

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2015

PETR POLANSKÝ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav Technologie potravin



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



Antioxidanty v čajích
Bakalářská práce

Vedoucí práce:
RNDr. Eva Dvořáčková, Ph.D.

Vypracoval:
Petr Polanský

Brno 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci **Antioxidanty v čajích** vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval paní RNDr. Evě Dvořákové, Ph.D. za odborné vedení při práci v laboratoři a za připomínky a trpělivost při psaní této bakalářské práce. Také bych chtěl poděkovat panu Aleši Rárovi, který stál u zrodu mého objevování čajového světa.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce pojednává o antioxidantech v čajích. V první části se zabývám popisem čajovníku a čaje. Blíže popisuji zpracování čajových lístků, jejich kvalitu, jejich složení a vliv čaje na lidské zdraví. Ve druhé části popisuji polyfenoly a jejich laboratorní stanovení. V další části se zabývám praktickým měřením celkem 12 čajů, dvou mate a dvou rooibosů. Stanovuji celkový obsah polyfenolů metodou FCM a metodou UHPLC a antioxidační kapacitu metodou TAA. Největší obsahy polyfenolů a největší antioxidační kapacity byly změřeny u oolongů a zeleného čaje Sencha HBO. Nejnižší hodnoty vyšly u obou puerhů, kromě metody UHPLC, kde patřily mezi nejlepší. Mate a rooibosy se obsahem polyfenolů i antioxidační kapacitou přibližovaly například bílému nebo černému čaji.

Klíčová slova: zpracování čaje, kvalita čaje, polyfenoly, Folin-Ciocalteuova metoda, celková antioxidační aktivita, UHPLC

ABSTRACT

This thesis discusses about antioxidants in teas. In the first part I deal with description of a tea tree and a tea. I closely describe processing of tea leaves, their quality, their composition and impact of the tea on human health. In the second part I describe polyphenols and their laboratory determination. In the next part I deal with practical measurements in total of 12 teas, two mate and two rooibos. I determine total content of polyphenols by a method FCM and by a method UHPLC and the antioxidant capacity by a method TAA. The highest content of polyphenols and the highest antioxidant capacity were measured in the oolongs and the green tea Sencha HBO. The lowest results appeared in both puerh, except the results from the method UHPLC, where they belonged among the best ones. Mate and rooibos with their total content of polyphenols and antioxidant capacity approached for example white or black tea.

Key words: tea processing, quality of tea, polyphenols, Folin-Ciocalteu method, Total antioxidant activity, UHPLC

OBSAH

1 ÚVOD.....	8
2 CÍL PRÁCE.....	9
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1 Čaj.....	10
3.1.1 Rozdíly v čaji	10
3.1.2 Druhy čaje	11
3.1.3 Kvalita čaje.....	15
3.1.4 Zdravotní účinky.....	16
3.2 Polyfenoly	17
3.2.1 Flavonoidy	17
3.2.2 Taniny	17
3.2.3 Hlavní polyfenoly v čaji.....	18
3.2.4 Vliv polyfenolů na lidské zdraví	19
3.3 Izolace a analýza polyfenolů	20
3.3.1 Folin-Ciocalteu reagent, kvantitativní metoda	20
3.3.2 Další kvantitativní metody	21
3.3.3 Chromatografie, kvalitativní metoda	22
3.3.4 Total antioxidant activity (TAA)	23
4 PRAKTICKÁ ČÁST	24
4.1 Materiál	24
4.1.1 Vzorky.....	24
4.1.2 Chemikálie	25
4.1.3 Přístrojové vybavení a pomůcky	26
4.2 Metodika.....	26
4.2.1 Příprava vzorků	26
4.2.2 Folin-Ciocalteova metoda.....	27
4.2.3 Metoda Total antioxidant activity	28
4.2.4 UHPLC	28
4.3 Výsledky a diskuse.....	29
4.3.1 Vytvoření kalibrační křivky pro FCM a TAA	29
4.3.2 Porovnání výsledných koncentrací.....	30
5 ZÁVĚR	38
6 POUŽITÁ LITERATURA.....	40
7 SEZNAM OBRÁZKŮ	42

1 ÚVOD

Čaj je výsledek velmi různorodých a také složitých technologických postupů. Na začátku stojí rostlina *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze neboli čajovník, který se v různých krajích různě sbírá. Z čajovníků se sbírají pouze listy nikoliv i větvičky jako například u rooibosu, což je produkt ze zcela jiné rostliny. Když se tedy tyto listy zpracují, výsledkem je čaj. Kvalita čaje záleží na mnoha různých faktorech od pěstování až po přípravu šálku (Soon, 2011).

Na čaj se lze dívat z mnoha různých pohledů. Z pohledu zdravotního pro výzkum ve farmaceutickém průmyslu, z pohledu zdravotního pro jedince, z pohledu chuťového, z pohledu tradičního, což zahrnuje hned několik možných pohledů, dále z pohledu finančního nebo se všechny tyto pohledy dají různě kombinovat a na základě zkoumání se dá třeba říci, který šálek bude zároveň lépe chutnat a zároveň mít příznivější zdravotní účinky. Lidé ovšem pijí výluhy z čajů i z dalších důvodů jako je například fakt, že je čaj posilující a povzbuzující a také, že zahání únavu. Tyto vlastnosti jsou způsobeny zejména díky kofeinu (Soon, 2011; Valter, 2000).

Když vynecháme povzbuzující účinek proti únavě, tak nejen tyto vlastnosti čaje, ale i mnohé další jako například barva nebo tríslovitost (někdy bývá popisována jako hořkost čaje) jsou ovlivněny především některými antioxidanty. Tyto látky se vyskytují téměř ve všech rostlinách, avšak v každé rostlině se nacházejí různé kombinace a jejich jiné poměry. Některé rostliny svým vysokým obsahem antioxidantů převažují všechny ostatní (Soon, 2011).

Pojmem antioxidanty lze označit látky, které ovlivňují jiné látky tak, že je brání před útokem specifických negativně působících podnětů z vnějšího prostředí. Sestávají se z mnoha různých látek od polyfenolů až po některé vitaminy. Každý antioxidant má svou aktivitu, tedy svou sílu bránit ostatní látky (Vermeris, et al., 2006).

Čaj jako komplex těchto antioxidantů, několika vitaminů, silic, tríslovin, kofeinu, theaninu a dalších látek je velmi příznivě působící na lidské zdraví a obranyschopnost. Výluh z čaje je druhým nejvíce konzumovaným nápojem na světě hned po vodě (Dolby, 2002; van der Pijl, et al., 2010).

2 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo vypracování literárního přehledu zaměřujícího se na čaj, polyfenoly v čajích a způsoby stanovení těchto polyfenolů. Dále bylo cílem laboratorně analyzovat různé druhy čajů na obsah polyfenolů a jejich sílu a na základě výsledků zhodnotit kvalitu a rozdíly mezi těmito čaji.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Čaj

Co je to vlastně čaj? Podle Václava Malého, produkčního manažera společnosti Dilmah, která se zabývá pěstováním, zpracováním, vývozem a prodejem čaje, se tedy čajem rozumí zpracované lístky čajovníku (*Camellia Sinensis* (L.) O. Kuntze).

3.1.1 Rozdíly v čaji

Pro každý vědecký výzkum je nezbytný nějaký testovaný subjekt, vzorek. Dále je nutné uvažovat, že každý vzorek je jiný a ještě, že se s časem postupně mění. Je tedy důležité tento vzorek přesně popsat a věnovat se samotnému vzniku daného vzorku.

Každý vyrobený druh čaje například bílý, zelený, černý, oolong a další má jiné vlastnosti, jelikož se dané polyfenoly v čaji během výrobního procesu mění. Některé se oxidují a některé zůstávají stejné. Tyto polyfenoly mění hned několik vlastností čaje. Mění například barvu, vůni, chuť, zdravotní účinek, texturu a hořkost (Soon, 2011).

Čaj představuje obrovskou rozmanitost. Liší se od sebe i například použitým druhem čajovníku. V přírodě existuje čajovník *Camellia Sinensis* jež má tři varianty a sice čínskou (*C. sinensis*), asámskou (*C. Assamica*) a indonéskou (*C. Indonensis*). Čajovník čínský je spíše keř dorůstající 2-3m s menšími, tmavšími lístky. Asámský může dorůst 20-30m s většími, světlejšími lístky. Indonéský se vzrůstem nachází někde mezi nimi. Dorůstá až do výšky 6m. Dále pak samozřejmě existuje nepřeberné množství různých odrůd, klonů nebo hybridů například kvůli požadovaným vlastnostem (odolnost proti suchým obdobím) pro dané prostředí (Valter, 2000).

Minimálně v chuti a vůni je potom rozdíl v různém sběru čajových lístků. V některých částech světa se lístky sbírají modernizovanou mechanickou metodou, která se ukázala být nevhodná, protože od sebe nerozlišuje různé lístky. Každý lístek je jiné kvality a některý může být třeba porušen, napaden nebo může mít nějaký jiný nedostatek, tudíž je ke sběru a následnému zpracování nevhodný (Soon, 2011).

Další možnou odlišností různých čajů je slovo, které se používá i ve vinařství, a sice z francouzštiny vypůjčený termín *terroir*. Tento termín představuje odlišnosti v půdě, počasí, zeměpisné poloze, klimatu, nadmořské výšce, sklonu svahu, lidské

dovednosti a podobně, kde se čajovník pěstuje. Tyto rozdílné podmínky pěstování ovlivňují opět především chuť a vůni zpracovaného čaje, ale nejen je. Například v čím vyšší nadmořské výšce se čajovník pěstuje, tím více obsahuje právě oněch zdraví prospěšných polyfenolů, ale i aminokyselin, minerálních látek, sacharidů atd. Právě díky zvýšenému množství sacharidů mají čaje z Darjeelingu sladší chuť (Soon, 2011).

