sensorických parametrů u všech bylinných čajů a srovnány tyto výsledky u obou hodnotitelských skupin. Potvrdilo se, že senioři hodnotí bylinné čaje lépe než junioři, rozdíly v hodnocení jsou statisticky významné.

Tabulka 46: Průměrné hodnocení sensorických parametrů bylinných čajů u obou souborů

Hodnotitelé	Barva	Vůně	Chuť
Senioři	2,324	2,462	2,648
Junioři	2,750	2,952	3,437

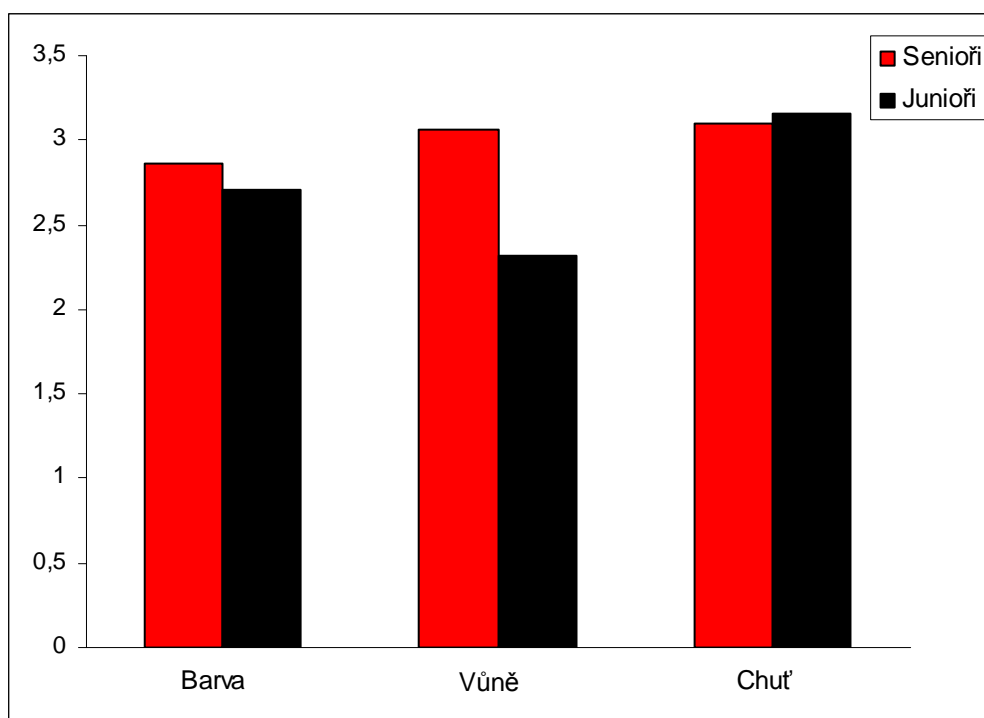


Graf 34: Srovnání průměrného hodnocení sensorických parametrů bylinných čajů seniory a juniory

V tabulce 47 je uvedeno podobné srovnání pro průměrné hodnocení všech ovocných čajů oběma hodnotitelskými soubory. Z výsledků je patrné, že junioři hodnotí ovocné čaje lépe než senioři, avšak pouze u vůně jsou rozdíly mezi soubory statisticky významné. Senioři hodnotili všechny tři sensorické parametry u bylinných čajů statisticky významně lépe než u ovocných čajů, zatímco u juniorů tomu bylo spíše opačně.

Tabulka 47: Průměrné hodnocení sensorických parametrů ovocných čajů u obou souborů

Hodnotitelé	Barva	Vůně	Chuť
Senioři	2,862	3,062	3,094
Junioři	2,712	2,312	3,163



Graf 35: Srovnání průměrného hodnocení sensorických parametrů ovocných čajů seniory a juniory

Tabulka 48: Celkové hodnocení chuti bylinných čajů

Druh čaje	Senioři	Junioři
Meduňka	2,540	3,875
Heřmánek	2,310	3,190
Máta	2,920	2,500
Mateřídouška	3,390	4,130
Třezalka	2,080	3,490

Tabulka 49: Celkové hodnocení chuti ovocných čajů

Druh čaje	Senioři	Junioři
Černý rybíz	2,620	3,440
Jablko	2,310	2,810
Borůvka	3,000	3,000
Citron	3,540	3,125
Ovocná směs	4,000	3,440

Z celkových výsledků sensorické analýzy (viz srovnání celkové chuti bylinných čajů – tabulka 48 a ovocných čajů – tabulka 49) je zřejmé, že u dnešní mladé generace nejsou bylinné čaje v takové oblibě jako u seniorů. Senioři měli průměrné známky sensorických parametrů nižší (tzn. lepší hodnocení). Je to zřejmě způsobeno tradicemi. V dřívější době se čaje pily rozhodně více než dnes a v současné době se k tomuto trendu svět opět navrácí.

Naopak tomu je u ovocných čajů, kdy junioři hodnotili lépe jak barvu, tak i vůni čaje. Ohodnocení chuti bylo srovnatelné.

Skutečnost, že senioři upřednostňují bylinné čaje a čaje vůbec není nijak překvapující, avšak s ohledem na podstatně vyšší obsah aktivních látek by měli i junioři být směřováni k vyšší konzumaci bylinných čajů.

V této diplomové práci byla provedena studie antioxidačních a antimutagenních účinků bylinných a ovocných čajů. Rovněž byla zkoumána a porovnána antioxidační aktivita bylinných porcovaných a sypaných čajů. Na závěr této práce byla provedena senzorická analýza z důvodu zjištění chuťové přijatelnosti vybraných vzorků čajů.

Hodnocení ovocných a bylinných čajů však nelze ani po této studii provést zcela jednoznačně. Z pohledu antioxidačního působení byly nejlépe vyhodnoceny čaje bylinné sypané, které svými hodnotami ve všech testech převyšovaly bylinné porcované i ovocné čaje. Z pohledu antimutagenní a popřípadě antikarcinogenní aktivity je však projevily jako nejúčinnější čaje ovocné. Bylinné čaje vykazovaly velmi mírné antimutagenní účinky, což je pravděpodobně způsobeno komplexností a složitostí bylinné matrice.

Ani senzorická analýza nepřinesla jednoznačné hodnocení přijatelnosti čajů. Senioři jako příjemnější hodnotili čaje bylinné a junioři naopak čaje ovocné.

Pití ovocných čajů lze doporučit celé populaci včetně dětí pro každodenní užívání a pro osvěžení. Rovněž mohou být prospěšné jako zdroj vitamínu C. Bylinné čaje by se naopak měly pít až po zjištění jejich účinků na organismus, popřípadě po poradě s lékařem.

7 ZÁVĚRY

- Předložená diplomová práce je zaměřena na studium antioxidačních a antimutagenních účinků bylinných a ovocných čajů. Obsah a působení biologicky aktivních látek bylo zjišťováno několika metodami. Celková antioxidační kapacita byla stanovena metodou ABTS. Stanovení celkových polyfenolů bylo provedeno Folin-Ciocalteovou metodou, stanovení celkových flavonoidů orientační metodou s hlinitou solí. Rovněž byla provedena identifikace a kvantifikace jednotlivých flavonoidů metodou HPLC a verifikace metodou on-line LC/MS .
- Nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity byly stanoveny v bylinných sypaných čajích. Ovocné čaje obecně vykazovaly nižší antioxidační aktivitu než čaje bylinné. Při porovnání bylinných sypaných čajů a bylinných porcovaných čajů byla ve všech případech zjištěna vyšší antioxidační aktivita u čajů sypaných. Jednoznačně nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval třezalkový čaj ($15,931 \pm 0,272$ mmol/l).
- Analýza celkových polyfenolů prokázala vyšší hodnoty polyfenolů u bylinných čajů než u čajů ovocných. Z ovocných čajů byl nejlépe vyhodnocen čaj Jablko-London ($19,541 \pm 0,168$ mg/g), z bylinných čajů z meduňky, třezalky a máty. Ve většině případů byl v bylinných sypaných čajích nalezen vyšší obsah polyfenolů než v čajích porcovaných. Při analýze celkových flavonoidů byly stanoveny nejvyšší hodnoty flavonoidů v bylinných sypaných čajích, v ovocných čajích byl prokázán velmi nízký obsah flavonoidů. Jako nejúčinnější z ovocných čajů byl podobně jako u polyfenolů stanoven čaj Jablko-London a z bylinných čajů meduňka a mateřídouška. U bylinných porcovaných čajů byla prokázána přímá korelace mezi obsahem celkových polyfenolů a celkových flavonoidů. V této části práce bylo dále prokázáno, že v ovocných čajích flavonoidy zastupují mnohem menší procento polyfenolických látek než u čajů bylinných.
- Metodou HPLC byla stanovena přítomnost a obsah vybraných flavonoidů. Z flavonoidů katechinového typu byl ve vzorcích analyzován katechin, epikatechin a epikatechin gallát. Přítomnost katechinu byla zjištěna ve všech vzorcích ovocných i bylinných čajů, další dva flavonoidy katechinového typu se vyskytovaly v čajích podle druhu a původu. Katechin byl v nejvyšším množství zjištěn v sypaných bylinných čajích, celkově nejvyšší hodnotu vykazoval čaj z třezalky ($32,024 \pm 0,471$ mg/g). V některých ovocných čajích (od téhož výrobce) byl analyzován rovněž vysoký obsah epikatechinu. Epikatechin gallát byl zjištěn jen v některých vzorcích, a to ve velmi nízkém množství. Z dalších flavonoidů nekatechinového typu byl stanovován rutin, morin, quercetin, myricetin, luteolin a kaempferol. Vysoká hladina rutinu ve srovnání s ostatními flavonoidy byla určena ve všech ovocných čajích. Z bylinných čajů byl rutin ve velkém množství stanoven v kopřivě, třezalce a černém bezu. Ve srovnání s katechinem a rutinem byly ostatní flavonoidy prokázány ve velmi nízkých až zanedbatelných koncentracích.