Existuje nepřeberné množství dalších maličkostí, které představují rozdíly v čajích. Datum sběru, hodina sběru, počasí při sběru, náhoda, kvalifikovanost pracovníků, kvalita samotných čajových lístků, podmínky výroby a odchylky od běžných výrobních postupů a mnoho dalších (Soon, 2011).

3.1.2 Druhy čaje

Čaj se dělí hlavně podle místa původu a zpracování. Dále je možné sledovat velikost lístků zpracovaného čaje.

3.1.2.1 Podle místa původu

O objevení čajovníku existují dvě legendy, jedna čínská a jedna indická. Původně se však čajovník pěstoval pouze v Číně. Dále se uchytil v Japonsku, kam jej přinesli japonští kněží. Oblíbeným se stal i v dalších sousedních zemích Číny jako v Tibetu, Mongolsku, Rusku a v zemích arabských. Ve věku kolonizování světa si Angličané ukradli čajovníky z Číny a začali je pěstovat v Indii. Zjistili ale, že se zde těmto čajovníkům mnoho nedaří. Našli však v přírodě podobnou rostlinu čínskému čajovníku. Byl to čajovník asámský (Valter, 2000).

Dnes se čajovník rozšířil po celém světě: na Cejlon (dnes Šrí Lanku), do Afriky, Turecka, Indonésie, Vietnamu a do dalších zemí (Valter, 2000).

Místo původu ovšem označuje nejen zemi, ale i části země. Mezi ně patří i provincie, plantáže, zahrady, části zahrad, vlastně i to, co z části označuje termín *terroir* (Soon, 2011; Valter, 2000).

3.1.2.2 Podle zpracování

Zpracování čaje záleží na jeho kvalitě a na výrobním postupu daného zpracovatele. Každá kniha pojednávající o zpracování čaje ukazuje poněkud odlišné způsoby zpracování.

Základními produkty ale jsou:

1. čaje nezpracované (bílé)
2. čaje zelené
3. oolong (modrozelené, polozelené)
4. čaje černé (červené)
5. čaje aromatizované, ochucené (Soon, 2011).

Dalšími druhy, které jsou méně známé a také se vyrábějí v menších množstvích a jen v určitých oblastech jsou čaje žluté, čaje Žluté (císařské) a čaj Pu-erh neboli čaj tmavý (Valter, 2000).

Jedna z velkých chyb, co se čaje a jeho zpracování týká, je, že se často zaměňují nebo dokonce uvádí jako totožné pojmy fermentace a oxidace. Proto se někdy oolongům nesprávně říká polofermentované nebo částečně fermentované čaje. Oxidace v čaji vyjadřuje oxidování přirozených látek (většinou polyfenolů) za účasti oxidačních enzymů, které se v lístcích přirozeně vyskytují. Fermentace naproti tomu vyjadřuje určitý typ kysání, kvašení za přítomnosti mikroorganismů (bakterií, plísní). Veškeré čaje při výrobním procesu pouze oxidují, pokud samozřejmě nebyla porušena hygiena výroby. Existuje pouze jedna výjimka, která prochází oběma procesy, čaj Pu-erh (Thomová, et al., 2002).

3.1.2.2.1. Čaje nezpracované (bílé)

Nezpracovaný čaj znamená, že se trhají zejména tipsy, což je pouze vrcholový pupen na koncových větvičkách čajovníku. Tipsy většinou obsahují na svém povrchu drobné vlásky, které dávají čaji stříbrný lesk. Někdy se používají i lístky nižší kvality, ale bílý čaj by měl obsahovat co nejvíce tipsů. Co určuje bílý čaj dále, je technologie zpracování. Bílý čaj je po sběru lístků vůbec nejméně zpracováváný čaj. Proto se někdy nazývá jako nezpracovaný. Hlavně kvůli zcela nehlídané oxidaci sušených lístků, ke které sice může dojít, ale ne v takovém rozsahu jako třeba u čaje černého.

Technologický postup výroby bílého čaje:

- sběr
- třídění
- čištění
- zavadání

- případné tvarování (záleží na křehkosti, kvalitě a také na zpracovateli)
- sušení
- balení a expedice (Soon, 2011; Valter, 2000).

3.1.2.2.2. Čaje zelené

Zelený čaj si zachovává svou původní zelenou barvu a to jak v suchém listu, tak i v nálevu. Pro zelené čaje se používá již všech 5 jakostních tříd čajových lístků. Díky opražení nebo napaření hned po požadovaném zavadnutí lístků se zničí většina enzymů způsobujících oxidaci. Proto si zelený čaj díky tomuto zpracování ponechává i nejvíce původních (přirozených) polyfenolů.

Technologický postup výroby zeleného čaje:

- sběr
- třídění
- čištění
- zavadání
- opražení na pánvi nebo napařování horkou parou
- svinování (tvarování)
- sušení
- balení a expedice (Dolby, 2002; Soon, 2011; Valter, 2000).

3.1.2.2.3. Oolong (modrozelené, polozelené)

Oolong vznikl náhodou, kdy rolník sbírajícího čaj vyděsil had. Proto rolník utekl domů a lístky tam nechal. Když se za několik dní vrátil, lístky na slunci částečně zoxidovaly a rolník si z nich uvařil kupodivu dobrý čajový výluh. Jedná se tedy o čaj částečně oxidovaný, který kombinuje způsoby výroby zeleného a černého čaje. Jméno získal podle výše zmiňovaného hada, kterého si rolník spletl s drakem (oolong = černý drak) Oolongy rozlišujeme podle doby nechané lístkům oxidovat. Může být zoxidován z široké škály procent, většinou (20-60) %.

Technologický postup výroby oolongu:

- sběr
- třídění
- čištění
- zavadání
- svinování

- krátká oxidace (podle požadovaného procenta)
- pražení na pánvi
- sušení
- balení a expedice (Soon, 2011; Valter, 2000).

3.1.2.2.4. Čaje černé (červené)

Černé čaje prochází úplnou oxidací lístků. Základem je hned po zavadnutí lístků jejich svinování. Tím se poruší buněčná struktura a začnou se více uvolňovat enzymy způsobující oxidaci. Občas se jako červené čaje neoznačují čaje černé, ale jiné byliny nebo ovoce, což je opět věc názoru. Avšak historicky se v Číně černým čajům říká červené.

Technologický postup výroby černého čaje:

- sběr
- třídění
- čištění
- zavadání
- svinování
- úplná oxidace
- pražení na pánvi
- balení a expedice (Soon, 2011; Valter, 2000).

3.1.2.2.5. Čaje aromatizované, ochucené

Jedná se o jakýkoliv již zmiňovaný druh čaje, ke kterému bylo něco přidáno. Aromatizovaný čaj obsahuje navíc květy nebo nějakou silici (přírodní či umělou), které čaj navoní. Ochucené obsahují přidané kousky ovoce nebo koření (Thomová, et al., 2002). Například čaj Earl Gray je aromatizován bergamotovou silici (Soon, 2011).

3.1.2.2.6. Speciální čaje

Patří sem čaj žlutý a čaj Pu-erh. Oba tyto čaje jsou výhradně čínskou záležitostí.

Čaj Pu-erh se pěstuje pouze v provincii Yunnan a název dostal podle zdejšího okresního města Pu-erh. Jeho výroba byla uchovávanou a střeženou čínskou tradicí. Dnes je však již jeho výroba poměrně dobře popsána. Jako jediný prochází procesem fermentace, která probíhá velmi dlouho, a znalci čaje popisují, že Pu-erh, který zrál kolem 20 let patří k těm vůbec nejlepším. Vyrábí se podobně jako černý čaj až na konečnou fázi, kdy se čaj nesusí úplně, ale naopak se nechá ještě částečně vlhký právě

fermentovat. Další zvláštností jeho výroby je způsob otáčení lístků při částečném sušení. Suší se venku na slunci, kde jsou čajové lístky otáčeny pomocí bosých nohou Číňanů (Thomová, et al., 2002).

Žlutý čaj je pojmenován podle čínské císařské barvy, žlutá. Dříve byl žlutý čaj určen pouze právě pro císaře. Vyrábí se jako čaj zelený, ale místo rychlého sušení na konci výrobního procesu se suší v několika centimetrové vrstvě po dlouhou dobu. Tím dochází k částečné lehké oxidaci, při které získává žlutý čaj svou jedinečnou chuť. Občas lze ještě nalézt rozlišení mezi žlutým a Žlutým čajem. Čaj žlutý je popsán výše a jako čaj Žlutý se může označit jakýkoliv druh čaje, který je tak kvalitní a dobrý, že by mohl být podán císaři (Thomová, et al., 2002).

3.1.2.3 Podle velikosti listu čaje

Čaje dělíme na celolisté (whole leaf), zlomkové (broken) a drcené, práškovité (fannings, dust). Nejlepší a nejkvalitnější bývají nejčastěji čaje celolisté. Existují však výjimky jako čaj matcha (používaný při japonském čajovém obřadu zvaném chanoju), který se vyrábí rozemletím na prášek toho nejkvalitnějšího japonského čaje gyokura. (Valter, 2000) Dále existuje moderní nešetrná metoda na zpracování černého čaje mechanizací nazývaná CTC (crush, tear, curl = drtit, trhat, svinovat). Jedná se čistě o strojové zpracování, snad kromě ručního sběru, které čerstvé čajové lístky vhozené do stroje nejprve rozdrtí, kvůli umožnění oxidace, a poté je natrhá a svine do požadovaných tvarů. Celý proces včetně oxidace probíhá ve stroji. Tato metoda je velice rychlá a levná, avšak takto vyrobené čaje nejsou příliš kvalitní a používají se především na výrobu méně kvalitních sáčkových čajů (Thomová, et al., 2002).

3.1.3 Kvalita čaje

Kvalitní lístky by se měly sbírat za suchého počasí. Čím čerstvější čaj, tím lépe (Valter, 2000).

Velmi záleží na ročním období sběru neboli flush. Z prvního sběru (zkratkou FF z anglického first flush), který se sbírá hned z jara po vyrašení pupenů, má čaj největší zdravotní potenciál. Čaje z druhého sběru (zkratkou SF z anglického second flush) a třetího sběru (zkratkou TF z anglického third flush) sbírané v létě a na podzim mají více aromatických látek a jsou silnější v chuti (Valter, 2000).

Asi nejdůležitějším faktorem kvality čaje je jakost původní suroviny tedy čajového listu. Z čajového keře nebo stromu se sbírá pouze prvních pět horních lístků na každé vrcholové větvičce. Každý lístek má své jméno a jakostní kategorii. Pro kvalitní čaje se sbírají pouze první tři lístky nebo méně. Čtvrtý a pátý lístek se již považuje za méně kvalitní s nižším obsahem aromatických, chuťových a blahodárných látek. Sbírá se tudíž jen do levnějších, méně kvalitních čajů. První lístek se jmenuje pupen (tip). Jde vlastně o ještě nerozervřený lístek. Druhý je orange pekoe, třetí pekoe, čtvrtý pekoe souchong a pátý souchong. Šestý lístek zvaný congou by se již neměl sbírat. Tedy čím menší, vrcholovější lístek, tím vyšší kvalita (Thomová, et al., 2002; Valter, 2000).

Na Šrí Lance, v Indii a v Keni se k čajům dále přiřazuje určitá zkratka vyjadřující kvalitu a jemnost lístků. Občas ji lze vidět i u čajů z jiných zemí. Jde vlastně o vyjádření kvality obsahu a typu lístků čaje v balení. Dále nám může říci, o jakou velikostní třídu čaje se jedná (celolisté, zlomkové, drcené, práškovité, CTC). Například FF SFTGFOP I (nebo 1) znamená first flush, special finest tippy golden flowery orange pekoe Imperial. Obecně se dá říci, že čím delší zkratka, tím lepší kvalita (Valter, 2000).

3.1.4 Zdravotní účinky

Léčivé a posilující účinky čaje jsou známy již přes 4000 let. Čajovník obsahuje antioxidačně silnější polyfenoly než je třeba vitamin C a E. Navíc obsahuje i vitamin C, B₂, D, K a beta-karoten. Jsou v něm také minerály jako selen, mangan a hlavně fluorid (Dolby, 2002; Vinson, et al., 1998). Dále obsahuje silice, kofein, theanin, pryskyřičné látky, vosky a cukry (Valter, 2000; van der Pijl, et al., 2010).

Komplex těchto látek, nejlépe pokud jsou v původním stavu (čerstvý), mají hned několik blahodárných účinků na lidské zdraví. Působí jako prevence rakoviny. Bylo provedeno několik odborných pozorování několika skupin lidí, kde ti, kteří pili čaj, měli menší procento výskytu rakoviny. Působí příznivě na kardiovaskulární systém. Snižuje hladinu LDL cholesterolu a vyrovnává krevní tlak. Má preventivní účinky proti mrtvici. Působí antibakteriálně. Posiluje imunitní systém. Byly provedeny laboratorní testy na umělém chrupu, z nichž vyšlo následující: zabraňuje vzniku zubního kazu, posiluje a fluorizuje zubní sklovinu. Zabraňuje uchycení bakterií na povrchu zubu. Posiluje dásně. Díky všem těmto příznivým vlastnostem zlepšuje a zkvalitňuje život člověka (Dolby, 2002; Rosen, 2000; Vermerris, et al., 2006).

3.2 Polyfenoly

Fenoly jsou látky, na jejichž aromatickém jádru (benzenu) je napojena jedna nebo více hydroxylových skupin. Polyfenoly se pak nazývají látky, které obsahují několik aromatických jader s navázanými hydroxyly. Polyfenoly se přirozeně vyskytují v rostlinách. Častěji než volné se však vyskytují ve formě esteru nebo glykosidu. Fenoly respektive polyfenoly jsou podobné alkoholům. Na rozdíl od nich se však chovají jako slabé kyseliny díky labilnímu vodíku na hydroxylu. Tuto labilitu způsobuje přítomnost aromatického jádra (Vermerris, et al., 2006).

Polyfenoly se dají různě rozdělit. Mohou se dělit například podle toho, jak často se vyskytují na často se vyskytující, méně často se vyskytující a polymery. Nebo se dají rozdělit do skupin podle počtu uhlíků v molekule. Mezi nejznámější skupiny patří kumariny, flavonoidy, biflavonyly, betakyaniny, lignany, lignin a taniny. Nejrozšířenější polyfenoly v čaji jsou flavonoidy a taniny (Vermerris, et al., 2006).

3.2.1 Flavonoidy

Flavonoidy obsahují 15 uhlíků v molekule. Dále se dělí do tří skupin na chalkony, aurony a flavonoidy. Chalkony a aurony se vyskytují jako žlutý pigment v rostlinách. Flavonoidy se dále dělí. Flavan-3-oly (například katechin, který je základní jednotkou polyfenolů čaje) se řadí mezi flavonoidy (Vermerris, et al., 2006).

3.2.1.1 Flavonoidy

Flavonoidy obsahují 3 benzenová jádra. Dělí se na několik skupin, z nichž každá má nějak pozměněnou molekulu nebo obsahují jiné substituenty. Mezi flavonoidy patří flavonony, flavononoly, leukoantokyanidiny, flavony, antokyanidiny a deoxyantokyanidiny a antokyany (Vermerris, et al., 2006).

3.2.2 Taniny

Mezi taniny patří látky, které mají schopnost vázat a srážet proteiny. Tohoto se využívá například při výrobě vína a piva. Taniny často bývají označovány jako tříslovinny. Můžeme je dělit na tři další skupiny (Vermerris, et al., 2006).

3.2.2.1 Kondensované taniny

Skládají se z katechinových (flavan-3-ol) jednotek. Jedná se tedy o oligomerní nebo polymerní flavonoidy. Jsou to složité molekuly, na jejichž polymeraci se podílejí kyseliny nebo enzymy. Stupeň polymerace má vliv na srážení proteinů. Způsobují tzv. suchý pocit v ústech obzvláště u vysoce taninových (tříslovitých) červených vín (Vermerris, et al., 2006).

3.2.2.2 Komplexní taniny

Komplexní taniny jsou velmi komplexní, složité molekuly. Obsahují glykosidickou vazbu, která spojuje katechiny a ellagitanniny nebo gallotaniny dohromady. Tyto taniny vznikají například během stárnutí vína v dubových sudech. Jedna z jejich funkcí je chránit DNA buněk, čímž zabraňují vzniku rakoviny (Vermerris, et al., 2006).

3.2.2.3 Taniny podléhající hydrolyze

3.2.2.3.1. Gallotaniny

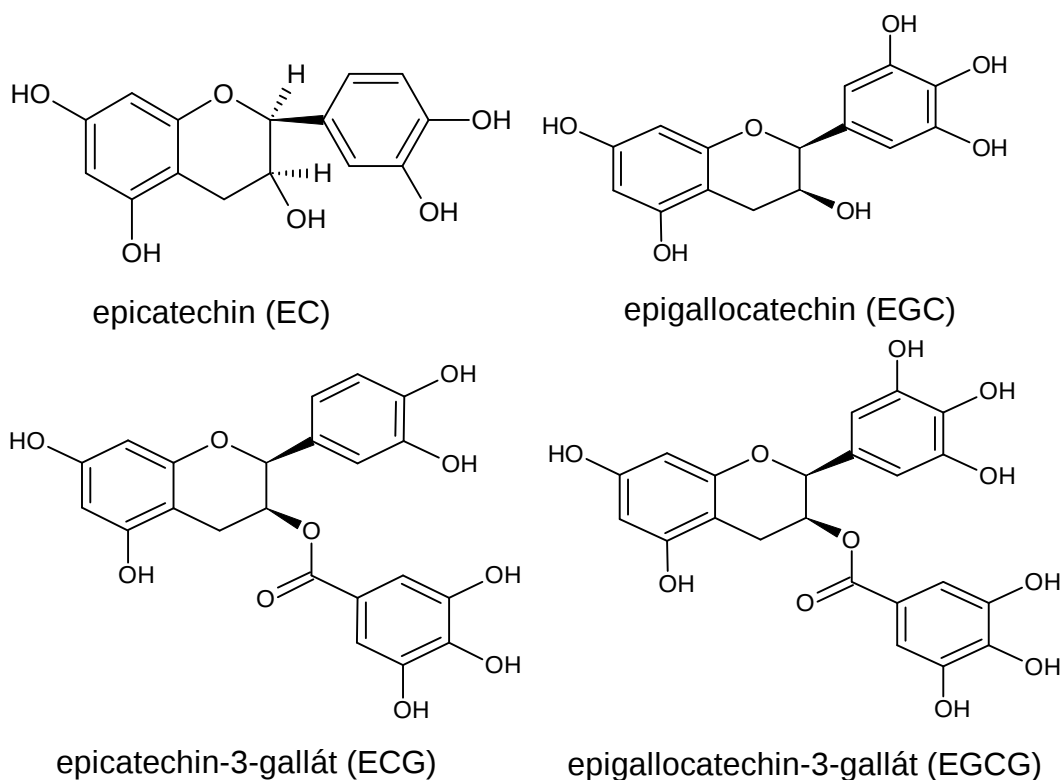
Jsou to hydrolyzovatelné taniny, které obsahují polyolové jádro a zbytky gallové kyseliny. Polyolové jádro může být například D-glukosa (Vermerris, et al., 2006).

3.2.2.3.2. Ellagitaniny

Ellagitaniny jsou odvozeny od gallotaniinů, ale na rozdíl od nich mají propojené dva sousedící zbytky gallové kyseliny navázané na polyolové jádro. Opět jsou hydrolyzovatelné (Vermerris, et al., 2006).

3.2.3 Hlavní polyfenoly v čaji

Mezi hlavní polyfenoly zeleného čaje patří epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin-3-gallát (ECG) a epigallocatechin-3-gallát (EGCG). Během výrobního procesu černého čaje se potom některé přemění na polyfenoly theaflavin a thearubigin. Vzhledem k této oxidaci nemá černý čaj takové pozitivní účinky jako čaj neoxidovaný. Z polyfenolů tedy čaj obsahuje především flavonoidy a taniny (Vermerris, et al., 2006; Wang, et al., 2012).