- Metodou LC/MS byla provedena verifikace HPLC stanovení flavonoidů. Pro toto stanovení byl s ohledem na časové nároky vybrán pouze jeden vzorek - mátový čaj. Hmotnostní detekcí byla ve shodě s HPLC se spektrofotometrickou detekcí potvrzena přítomnost majoritních flavonoidů katechinového typu i dalších flavonoidů jako rutinu, morinu, quercetinu a luteolinu. Dále však byla v extraktu máty prokázána i přítomnost látek, které nebyly identifikovatelné spektrofotometricky – např. kofeinu, theaflavin-3-gallátu a kyseliny rozmarýnové.
- Obsah kyseliny L-askorbové byl analyzován pomocí metody HPLC v ovocných čajích a v šípku, který je základem všech ovocných čajů. Extrakty byly připraveny zalitím čajů horkou vodou, což mohlo způsobit velký pokles obsahu vitamínu C, přímým nástřikem byl však analyzován obsah vitamínu C v takovém typu extraktu, který je konzumován běžným spotřebitelem. I přes očekávané ztráty obsahu vitamínu C byla prokázána ve všech analyzovaných čajích relativně vysoká hladina.
- Jedním z cílů této diplomové práce bylo vyhodnotit vliv dlouhodobého skladování čajů na obsah aktivních látek a porovnat změnu jejich antioxidačních vlastností. Stanovení celkové antioxidační aktivity, celkových polyfenolů a flavonoidů a HPLC analýza některých flavonoidů byly provedeny opakovaně po roce skladování čajů ve stabilních podmínkách při 20°C suchu a temnu. Všechny čaje vykazovaly ve všech použitých testech sníženou hladinu analyzovaných parametrů. Jako méně stabilní vůči degradaci polyfenolů a flavonoidů se ukázaly být ovocné čaje, zde se zřejmě projevuje vliv matrice, ve které pravděpodobně rychleji dochází k oxidaci přítomných aktivních látek. U bylinných čajů byl rovněž prokázán vliv matrice, kdy k mnohem rychlejší degradaci antioxidantů docházelo v čajích květových. Nejúčinnější jsou aktivní látky zřejmě vázány v zelených částech rostliny, jako je nať a listy.
- Antimutagenní aktivita čajů byla testována na kvasinkovém kmeni *Saccharomyces cerevisiae* D7. Bylo vybráno pět čajů z každé skupiny, které se projevovaly nejvyššími hodnotami ve skupinových testech antioxidační aktivity. Nejvyšší antimutagenní aktivita na buňkách kvasinek byla pozorována u čajů ovocných. Výrazně převyšovala čaje bylinné, a to sypané i porcované. Při srovnání antimutagenního působení bylinných čajů sypaných a porcovaných byla ve všech případech pozorována vyšší účinnost čaju porcovaných. Bylinné čaje představují velmi komplexní rostlinnou matici a obsahují mnoho látek které mohou negativním způsobem ovlivnit tento test, zatímco ovocné čaje obsahují tři hlavní složky – šípek, jablko a ibišek, které by neměly obsahovat promutagenní složky.
- Sensorická analýza čajů byla provedena se dvěma věkově odlišnými skupinami hodnotitelů – studenty střední školy a posluchači University třetího věku FCH VUT v Brně. Zatímco junioři kladně hodnotili chuť i barvu čajů ovocných, senioři preferovali jak chutí, tak i vůni čaje bylinné.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Abdalwahed A., Bouhlel I., Skandrani I., Valenti K., Kadri M., Guiraud P., Steiman R., Mariotte A. K., Ghedira K., Laporte F., Gijoux-Franca M.-G., Chekir-Ghedira L.: Study of antimutagenic and antioxidant activities of Haklic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*: Confirmation by microarray expression profilig, *Chemico-Biological Interactions* 165, 1-13, (2007).
- [2] Chen H.-Y., Lin Y.-C., Hsieh C.-L.: Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs, *Food Chemistry* 104, 1418-1424, (2007).
- [3] Nagano M., Sugimura T.: Carcinogenic factors in food with relevance to colon cancer development, *Mutation Research* 290, 43-51, (1993).
- [4] Ribero L. R., Salvadori D. M. F.: Dietary components may present mutation-related diseases in humans, *Mutation Research* 554, 195-201, (2003).
- [5] Reader's Digest výběr: Rostlinná medicína, 1. vyd. Praha, 2003. 352 s.
- [6] Korbelář J., Endris Z., Krejča J.: *Naše rostliny v lékařství*, 4. vyd.: Zdravotnické nakladatelství Avicenum, 1973.
- [7] Bylinné čaje [online]. 2008. [cit. 2008-03-14]. Dostupné z www: <<http://www.herb.cz/bylinne-caje-i-379/>>
- [8] O ovocném čaji [online]. 2008. [cit. 2008-03-14]. Dostupné z www: <<http://www.cajovykramek.cz/ovocne-caje/>>
- [9] Byliny [online]. 2008. [cit. 2008-03-16]. Dostupné z www: <<http://www.leros.cz/byliny/>>
- [10] *Matricaria recutita* - Echte Kamille [online]. 2008. [cit. 2008-04-05]. Dostupné z www: <http://www.awl.ch/heilpflanzen/matricaria_recutita/kamille.jpg>
- [11] *Rosa canina* L. [online]. 2008. [cit. 2008-04-05]. Dostupné z www: <<http://www.lympho.net/asp/piccole-schede.asp?Scheda=4>>
- [12] *Hypericum perforatum* [online]. 2008. [cit. 2008-04-05]. Dostupné z www: <<http://www.valletena.com/flores/pages/hypericum%20perforatum.htm>>
- [13] *Plantago lanceolata* [online]. 2008. [cit. 2008-04-05]. Dostupné z www: <<http://www.avogel.nl/Indicaties/afbeeldingen/Plantago-lanceolata.jpg>>
- [14] *Marrubium vulgare* [online]. 2001. [cit. 2008-04-05]. Dostupné z www: <<http://www.fireflyforest.com/flowers/whites/white41.html> >
- [15] Black currant [online]. 2001. [cit. 2008-04-05]. Dostupné z www: <http://www.gothamstudio.com/images/Fruit/Misc._Fruits?N=D>
- [16] Blueberry [online]. 2001. [cit. 2008-04-05]. Dostupné z www: <<http://www.extension.umn.edu>>
- [17] Citrus limon [online]. 2008. [cit. 2008-04-05]. Dostupné z www: <http://www.flora-toskana.de/onlineshop2/product_info.php?products_id=2130>
- [18] Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M.: *Antioxidants in Food – Practical Applications*, Woodhead Publishing, 2001. 380 p. ISBN 1-85573-463-X
- [19] Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P.: Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food chemistry* 89, 27-36, (2005).
- [20] Velíšek J.: *Chemie potravin* 3. 1. vyd. Tábor: Osis, 1999. 328 s. ISBN 80-902391-2-9