Obrázek 1: Chemické vzorce epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin-3-gallát (ECG) a epigallocatechin-3-gallát (EGCG), upraveno v ACD/ChemSketch podle předlohy z (Vermerris, et al., 2006)

3.2.4 Vliv polyfenolů na lidské zdraví

Polyfenoly můžeme zařadit mezi látky zvané antioxidanty. Ty jsou známy svými pozitivními účinky na lidské zdraví. Jeden z těchto účinků je antiseptické (antibakteriální) působení. Například se ukázalo, že pozitivně působí proti pupínkům, které vznikají mikrobiální činností tzv. zánět. Tímto tedy napomáhají přirozené obranyschopnosti. Některé mohou absorbovat škodlivé sluneční záření při opalování (Vermerris, et al., 2006).

Jak vlastně antioxidanty fungují? Během metabolismu, ale i v našem okolí, přirozeně vznikají radikály, které obsahují volný (nepárový) elektron. Tyto radikály jsou velice reaktivní a mohou způsobit oxidační změnu molekul buněk. Takto poškozené buňky potom neplní svou funkci a může dokonce dojít ke vzniku rakoviny. Antioxidanty jsou látky, které mají schopnost tyto radikály vychytávat a zneškodňovat. Zneškodňování funguje tak, že se antioxidanty namísto jiných molekul samy oxidují a tím zbaví radikál volného elektronu. Mezi nejznámější antioxidanty patří vitamin C a

vitamin E. Dále se k antioxidantům řadí fenoly s antioxidační schopností, které se přirozeně vyskytují v rostlinách. V hojném množství jsou zastoupeny v ovoci, v zelenině a v koření (Velíšek, a další, 2009; Vermerris, et al., 2006).

Antioxidanty mají pozitivní vliv na kardiovaskulární systém. Zvyšují pružnost cév, snižují hladinu LDL cholesterolu, snižují riziko infarktu a riziko dalších srdečních onemocnění. Ukázalo se, že polyfenoly obsažené ve víně mají pozitivní synergický efekt s alkoholem vína. Vitamin E například zabraňuje negativní oxidaci lipidů. Antioxidanty mohou pozitivně působit i proti mykotoxinům. Celkově působí jak preventivně, tak léčivě (Vermerris, et al., 2006). Snižují riziko výskytu rakoviny v celém těle, ale mohou i pozitivně působit při její léčbě (Dolby, 2002).

3.3 Izolace a analýza polyfenolů

Jako první se musí (poly)fenoly vyextrahovat ze substrátu. Rozpustné polyfenoly z rostlin se dají jednoduše izolovat 70% methanolem nebo methanolem okyseleným pomocí 0,1% HCl. Dá se také použít aceton, ethanol nebo dimethylformamid. Můžeme ale také použít obyčejnou vodu, abychom zjistili množství polyfenolů právě třeba v čajovém nálevu. Degradace polyfenolů ve vzorku je urychlena při extrakci horkým roztokem nebo přímým slunečním zářením. Právě proto je vhodnější extrakci provádět za snížené teploty a v temnu. Když jsou polyfenoly vyextrahované, můžeme provést kvantitativní (kolik obsahuje) a kvalitativní (co obsahuje) analýzu či zjistit jejich účinnost (antioxidační kapacita). K tomuto účelu existuje hned několik metod (Stodt, et al., 2013; Vermerris, et al., 2006).

3.3.1 Folin-Ciocalteu reagent, kvantitativní metoda

Tato metoda zkráceně zvaná FCR byla vyvinuta a publikována pány Folinem a Ciocalteuem v roce 1927. Byla upravena z původní metody, kterou vymyslel pan Folin a pan Denis v roce 1912, která analyzovala aminokyselinu tyrosin. Upravenou metodou můžeme zjistit koncentraci rozpuštěných polyfenolů jako antokyanů, komplexních taninů nebo hydrolyzovatelných taninů (Vermerris, et al., 2006).

Metoda je založena na redukci WO_4^{2-} a MoO_4^{2-} iontů pomocí hydroxylových skupin polyfenolů. Za přítomnosti Na_2CO_3 vzniká modré zabarvení směsi. Sytost tohoto zabarvení se potom stanoví jako absorbance získaná ze spektrofotometru při vlnové délce 750nm (Vermerris, et al., 2006) nebo 765nm (Stodt, et al., 2013) na blank metha-

nol nebo vodu nebo ethanol podle původního použitého rozpouštědla. Ze získané absorbance se stanoví koncentrace polyfenolů ve vzorku. Tato koncentrace se vypočítá z křivky absorbancí získaných z redukce Folin-Ciocalteu činidla a gallové kyseliny o známých koncentracích (kalibrační závislost). Pomocí této metody tedy můžeme zjistit celkové množství polyfenolů ve vzorku (Stodt, et al., 2013; Vermerris, et al., 2006).

Používání FCR se často podceňuje, avšak jiným metodám se svou kvalitou vyrovná (Vermerris, et al., 2006).

3.3.2 Další kvantitativní metody

Další metody se zaměřují na stanovení pouze určité skupiny polyfenolů. Jsou tedy více kvalitativní, avšak konkrétní polyfenoly nestanoví.

3.3.2.1 Stanovení kondensovaných taninů

Pomocí různých rozpouštědel a podmínek metody můžeme stanovit množství pouze kondensovaných taninů ve vzorku. Můžeme například použít butanol s HCl jako rozpouštědlo a přídavek heptahydrátu síranu železnatého. Nebo můžeme použít vanilin v kyselém prostředí. Tyto metody jsou kolorimetrické. V obou případech vzniká barevný roztok, z jehož absorbance a kalibrační závislosti standardu se vypočítá koncentrace kondensovaných taninů. Také můžeme využít srážení kondensovaných taninů s formaldehydem. U této metody se nejprve zjistí celkové množství polyfenolů pomocí FCR, poté se přes noc nechá vzorek srážet s formaldehydem. Ráno se zjistí množství nesrážených polyfenolů pomocí FCR a odečtením těchto hodnot zjistíme množství kondensovaných taninů (Vermerris, et al., 2006).

3.3.2.2 Stanovení gallotaninů

Stejně jako v minulém odstavci, ovšem za použití jiných rozpouštědel a podmínek, můžeme stanovit obsah gallotaninů ve vzorku. Například reakcí gallotaninů s jodičnanem draselným vzniká žluté zabarvení směsi, které se vyhodnocuje spektrofotometricky při 550nm. Požitím rhodaninu, který reaguje s gallovou kyselinou, vzniká červené zabarvení. Opět se vyhodnocuje spektrofotometricky (Vermerris, et al., 2006).

3.3.2.3 Stanovení ellagitaniinů

Reakcí dusitanu sodného s ellagitanimy ve vodném prostředí vzniká modré zabarvení směsi se vzorkem, které se vyhodnotí na spektrofotometru (Vermerris, et al., 2006).

3.3.3 Chromatografie, kvalitativní metoda

Kvalitativními metodami zjišťujeme jaké dané látky se ve vzorku nacházejí. Na určení jednotlivých polyfenolů se nejčastěji používají různé druhy chromatografie. Můžeme použít chromatografii tenkovrstvou, u které se na destičku potaženou sorbentem (stacionární fáze) pohybuje pomocí kapalné (mobilní) fáze nanesený vzorek a z uražené vzdálenosti a retardačního faktoru se určí, o jakou látku se jedná. Jde o poněkud rychlou, jednoduchou a levnou metodu (Vermerris, et al., 2006).

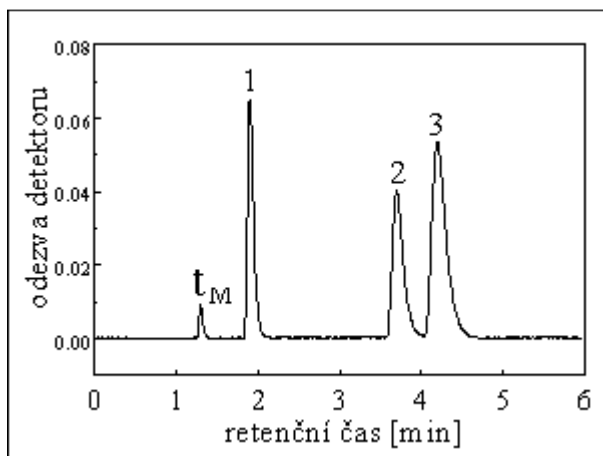
Další typ chromatografie může být plynová chromatografie. Ta využívá jako stacionární fázi nějaký sorbent nanesený v tenké vrstvě v trubici, na který se nanese vzorek. Jako mobilní fáze, která s sebou trubicí unáší vzorek, se použije plyn. Detektor na konci trubice zachytí mobilní fázi a poté mobilní fázi s uneseným vzorkem. Na základě doby průchodu trubicí se pak stanoví retenční čas, podle kterého se určí, o jakou látku se jedná. Tato metoda se dá použít i jako kvantitativní (Vermerris, et al., 2006).

3.3.3.1 UHPLC

Jedná se o další typ chromatografie a sice o chromatografii kapalinovou. Zkratka UHPLC, která vychází z angličtiny, znamená Ultra High-Performance Liquid Chromatography česky tedy ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie.

Je to metoda, která je principiálně podobná předchozím, ale může být rychlejší. Principiální rozdíl je v tom, že mobilní fáze je kapalina. Rychlejší může být proto, že stroj obsahuje vysokotlaké čerpadlo mobilní fáze. Díky tomu je mobilní fáze rychleji tlačena tenkou trubicí (kolonou) obsahující stacionární fázi a vzorek. Vzorek, nanesený automatickým dávkovačem, je unášen mobilní fází ke konci trubice, kde je následně zachycen a vyhodnocen na detektoru. Detektor samotný může být například spektrofotometr nebo hmotnostní spektrometr nebo jiný. Na připojeném počítači se poté objeví eluční křivka obsahující píky. Z retenčních časů ve vrcholech daných píků můžeme ur-

čit jednotlivé polyfenoly. Plocha pod píkem pak určuje obsah daného polyfenolu ve vzorku (Stodt, et al., 2013; Vermerris, et al., 2006).