- [21] Kris-Etherton Penny M. et al: A symposium: Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, *The American Journal of Medicine*, Volume 113 (9B), 71S-88S, (2002).
- [22] Almajano M. P., Carbó R., Jiménez J. A. L., Gordon M. H.: Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions, *Food Chemistry* 108, 55-63, (2008).
- [23] Wang H., Provan G. J., Helliwell K.: Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis, *Trends in Food Science & Technology* 11, 152-160, (2000).
- [24] Aherne A.S., O'Brien N. M.: Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism, *Nutrition*, Volume 18, Number 1, (2002).
- [25] Wiley John & Sons: *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*, 2. vyd.: Francis, Frederick J., Volumes 1-4, (1999).
- [26] Odriozola-Sernao I., Hernaández-Jover T., Martí'n-Belloso O.: Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits, *Food Chemistry* 105, 1151–1158, (2007).
- [27] Jenness R., Keeney M., Marth E. H.: *Fundamentals of Dairy Chemistry*, 3. vyd: Springer – Verlag, (1999).
- [28] Stavric B., Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 32, Issue 1, 79-90, (1994).
- [29] Krul C., Luiten-Schuite A., Tenfelde A., van Ommen B., Verhagen H., Havenaar R.: Antimutagenic activity of green tea and black tea extracts studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model, *Mutation Research* 474, 71-85 (2001).
- [30] Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: *Základy buněčné biologie*. Nakladatelství Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem. ISBN 80-902906-0-4.
- [31] Mutation, Mutagens, and DNA Repair [online]. 2008. [cit. 2008-03-08]. Dostupné z www: <<http://www-personal.ksu.edu/~bethmont/mutdes.html>>
- [32] 4-NQO [online]. 2008. [cit. 2008-03-03]. Dostupné z www: <http://www.cancer.gov/templates/db_alpha.aspx?print=1&cdid=367451>
- [33] Auletta A.: Overview of In Vitro Tests for Genotoxic Agents, *Handbook of Carcinogen Testing*. 2nd Edition. William Andrew Publishing/Notes, 1994.
- [34] The Ames/Salmonella Test: A Key to Our Research [online]. 2008. [cit. 2008-03-10]. Dostupné z www: <<https://www.llnl.gov/str/Box1.html>>
- [35] *Salmonella typhimurium* [online]. 2008. [cit. 2008-04-11]. Dostupné z www: <<http://skywind.wkhc.ac.kr/%B9%CC%BB%FD%B9%B0/microw.htm>>
- [36] Hladíková R.: *Studium antimutagenních vlastností vybraných přírodních látek*. Brno, 2003. 104 s. Disertační práce na FCH VUT v Brně.
- [37] Štulík K. a kolektiv: *Analytické separační metody*. 1. vyd. UK v Praze: nakladatelství Karolinum, 2004.
- [38] Klouda P.: *Moderní analytické metody*. 1. vyd. Ostrava: nakladatelství Pavel Klouda, 1996.
- [39] Sommer L. a kolektiv: *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. VUT v Brně: nakladatelství VUTIUM, 2000.
- [40] Blázovics A., PhD, Szentmihályi K., PhD, Lugasi A., PhD: In Vitro Analysis of the Properties of Beiqishen Tea, *Basic nutritional investigation* 19:869-875, 2003.
- [41] Pokorný J., Valentová H., Panovská Z.: *Sensorická analýza potravin*. 1. vyd. VŠCHT v Praze: vydavatelství VŠCHT, 1999.

- [42] Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M.: Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols, *Food Chemistry* 94, 550-557, (2006).
- [43] Trouilllas P., Calliste C. A., Allais D. P., Simon A., Marfak A., Delage C., Duroux J. L.: Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limusin countryside as herbal teas, *Food Chemistry* 80, 399-407, (2003).
- [44] Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J.: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship, *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584, (2002).

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Kalibrační závislost kyseliny gallové pro stanovení celkových polyfenolů

Příloha 2: Kalibrační závislost katechinu pro celkové flavonoidy

Příloha 3: Kalibrační závislost katechinu pro HPLC

Příloha 4: Kalibrační závislost epikatechinu pro HPLC

Příloha 5: Kalibrační závislost epikatechin gallátu pro HPLC

Příloha 6: Kalibrační závislost rutinu pro HPLC

Příloha 7: Kalibrační závislost morinu

Příloha 8: Kalibrační závislost quercetinu

Příloha 9: Chromatogram kalibrační závislosti quercetinu

Příloha 10: Chromatogram mátového čaje

Příloha 11: Kalibrační závislost kyseliny L-askorbové

Příloha 12: Celkové hmotnostní spektrum mátového extraktu

Příloha 13: Hmotnostní spektrum mátového extraktu – katechin gallát

Příloha 14: Hmotnostní spektrum mátového extraktu – kofein

Příloha 15: Hmotnostní spektrum mátového extraktu – quercetin

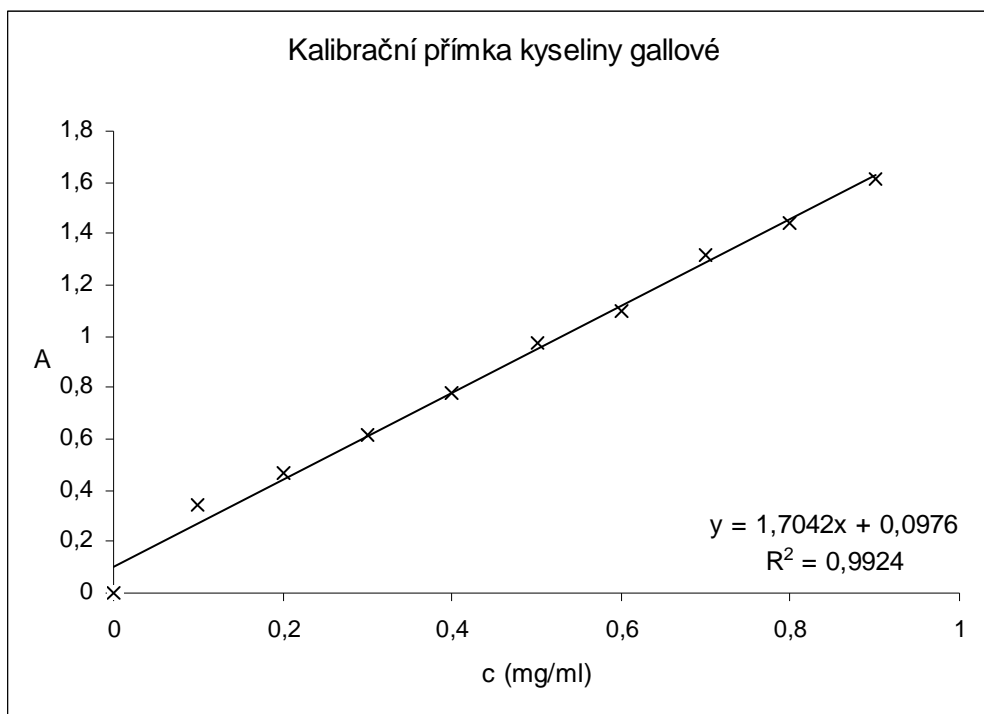
Příloha 16: Hmotnostní spektrum mátového extraktu – kyselina rozmarýnová

Příloha 17: Hmotnostní spektrum mátového extraktu – theaflavin-3-gallát

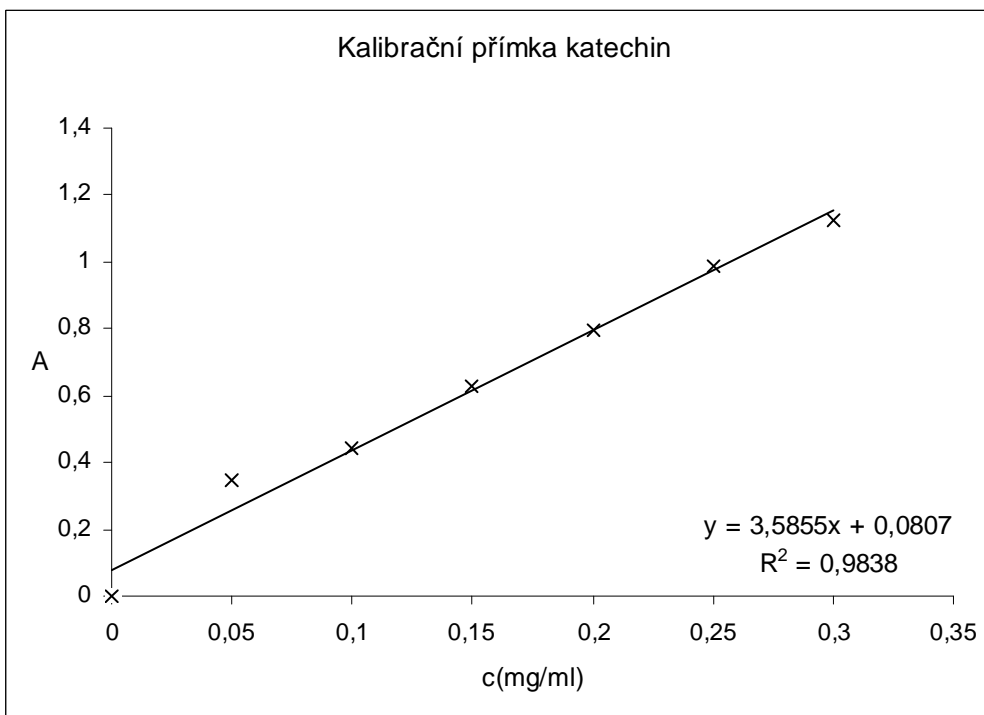
Příloha 18: Orientační sensorický dotazník

10 PŘÍLOHY

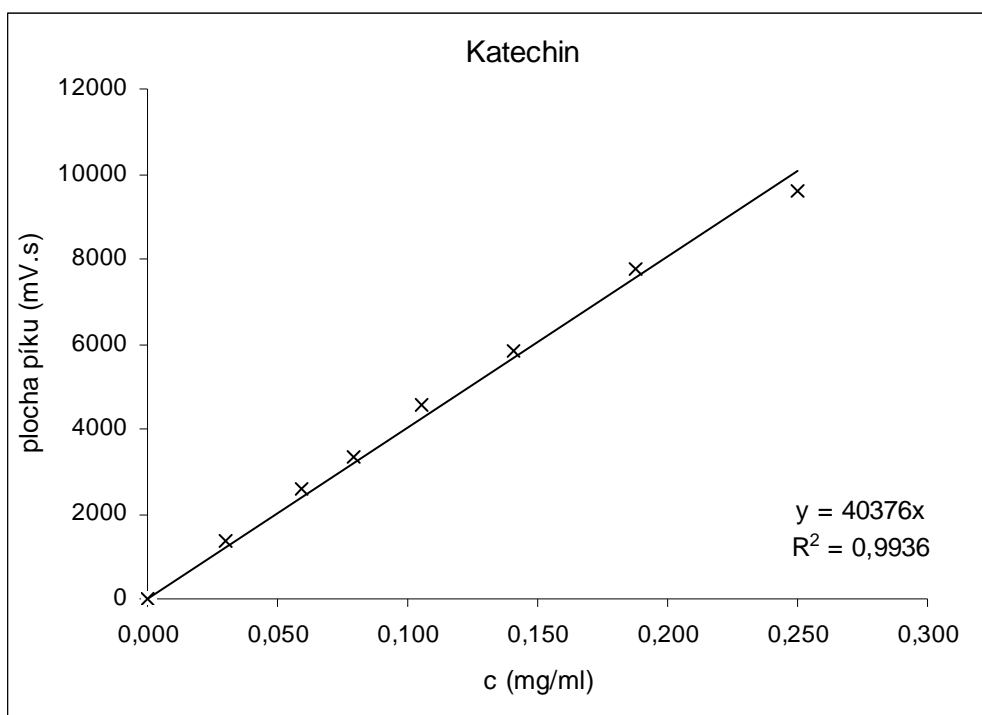
Příloha 1: Kalibrační závislost kyseliny gallové pro stanovení celkových polyfenolů



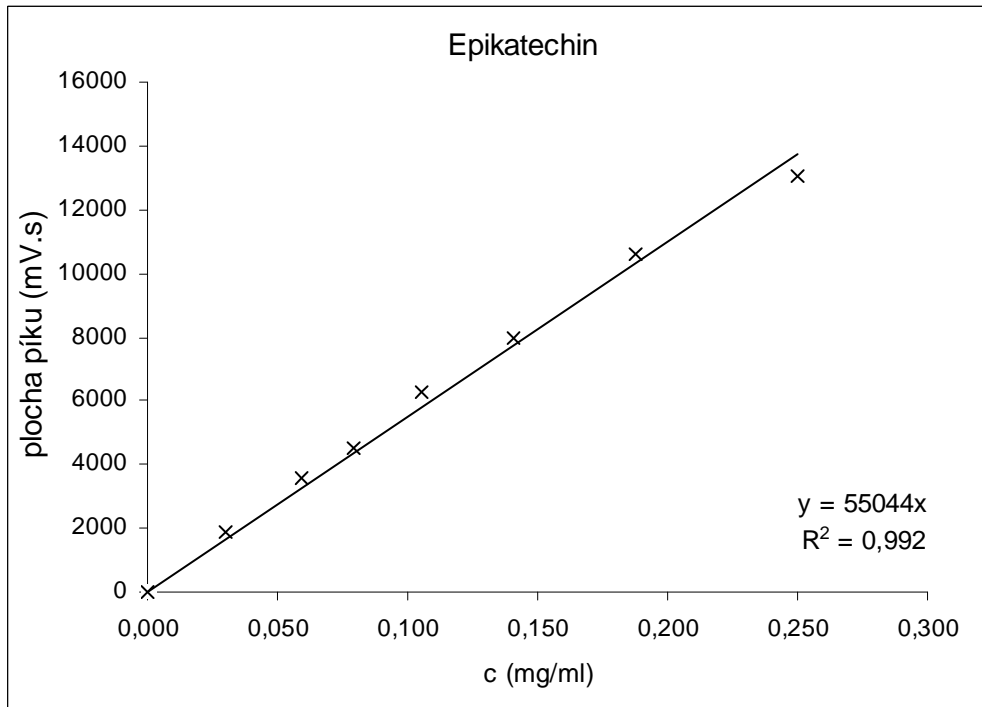
Příloha 2: Kalibrační závislost katechinu pro celkové flavonoidy



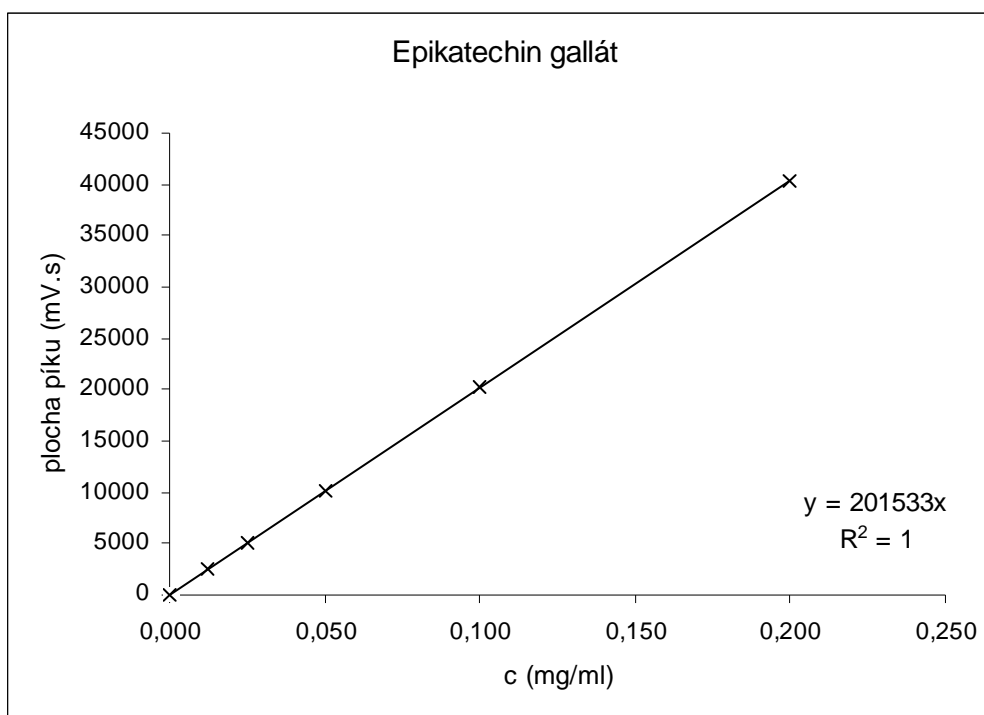
Příloha 3: Kalibrační závislost katechinu pro HPLC



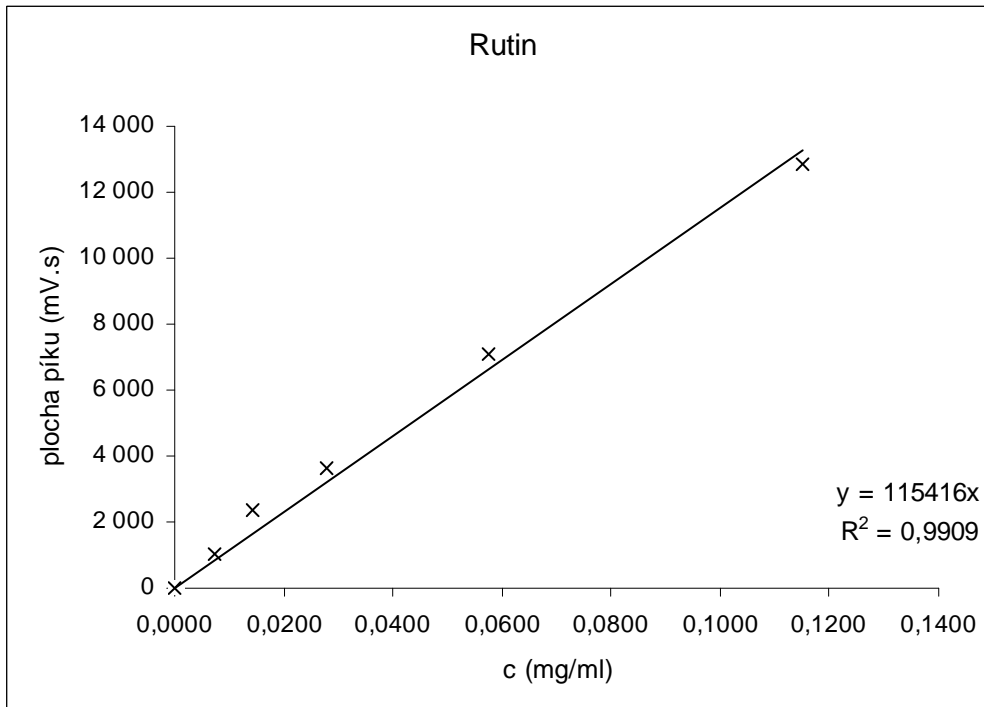
Příloha 4: Kalibrační závislost epikatechinu pro HPLC