Obrázek 2: Příklad chromatogramu (Coufal, 1996)

3.3.4 Total antioxidant activity (TAA)

Tato metoda bývá také označována jako Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). Významem této metody je zjistit, kolik volných radikálů jsou polyfenoly ve vzorku schopny vychytat uvolněnými vodíkovými kationty. Jako radikál se používá roztok radikálkationtu $ABTS^{*+}$. Tento radikál se dá připravit následovně: 5 ml 7 mmol/l roztoku ABTS se smíchá s 88 μ l 140 mmol/l persulfátu draselného a nechá se stát ve tmě 12 hodin. Vznikne barevný roztok, který se potom smíchá se vzorkem. Vzhledem ke zpětné redukci $ABTS^{*+}$ na ABTS se roztok postupně odbarvuje až do určité sytosti. Takže čím větší antioxidační kapacita polyfenolu, tím více se roztok odbarví. Na spektrofotometru se změří absorbance vzniklého roztoku při 734nm. Jako standard pro vytvoření kalibrační křivky se používá roztok troloxu s koncentrací v řádech mmol/l. Výsledná schopnost polyfenolů vychytávat radikály (antioxidační kapacita) se vyjadřuje ekvivalentem ke standardu tj. v mmol/l troloxu. To znamená, že 1 mmol/l troloxu odpovídá 1 mmol/l polyfenolů (Carloni, et al., 2013; Rusak, et al., 2008).

4 PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Vzorky

Na laboratorní měření jsem použil 5 různých druhů čajů. Od každého druhu jsem potom vzal dva rozdílné čaje. Všechny čaje jsem zakoupil v čajovně U Půlměsíce, která odebírá zboží z internetového obchodu Amana. Čaje jsem převzal v celolistovém stavu v uzavřených papírových obalech, do kterých byly přesypány z velkých nádob, kromě Tie Guan Yin. Celkem jsem zkoumal 10 čajů, 2 rooibosy a 2 mate.

4.1.1.1 Bílé čaje

- Pai Mu Tan (Bílá pivoňka), čínský, na čaji je vidět, že obsahuje více ochmýřených tipsů než Shou Mee
- Shou Mee (Obočí dlouhého věku), čínský

4.1.1.2 Zelené čaje

- Lung Ching (Dračí studna), jeden z nejznámějších a nejlepších čínských zelených čajů (Valter, 2000)
- Sencha HCO (bio), japonský, druhý nejvíce rozšířený čaj v Japonsku (Valter, 2000)

4.1.1.3 Oolongy

- Tie Guan Yin (Železná bohyně), patří mezi čínské lehce oxidované oolongy (Valter, 2000), na pohled má zelenější lístky než Phoenix Tang Chung, jako jediný byl zakoupen v originálním hermeticky uzavřeném 50g balení
- Phoenix Tang Chung, čínský, z listu je patrné, že je více oxidován, než Tie Guan Yin

4.1.1.4 Černé čaje

- Darjeeling, pochází z horské oblasti v Indii, má typickou vysokohorskou citrusovou vůni, bez uvedení kvality listu typické pro indické čaje
- Ceylon Yalta, pochází ze Šrí Lanky, list má tmavší barvu než Darjeeling, opět bez uvedení kvality listu

4.1.1.5 Pu-erh, tmavý čaj

- King Pu-erh, nelisovaný, čínský, vyšší třída a dražší než klasický Pu-erh, list má menší než klasický Pu-erh, cítím vyzrálější, příjemněji zatuchlejší vůni než u klasického Pu-erhu
- Pu-erh klasik, nelisovaný, čínský

4.1.1.6 Rooibos a mate

V téže čajovně jsem zároveň zakoupil rooibos oxidovaný (Rooibos super grade) a neoxidovaný (Rooibos zelený) a dále pak mate nepražené (Mate Rancho) a pražené (Mate Pampero). Obě tyto zpracované rostliny nepocházejí z čajovníku, avšak jsou v čajovnách vedle čajů často nabízeny. Rooibos pochází z keře *Aspalathus linearis* a mate ze stromu *Ilex paraguariensis* (Soon, 2011).

4.1.2 Chemikálie

Pro stabilizaci vzorků jsem použil L-askorbovou kyselinu (vitamin C).

Na Folin-Ciocalteovu metodu jsem použil tyto chemikálie: Folin-Ciocalteuův reagent FCR 10krát zředěný (fosfowolframato-fosfomolybdatový komplex pravděpodobného složení $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}/(\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{HCl}$), gallová kyselina 1 mmol/l (3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina), uhličitan sodný 7,5% (Na_2CO_3).

Pro zjištění antioxidační kapacity metodou TAA jsem použil ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzo-thiazolin-6-sulfonátu)), persulfát draselný ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), fosfátový pufr ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} + \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{NaCl}$), trolox 1 mmol/l (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina).

Na využití UHPLC jsem si připravil vzorky pomocí SPE (solid-phase extraction) kolonek, u kterých jsem použil 100% a 5% methanol (CH_3OH) a kyselinu chlorovodíkovou 6 mol/l (HCl). Pro samotné měření polyfenolů metodou UHPLC jsem použil gradient acetonitril-voda s přidavkem 0,8% mravenčí kyseliny při velikosti nástriku 5 μl .

4.1.3 Přístrojové vybavení a pomůcky

4.1.3.1 Přístroje a stroje

Pro přípravu vzorků a pro laboratorní stanovení jsem použil tyto přístroje: laboratorní analytické váhy s přesností na desetitisíciny gramů, laboratorní vařič, lednici, spektrofotometr Genesys 100 UV-VIS (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), systém UHPLC (Knauer Platin Blue, Berlin, Germany) spojený s PDA detektorem, přístroj na SPE.

4.1.3.2 Pomůcky

Všechny pomůcky, které jsem použil: Erlenmayerovy baňky, lžičky, kádinky, fix na popisování, filtrační aparatura (nálevka, skládaný filtr, tyčinka, vialka), vialky na vzorky, minivialky, stojan na zkumavky, zkumavky, mikropipety různých objemů, špičky na pipety, kolonky na SPE Strata-X 1ml/30mg.

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava vzorků

Co nejlépe připravený vzorek je základní předpoklad pro kvalitní a důvěryhodné výsledky následujících pokusů. Výsledky také musí být porovnatelné, a jelikož se příprava různých druhů čajů, maté a rooibosu (dále jen materiál) může lišit podle kulturních nebo jiných zvyklostí, rozhodli jsme se s vedoucí mé práce pro přípravu vzorků ve dvou různých teplotních podmínkách. Každý materiál jsem tedy použil dvakrát. Jednou proběhla extrakce při 80 °C, což jsme zvolili jako zlatý střed, aby nebyla teplota u některých čajů ani příliš vysoká ani příliš nízká. Podruhé proběhla při 8 °C, abychom zjistili, zda materiály poskytnou obsahově bohaté i maceráty a nejen nálevy. Každý pokus jsem pro stanovení průměrné hodnoty výsledku opakoval 3krát. Celkem jsem měl tedy 84 vzorků.

4.2.1.1 Vážení materiálu

Pro vážení materiálu jsem použil laboratorní analytické váhy. Navažoval jsem vždy přibližně 2 g s přesností na desetitisíciny gramu. Ze tří různých navážek jednotlivého materiálu jsem nepočítal aritmetický průměr a nevyhodnocoval směrodatnou

odchylku, protože jsem prováděl samostatný pokus pro každou navážku zvlášť. Pro vyhodnocování výsledku pokusu jsem tedy vždy použil hodnotu dané navážky.

4.2.1.2 Extrakce

Navážené vzorky jsem přesypal do Erlenmayerových baněk. Přidal jsem k nim půl malé laboratorní lžičky kyseliny L-askorbové a 40 ml vytemperované destilované vody. Při 80 °C extrakci jsem přiléval horkou vodu předem ohřátou na laboratorním vařiči. Dále jsem nechal vzorky při pokojové teplotě 24 hodin. Při 8 °C extrakci jsem přiléval vychlazenou vodu z lednice, kam jsem následně tyto vzorky uložil na 24 hodin.

4.2.1.3 Filtrace

Po 24 hodinovém luhování jsem vzorky zfiltraval přes skládaný filtr přímo do vialky.

4.2.2 Folin-Ciocalteova metoda

Metodika této analýzy je upravena podle metodiky uvedené v Medina, et al., (2011).

4.2.2.1 Příprava standardu

Do 6 zkumavek jsem pomocí mikropipet napipetoval 500 µl FCR. Poté jsem postupně přidal (0, 20, 40, 60, 80, 100) µl 1mmol/l gallové kyseliny a (100, 80, 60, 40, 20, 0) µl destilované vody. Zkumavky jsem protřepal a nechal 10 minut stát. Nakonec jsem do každé přidal 400 µl 7,5% Na₂CO₃ a nechal stát 30 minut.

4.2.2.2 Příprava vzorku

Každý zfiltrovaný vzorek jsem si nejdříve 10 krát naředil destilovanou vodou. Poté jsem do prázdné zkumavky napipetoval 500 µl FCR, 20 µl naředěného vzorku a 80 µl destilované vody. Zkumavku jsem protřepal a nechal stát 10 minut. Následně jsem přidal 400 µl 7,5% Na₂CO₃ a nechal stát 30 minut.

4.2.2.3 Spektrofotometrické měření

Pro následné vyhodnocení vzorků jsem musel změřit absorbanci standardů a vzorků po výše uvedeném 30 minutovém odstání. Absorbanci jsem měřil na spektrofotometru.

tometru při 765 nm. Jako blank jsem použil zkumavku z kalibrace s nulovou koncentrací gallové kyseliny.

4.2.3 Metoda Total antioxidant activity

Postup této metody je upraven podle metodiky uvedené v Re, et al., (1999).