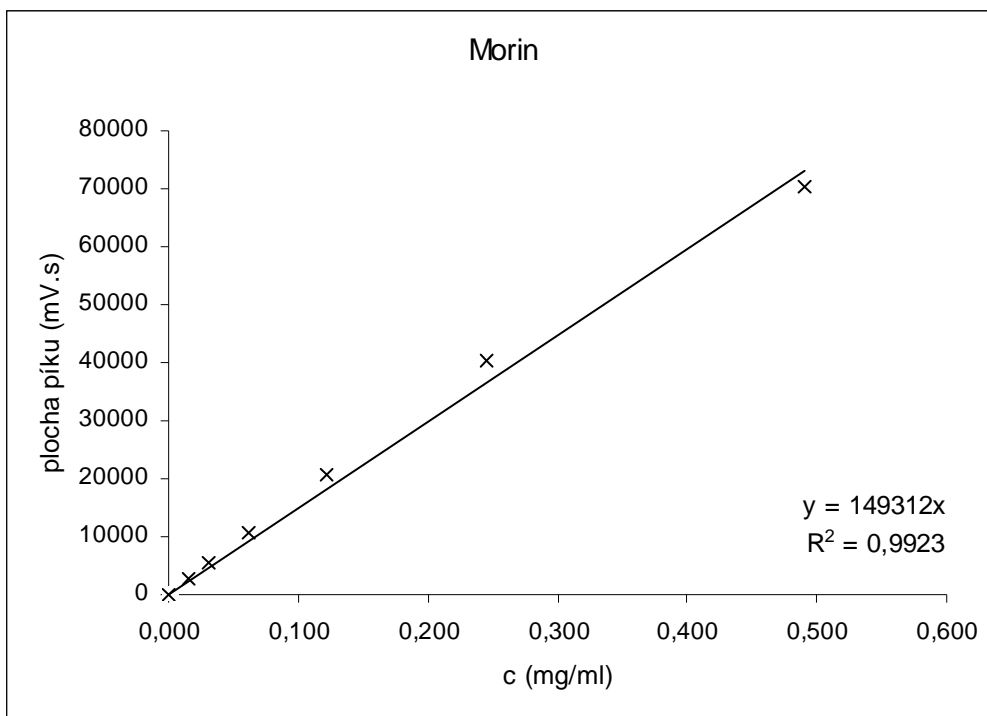
Příloha 5: Kalibrační závislost epikatechin gallátu pro HPLC



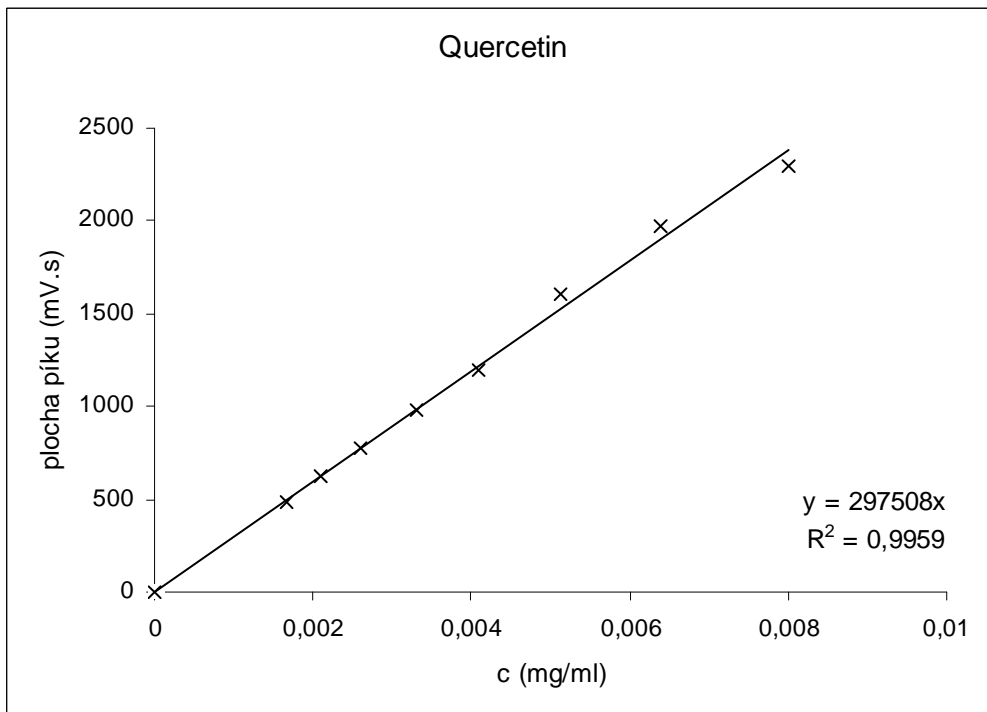
Příloha 6: Kalibrační závislost rutinu pro HPLC



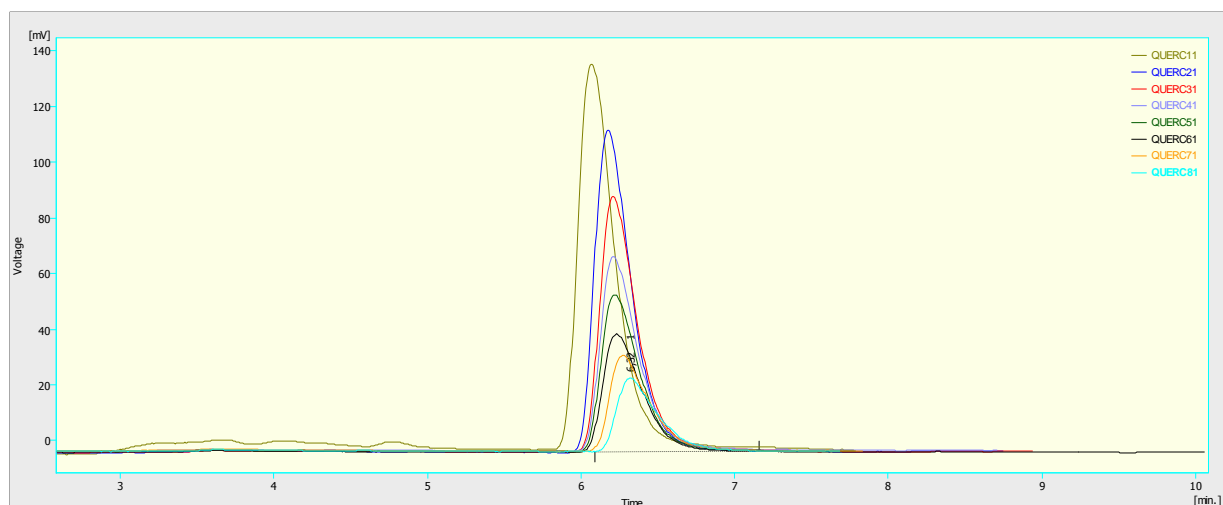
Příloha 7: Kalibrační závislost morinu



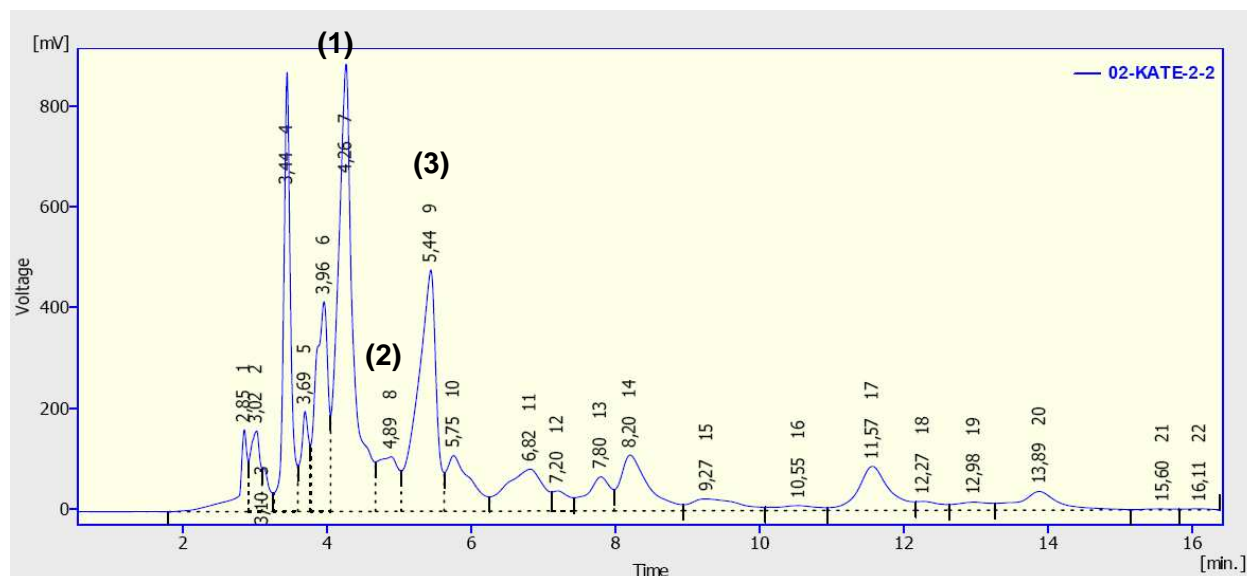
Příloha 8: Kalibrační závislost quercetinu



Příloha 9: Chromatogram kalibrační závislosti quercetinu

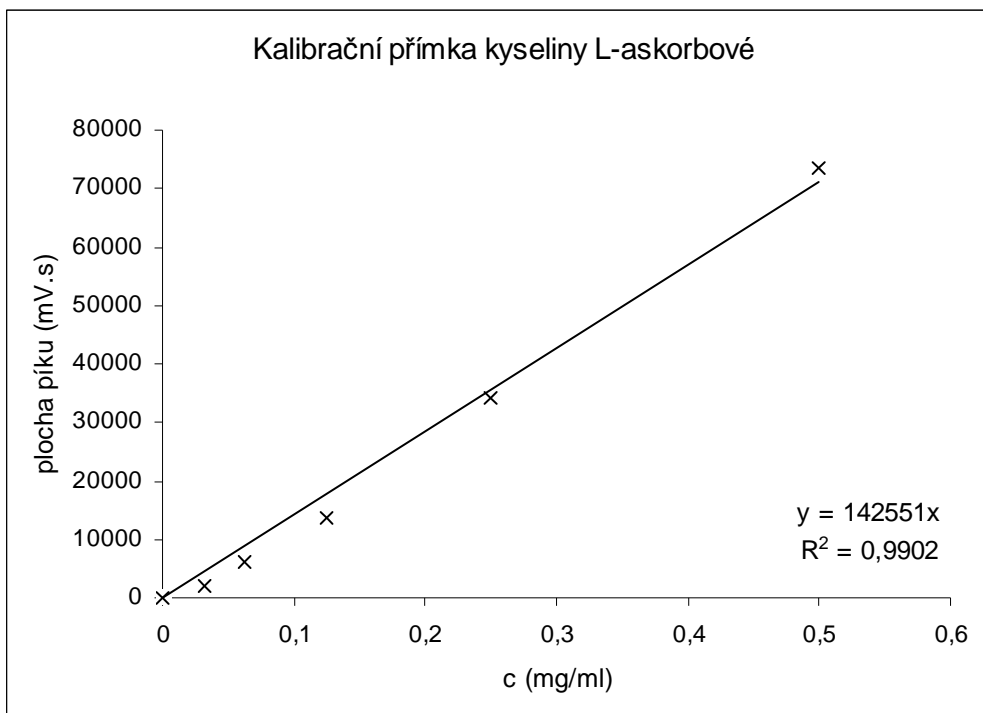


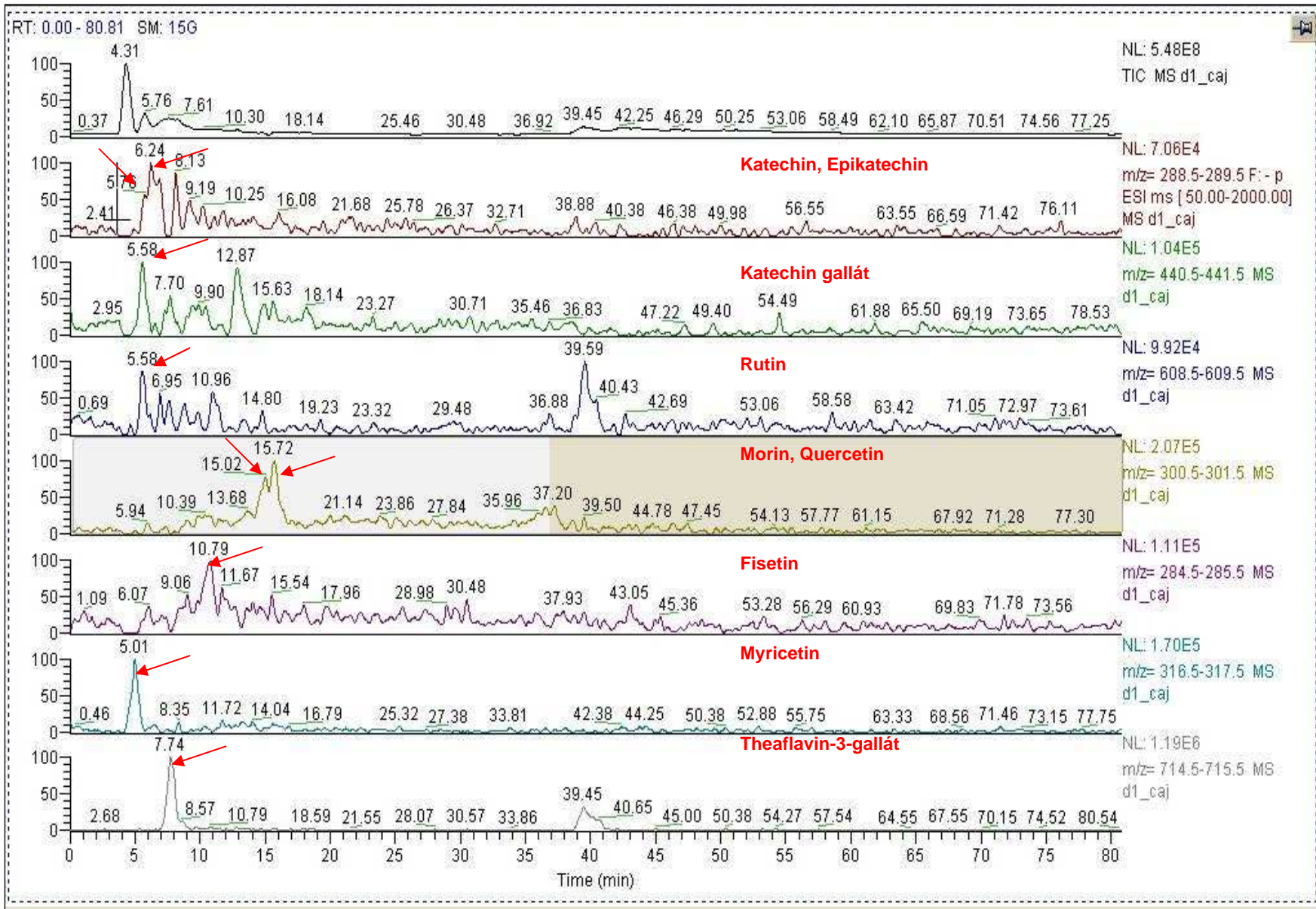
Příloha 10: Chromatogram mátového čaje



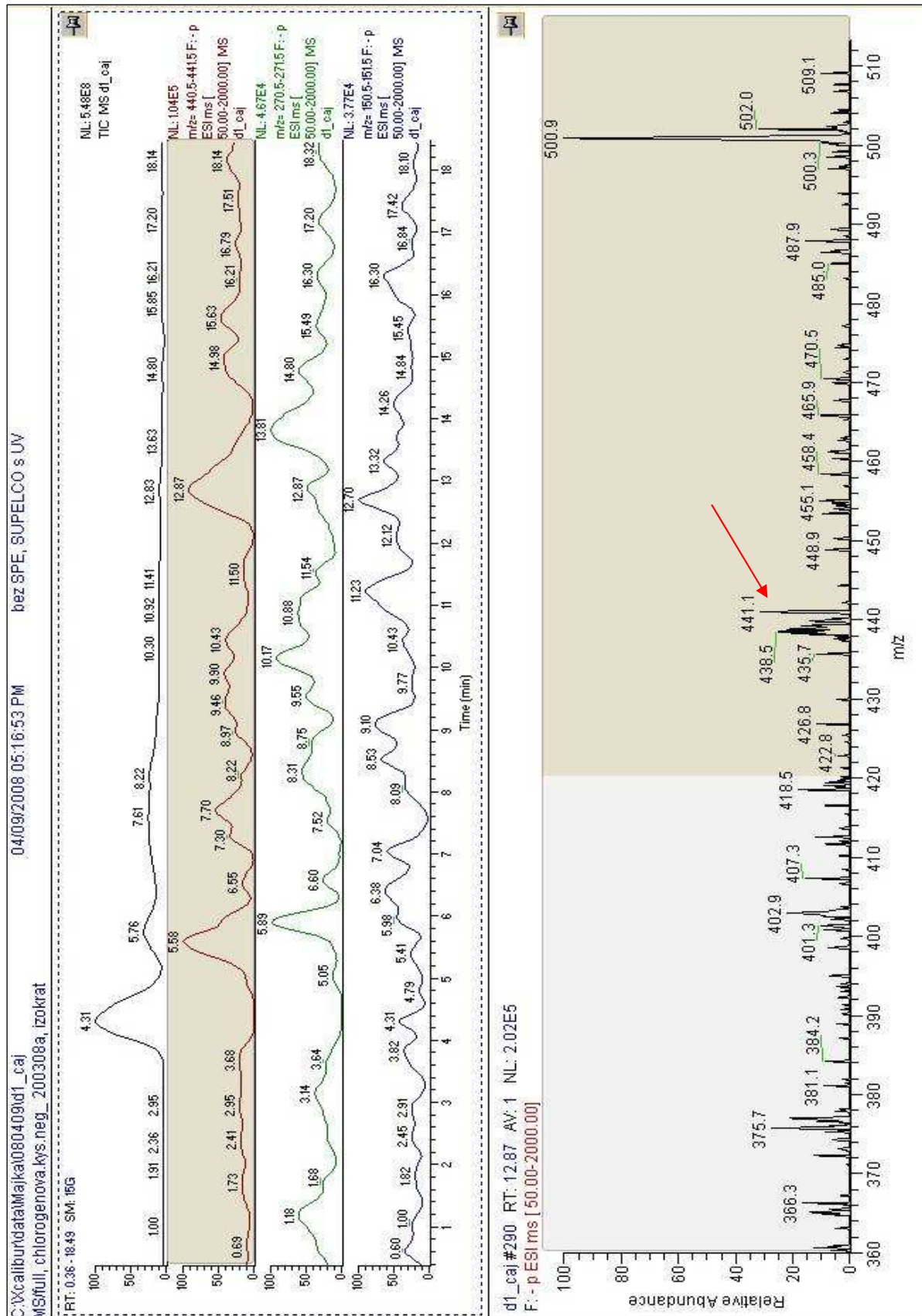
- | | |
|--------------------------------------|-----------------|
| (1) Retenční čas katechinu | $t_R = 4,3$ min |
| (2) Retenční čas epikatechinu | $t_R = 4,9$ min |
| (3) Retenční čas epikatechin gallátu | $t_R = 5,2$ min |