4.2.3.1 Příprava standardu

Do 6 zkumavek jsem napipetoval 950 μ l ABTS^{*+} zředěný fosfátovým pufrům 1:18 kvůli pufrací schopnosti a snížení intenzity barvy. Potom jsem postupně přidával (0, 10, 20, 30, 40, 50) μ l troloxu a doplňující množství (50, 40, 30, 20, 10, 0) μ l destilované vody. Zkumavky jsem protřepal a nechal 20 minut stát.

4.2.3.2 Příprava vzorku

Každý zfiltrovaný vzorek jsem si musel naředit destilovanou vodou v různých poměrech kvůli vhodnému spektrofotometrickému měření. Do prázdné zkumavky jsem napipetoval 950 μ l ABTS^{*+} (stejný jako u standardu), 20 μ l zředěného vzorku a 30 μ l destilované vody. Zkumavku jsem protřepal a nechal stát 20 minut.

4.2.3.3 Spektrofotometrické měření

Absorbanci standardů a vzorků jsem měřil na spektrofotometru při 734 nm po zmíněném 20 minutovém odstání. Jako blank jsem použil fosfátový pufr.

4.2.4 UHPLC

Následující metodika pro SPE je upravena podle Inbaraj, et al., (2010).

Každý vzorek jsem si nejprve okyselil 50 μ l 6 mol/l HCl. Poté jsem připravil vzorky pomocí SPE (extrakce na pevném sorbentu) tak, že jsem nejdříve pročistil kolonky 1 ml 100% methanolu, dále jsem je propláchl 1 ml destilované vody, dále jsem do nich napipetoval po 1 ml okyselených vzorků a pročistil 1 ml 5% methanolu. Takto pročištěné vzorky jsem extrahoval 1 ml 100% methanolu a extrakty jsem převedl do minivialek.

Metodika použitá pro UHPLC byla vyvinuta laboratoří vedoucí mé práce RNDr. Evou Dvořáčkovou, PhD a kolektivem.

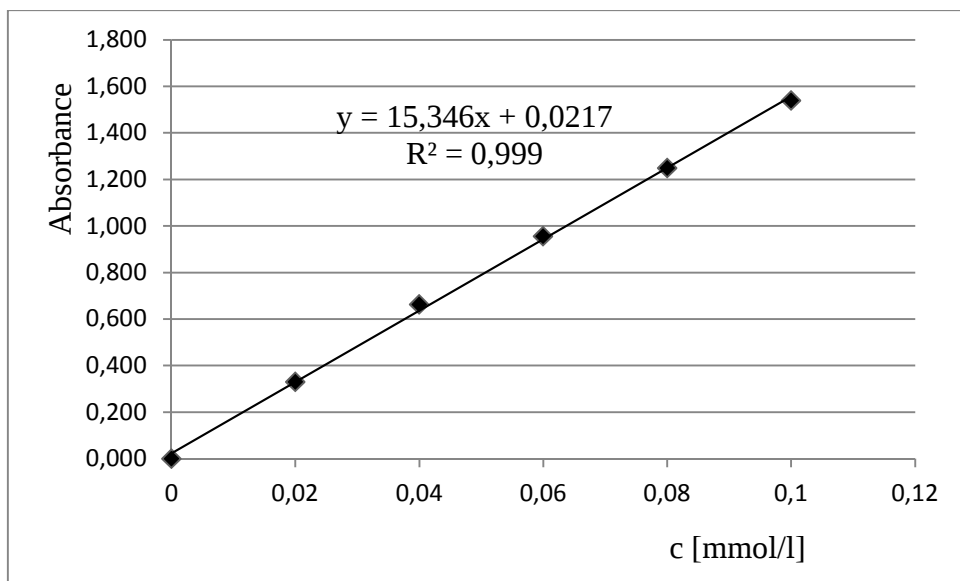
Minivialky s extrakty jsem vložil do UHPLC stroje, který využil gradient acetonitril-voda: (A - octová kyselina/B - acetonitril) 0.0 min – 90/10; 1.0 min – 92/8; 1.1-4.0 min – 97/3; 5.0-8.9 min – 92/8; 9.0-13.0 min – 89/11; 13.6-15.5 min – 65/35; 16.0-18.0 min – 90/10. Použitá kolona byla Kinetex C18 column (I.D. 4,6 mm × 100 mm, 2,6 µm, Phenomenex). Jednotlivé polyfenoly zjistil PDA detektor s vlnovými délkami 270, 290, 310 a 324 nm.

4.3 Výsledky a diskuse

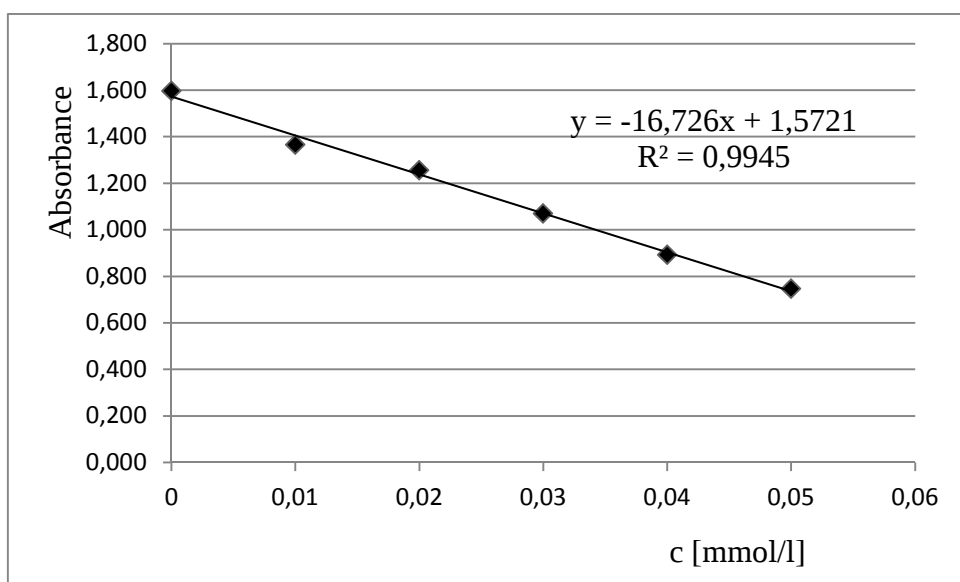
4.3.1 Vytvoření kalibrační křivky pro FCM a TAA

Pro stanovení celkového množství polyfenolů v různých materiálech jsem použil metodu FCM. Aby byla metoda použitelná, musí se použít standardu, který simuluje polyfenoly. Jako tento standard jsem použil gallovou kyselinu o koncentraci 1 mmol/l. Pomocí známých koncentrací gallové kyseliny v jednotlivých zkumavkách pro kalibraci a pomocí jejich naměřených absorbancí jsem vytvořil kalibrační přímku. Jednu kalibrační přímku jsem použil na výpočet pouze čtyř daných materiálů o dané teplotě, aby kalibrace každý den odpovídala čerstvosti použitého činidla FCR. Celkem jsem tedy vytvořil sedm kalibrací.

Metodou Total antioxidant activity (TAA) jsem stanovoval antioxidační kapacitu ve vzorcích. Pro tuto metodu jsem jako standard použil trolox (hydrofilní forma tokoferolu), který simuluje antioxidant. Známé koncentrace troloxu v jednotlivých zkumavkách pro kalibraci a jejich naměřené absorbance jsem použil pro vytvoření kalibrační přímku. Jednu kalibrační přímku jsem opět použil na výpočet pouze čtyř daných materiálů o dané teplotě, abych zajistil přesnou kalibraci, která každý den odpovídá čerstvosti použitého činidla ABTS^{*+}. Celkem jsem vytvořil sedm kalibrací.