Příloha 11: Kalibrační závislost kyseliny L-askorbové

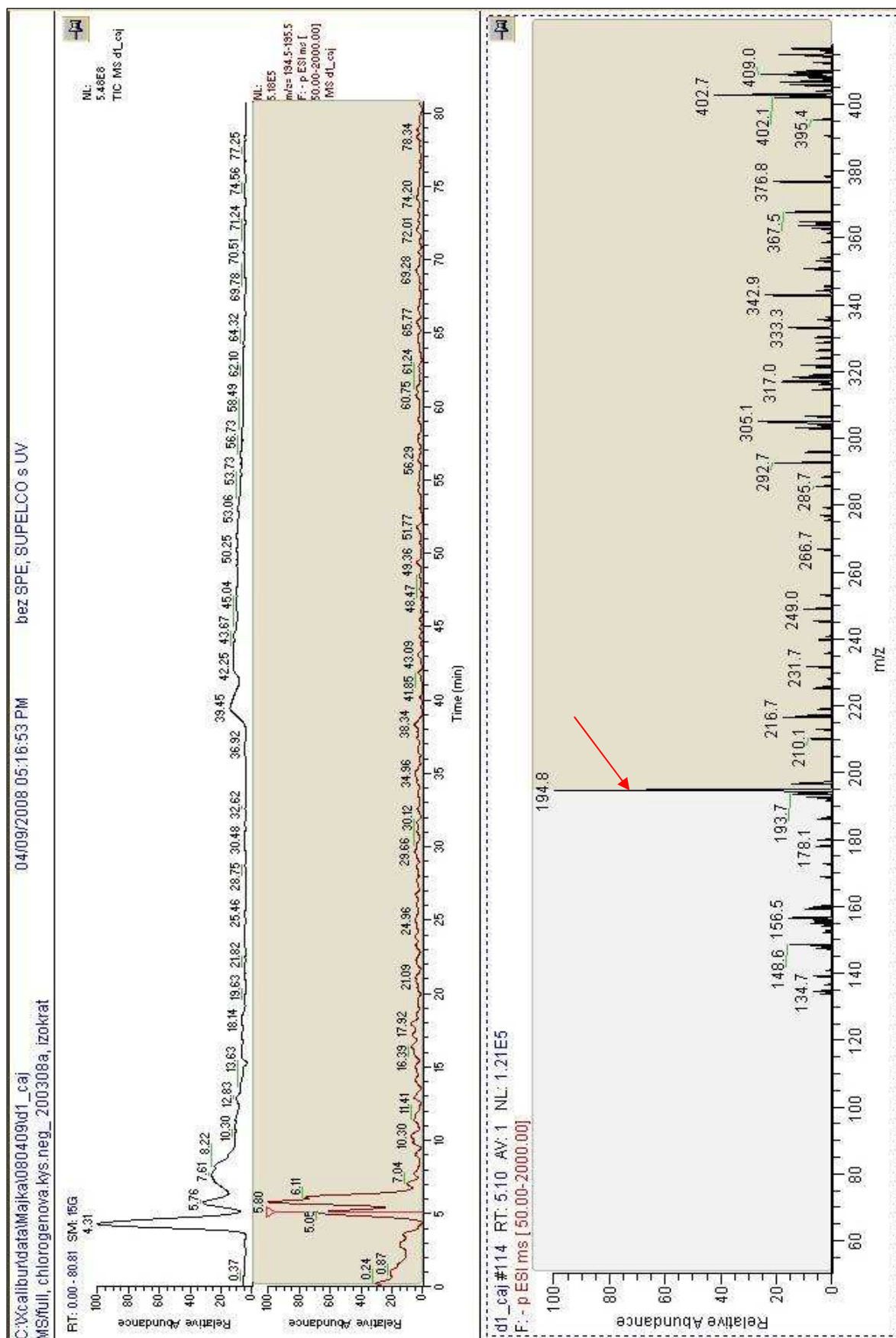




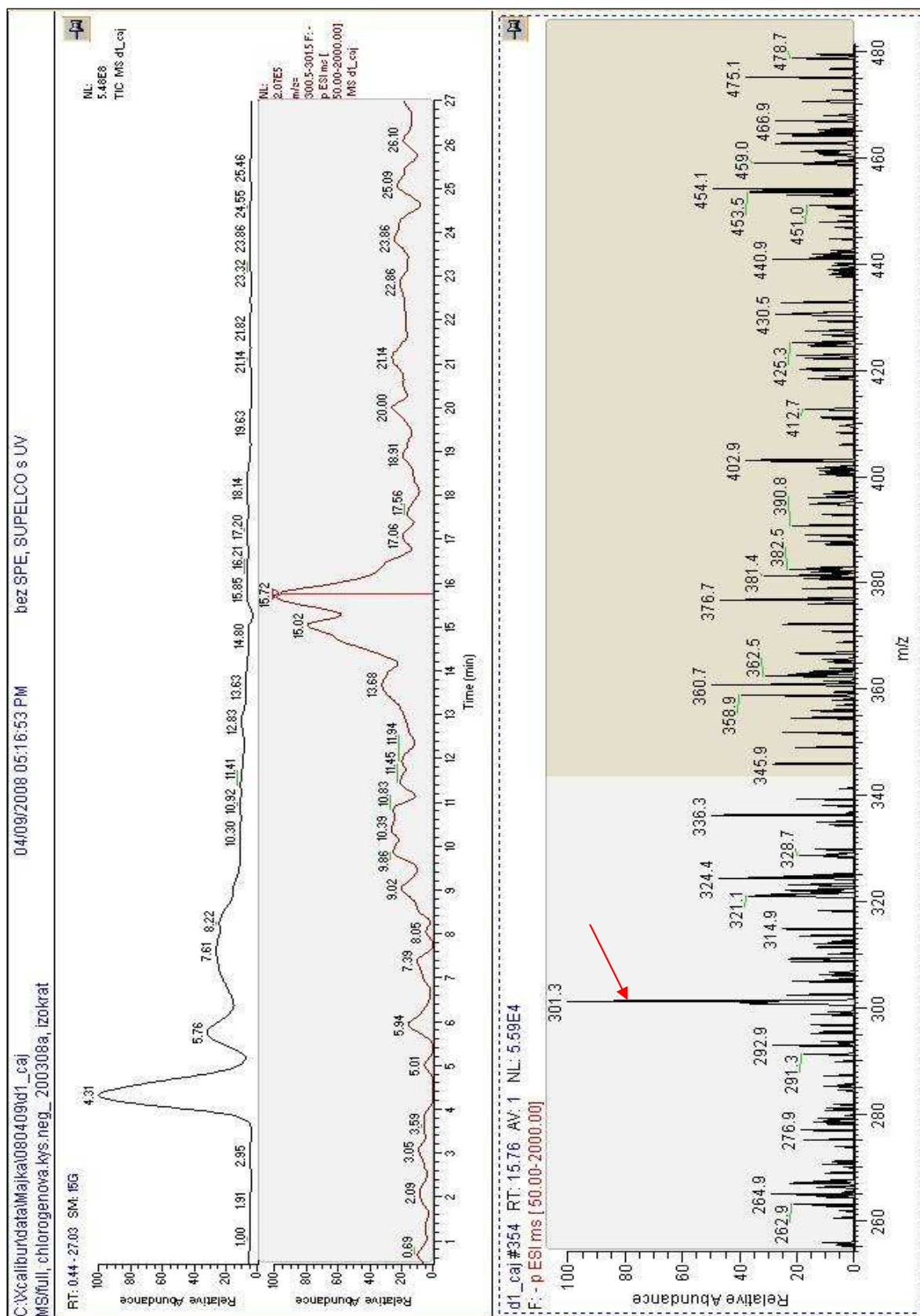
Příloha 13: Hmotnostní spektrum mátového extraktu – katechin gallát



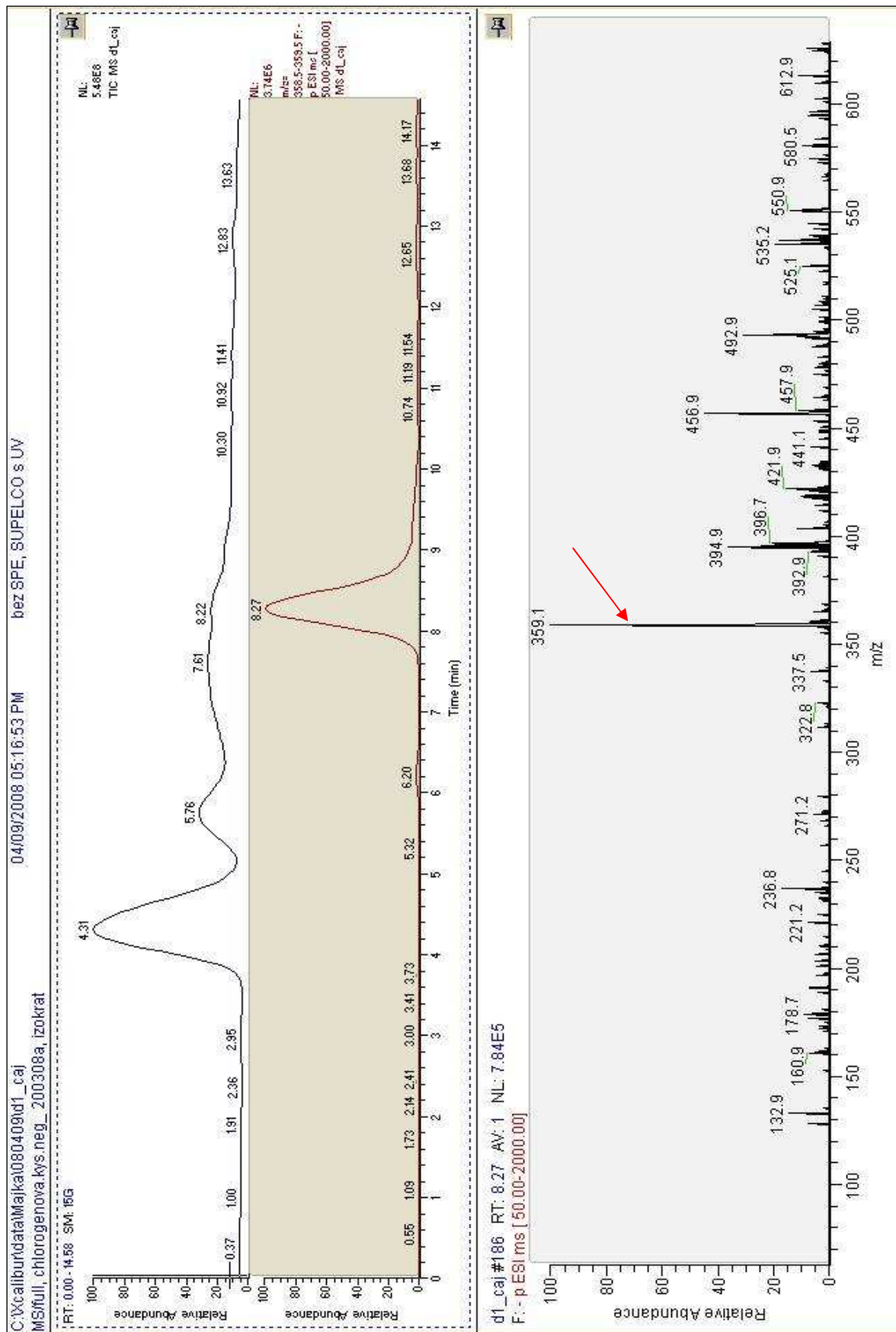
Příloha 14: Hmotnostní spektrum mátového extraktu – kofein



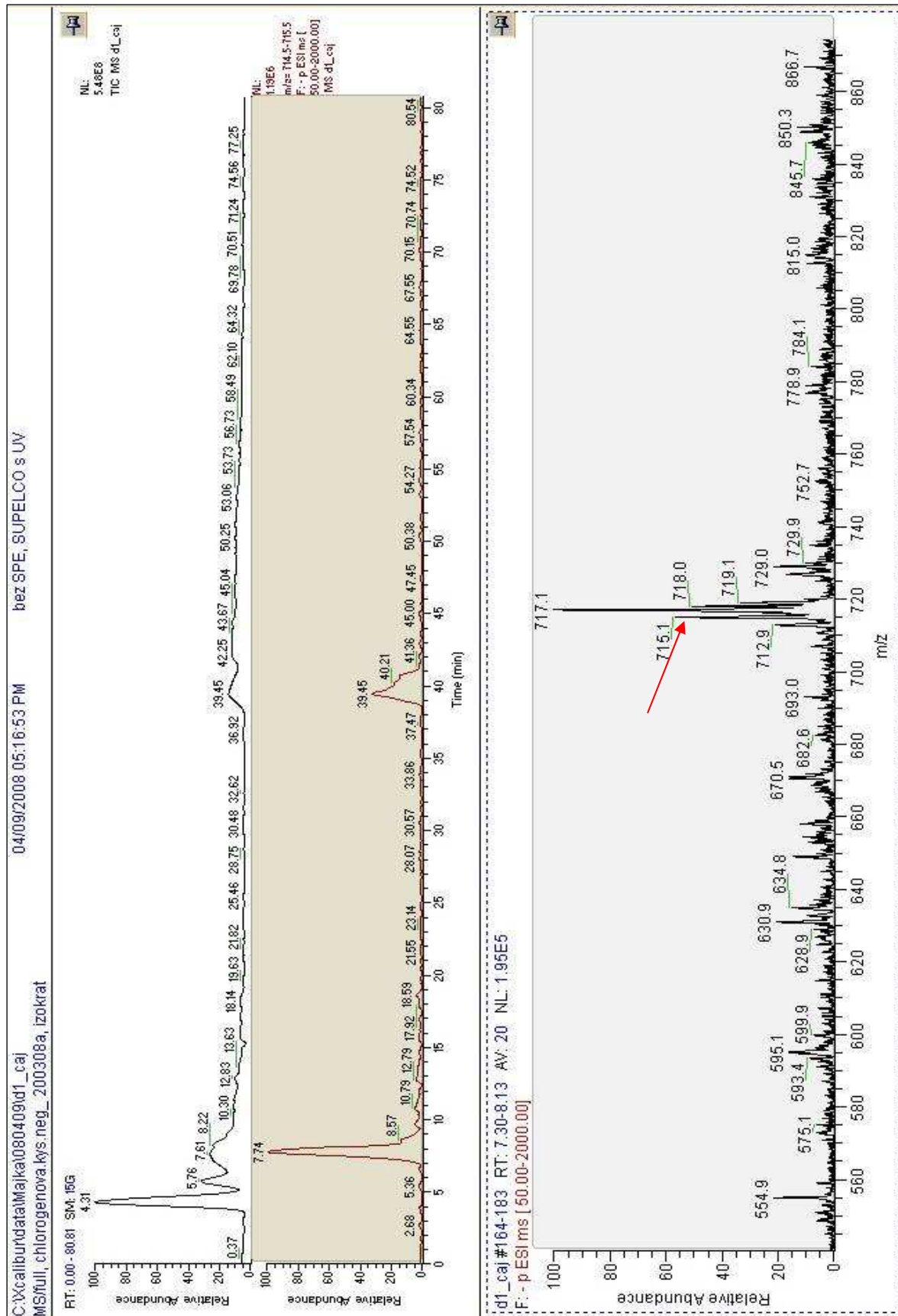
Příloha 15: Hmotnostní spektrum máťového extraktu – quercetin



Příloha 16: Hmotnostní spektrum mátového extraktu – kyselina rozmarýnová



Příloha 17: Hmotnostní spektrum mátového extraktu – theaflavin-3-gallát



Orientační sensorický dotazník

Hodnotitel: Věk:
 Pohlaví: Muž Žena
 Kuřák: Ano Ne

1. část – poznávání druhů čaje podle chuti a vůně

Z následujících 5 bylinkových a 5 ovocných čajů přiřadte podle chuti a vůně druh čaje k příslušnému číslu

Čaje 1 – 5: bylinkové (třezalka, meduňka, heřmánek, máta, mateřídouška)

1.....
2.....
3.....
4.....
5.....

Čaje 6 – 10: ovocné (černý rybíz, citron, ovocná směs, jablko, borůvka)

6.....
7.....
8.....
9.....
10.....

Který čaj Vám nejvíce chutnal (označte číslem):

Z čajů 1- 5.....

Z čajů 6 – 10.....

2. část – sensorické hodnocení čajů (1-10)

Ochutnejte jednotlivé čaje označené čísla a přiřadte každému hodnocení podle následující hodnotící stupnice:

Stupně hodnocení:

vynikající

velmi dobrá

dobrá

dostačující

nedostačující

A. Barva čaje (odpovídá ovoci/bylině, z něhož má být připravena?)

č. čaje	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
hodnocení										

B. Vůně čaje (ovocná/bylinková nebo ne? Příjemná nebo ne)

č. čaje	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
hodnocení										

C. Chuť čaje (celkový dojem)

č. čaje	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
hodnocení										

D. V hodnocených čajích určete (pokud je to možné) intenzitu základních chutí podle přiložené hodnotící stupnice

Základní chutě - sladkost, kyselost, slanost, hořkost

nepatrná

velmi slabá

výraznější

dostí výrazná

silně výrazná

č. čaje	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sladkost										
Kyselost										
Slanost										
Hořkost										