Obrázek 3: Příklad kalibrační přímky pro FCM

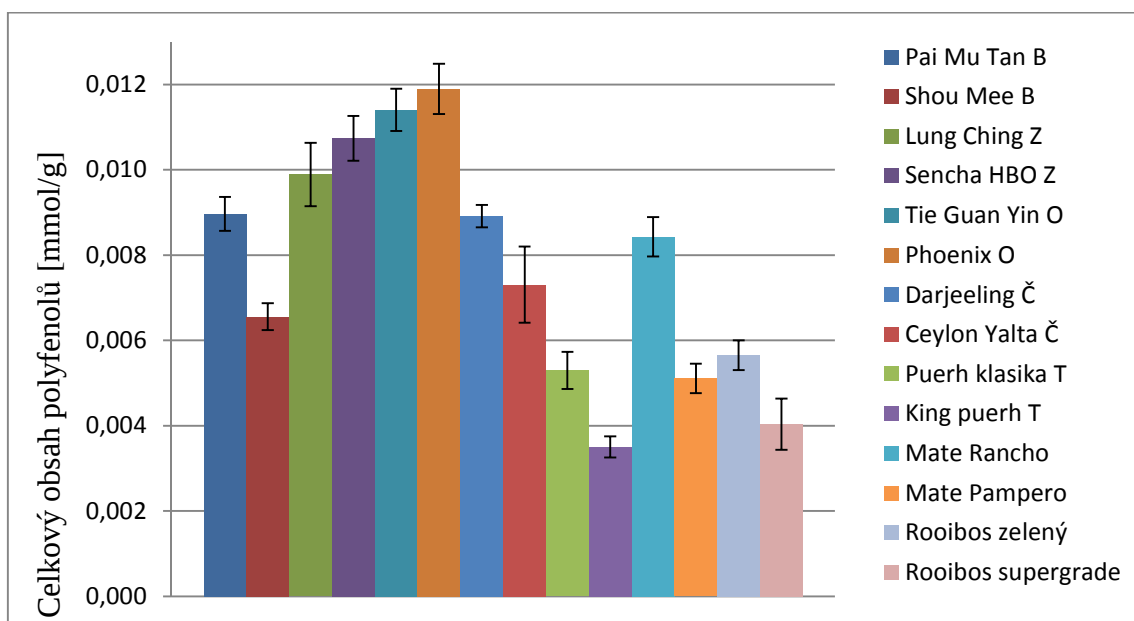


Obrázek 4: Příklad kalibrační přímky pro TAA

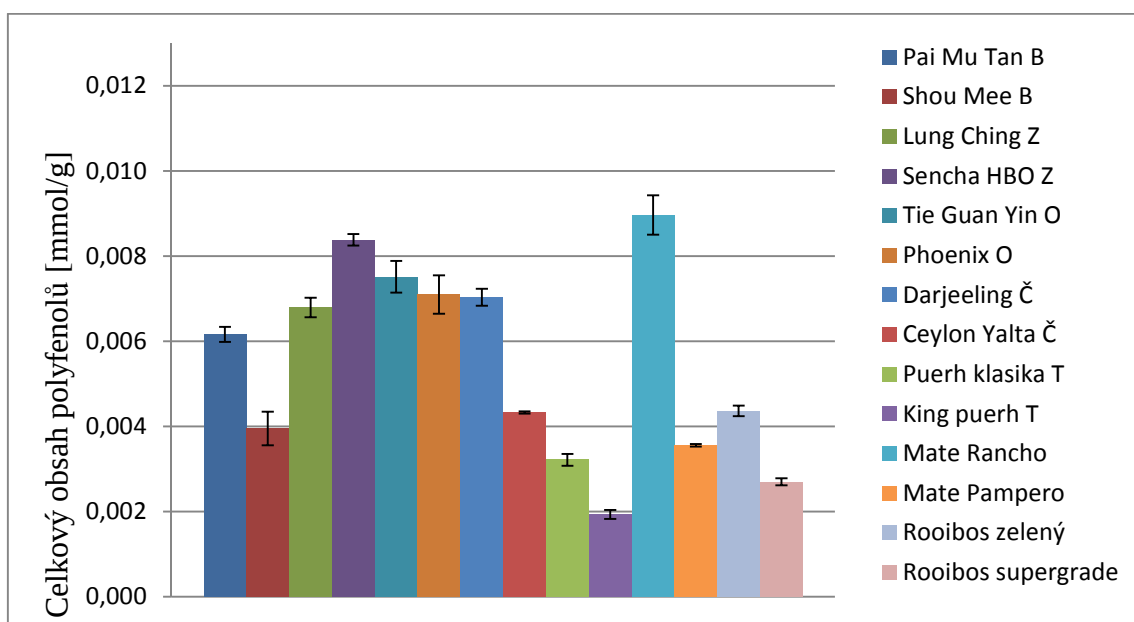
4.3.2 Porovnání výsledných koncentrací

V následujících podkapitolách jsou uvedeny grafy, které zobrazují porovnání výsledných koncentrací. Pro metodu FCM jsou uvedeny v mmol polyfenolů (v ekvivalentu na gallovou kyselinu) na gram materiálu a pro TAA v mmol polyfenolů (v ekvivalentu na trolox) na gram materiálu. Výsledné koncentrace pro UHPLC jsou uvedeny v mg polyfenolů na gram materiálu. Zkratky v grafech u názvů čajů znamenají druh příslušného čaje, tedy B - bílý, Z - zelený, O - oolong, Č - černý, T - tmavý.

4.3.2.1 FCM



Obrázek 5: Graf porovnání koncentrací pro FCM pro 80 °C



Obrázek 6: Graf porovnání koncentrací pro FCM pro 8 °C

Na grafech jde na první pohled vidět, že obsah polyfenolů je po extrakci při 80 °C u všech materiálů vyšší než po extrakci při 8 °C. Jedinou výjimkou je Mate Rancho, které má v obou případech obsah polyfenolů přibližně stejný. Dá se tedy říci, že toto mate se při velmi rozdílných teplotách vyluhuje přibližně stejně. Rozdíly v obsahu polyfenolů v měření při obou teplotách však nejsou ani dvojnásobné. Takže maceráty (ve

studené nebo teplé vodě) oproti nálevům (v horké vodě) nejsou bezvýznamné. (Valter, 2000).

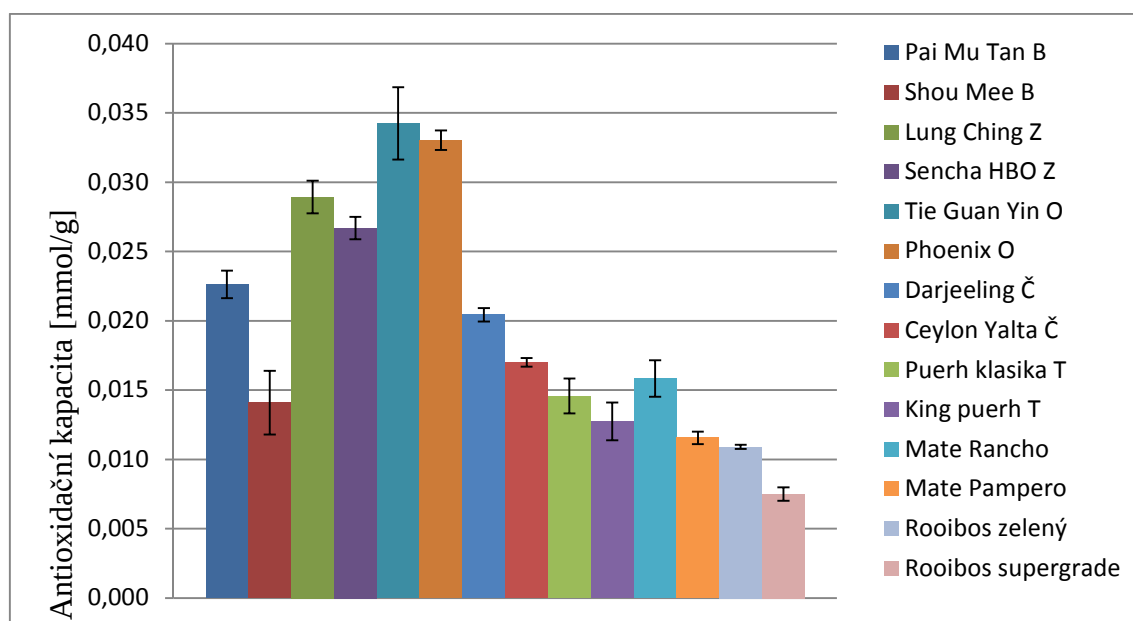
Dále lze pozorovat, že obecně kvalitnější čaj Pai Mu Tan má v obou případech vyšší obsah polyfenolů než Shou Mee. Zřejmě je to díky vyššímu zastoupení tipsů v čaji Pai Mu Tan, které jsou na polyfenoly bohatší než ostatní lístky. Lung Ching se řadí mezi 10 nejlepších čínských čajů, a přesto má o něco menší obsah polyfenolů než Sencha HBO, která patří mezi střední třídu japonských čajů. Však tato konkrétní Sencha HBO pochází ze speciální zahrady, která zachovává pěstování v bio kvalitě. Navíc japonské zelené čaje neprochází pražením na pánvi, ale pařením v páře, které je k čaji šetrnější. Výsledek tudíž není překvapující. Tie Guan Yin patří mezi čínské málo oxidované oolongy a Phoenix mezi čínské středně oxidované oolongy, což poukazuje na zvláštnost, že Phoenix při 80 °C Tie Guan Yin v obsahu polyfenolů převyšuje. Darjeeling patří mezi lepší třídu a lepší grade (listová vyrovnanost, celistvost) než Ceylon Yalta, tím pádem patří do vyšší cenové kategorie. Zřejmě i díky tomu má Darjeeling v obou případech vyšší obsah polyfenolů. Puerh klasika v množství polyfenolů převyšuje King puerh v obou případech. Pro znalce puerhů, kteří doposud neřešili obsah polyfenolů, může být tento výsledek zarážející, jelikož King puerh byl mnohem dražší a měl vzhledově menší a vyrovnanější lístky (což poukazuje na lepší čaj) než Puerh klasika. Tento rozdíl je však vysvětlitelný tím, že puerhy jako jediné čaje procházejí hlubokou oxidací i fermentací a cena i kvalita puerhů se určuje podle délky zrání. Při zrání však dochází k degradaci polyfenolů. Mate Rancho neboli zelené mate, je nepražené oproti praženému Mate Pampero. Takže výsledek, že Mate Rancho má vyšší obsah polyfenolů než Mate Pampero opět není velmi překvapující. U rooibosu platí podobná závislost jako u mate, avšak místo pražení Rooibos supergrade prochází oxidací (Valter, 2000; Vermerris, et al., 2006).

Při porovnání všech materiálů mezi sebou je nejzajímavější výsledek u obou oolongů. Phoenix i Tie Guan Yin mají při 8 °C srovnatelné množství polyfenolů se zelenými čaji a při 80 °C je dokonce převyšují. To je velmi zvláštní, jelikož oolongy naproti zeleným čajům procházejí částečnou oxidací. Tento výsledek je způsoben zřejmě kvalitou a stářím konkrétních čajů. Navíc zkoumané oolongy mají více zmačkané listy (pojem heavy), takže lístky nepřipouští tolik kyslíku na autooxidaci polyfenolů (Soon, 2011; Velíšek, a další, 2009). Rooibosy i mate mají srovnatelný obsah polyfeno-

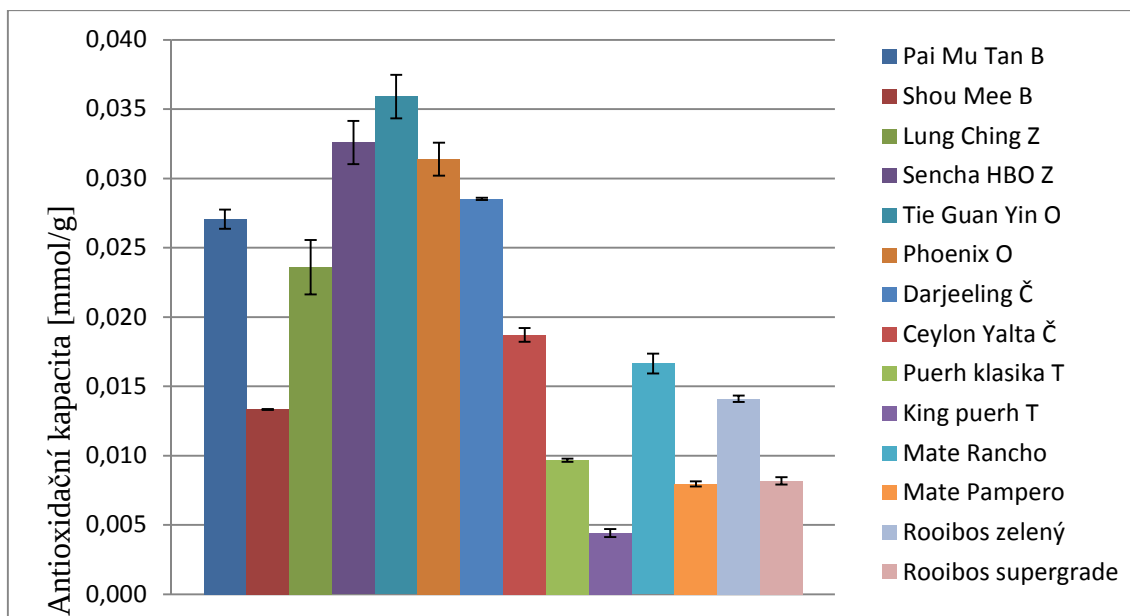
lů s puerhy, černými čaji a při 8 °C s bílými čaji. Mate Rancho je zde opět výjimkou, jelikož má oproti podobným materiálům mnohem vyšší obsah polyfenolů a při 8 °C dokonce zcela nejvyšší. Nejnižší obsahy polyfenolů byly naměřeny u puerhů.

Obsah polyfenolů však není zcela klíčový pro antioxidační účinky na zdraví, jelikož se touto metodou stanoví veškeré polyfenoly včetně například taninů, které sice patří mezi polyfenoly, ale nepatří mezi antioxidanty (Velíšek, a další, 2009; Vermerris, et al., 2006).

4.3.2.2 TAA



Obrázek 7: Graf porovnání koncentrací pro TAA pro 80 °C



Obrázek 8: Graf porovnání koncentrací pro TAA pro 8 °C

Shou Mee, Ceylon Yalta a puerhy mají při 8 °C nižší antioxidační kapacitu než při 80 °C. Mate Rancho má antioxidační kapacitu stejnou v obou případech. Zbývajících devět materiálů má při 8 °C vyšší antioxidační kapacitu než při 80 °C. Tento rozdíl může být způsoben příliš dlouhým extrakčním časem (24 h), takže antioxidanty měly dost času na autooxidaci, avšak u extrakcí materiálů uchovaných v lednici (při 8 °C) mohl být tento proces zpomalen. Na toto zpomalení poukazuje i to, že některé zfiltrované extrakty z 8 °C byly světlejší než z 80 °C. Při autooxidaci dochází k přeměně světlejších látek na tmavší látky (Dasgupta, et al., 2014; Velíšek, a další, 2009). Tento fakt podporuje i skutečnost uvedená v článku Rusak, et al., (2008), že jejich extrakty vodou zeleného a bílého čaje zkoumané pomocí FCM na obsah polyfenolů obsahovaly až 2000 mgGAE/l. Po přepočtu mých výsledků z FCM na jednotky mgGAE/l vyšly hodnoty asi 20 krát nižší.

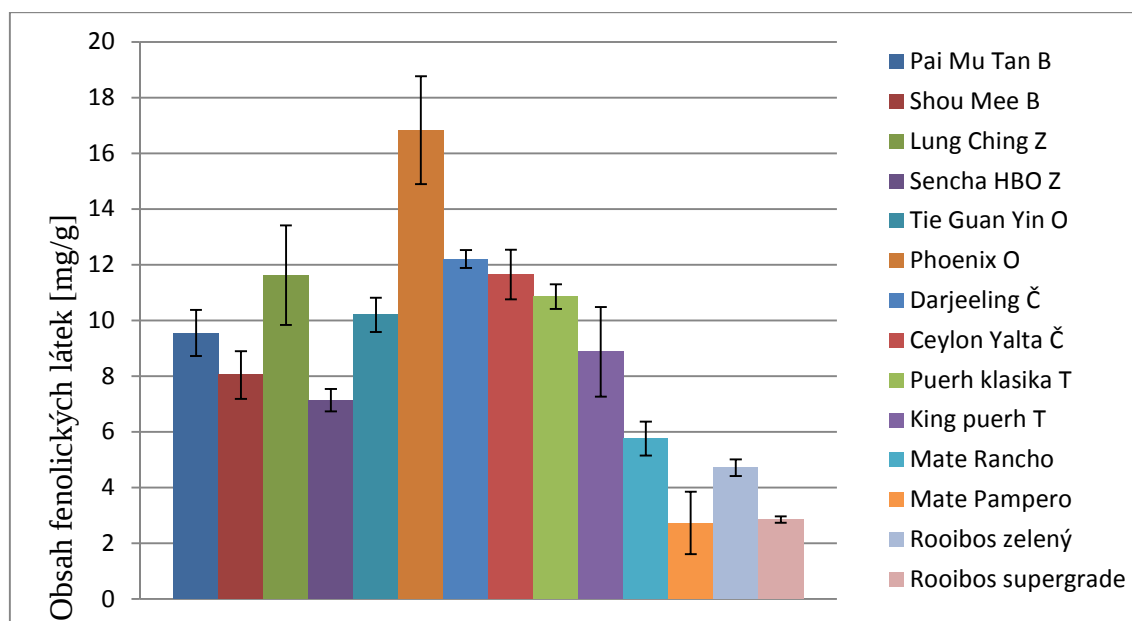
Rozdíly mezi dvěma materiály jednoho druhu zachovávají podobný ráz jako u FCM. Výjimku tvoří zelený čaj Lung Ching, který v 80 °C svou antioxidační kapacitou převyšuje zelený čaj Sencha HBO. Další výjimka je u oolongu Tie Guan Yin, který má o něco vyšší antioxidační kapacitu než Phoenix.

Při porovnání všech materiálů mezi sebou je zřejmé, že v obou teplotách mají nejvyšší antioxidační kapacitu oolongy. Pouze v případě 8°C extrakce čaj Sencha HBO převýšil jeden z oolongů. Příčinou toho, proč Sencha HBO nevystupuje i u 80°C extrak-

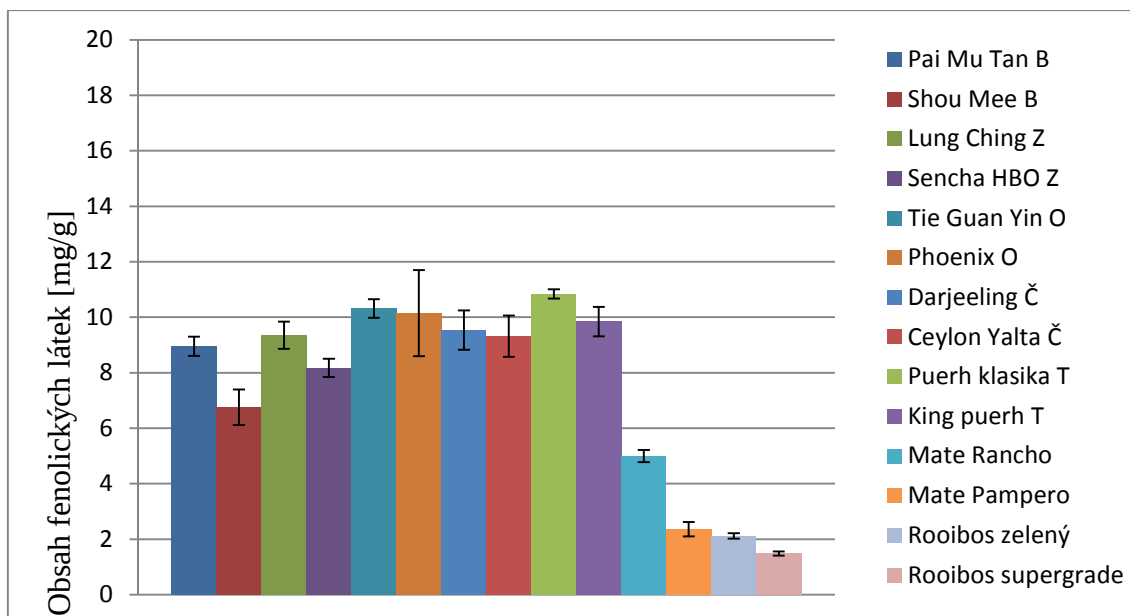
ce, může být fakt, že japonské zelené čaje nesnášejí vyšší teploty luhování a jsou pro ně doporučovány teploty až o 15 °C nižší než pro čínské zelené čaje (u japonského zeleného čaje Gyokuro se dokonce doporučuje maximální teplota přípravy 50 °C). Překvapivé je i to, že mate a rooibosy mají podobné nebo vyšší antioxidační kapacity než puerhy. Dalším zajímavým faktem je, že v 8 °C černý čaj Darjeeling převýšil zelený čaj Lung Ching. Pro puerhy byly naměřeny opět nejnižší hodnoty. Přílišným zpracováním a zráním se jim tedy snížila antioxidační kapacita na minimum (Rosen, 2000; Valter, 2000).

Antioxidační kapacita nám určuje schopnost antioxidantů vázat volné radikály. To, že vždy nesouvisí s celkovým obsahem polyfenolů nám dokazuje Mate Rancho, které v 8 °C u FCM převýšilo ostatní, však v 8 °C u TAA spadlo pod průměr. Nebo že Lung Ching je u 8 °C u FCM na podobné úrovni jako oolongy a Darjeeling, však u 8 °C u TAA všechny tyto čaje Lung Ching převyšují (Carloni, et al., 2013; Velíšek, a další, 2009).

4.3.2.3 UHPLC



Obrázek 9: Graf porovnání koncentrací pro UHPLC pro 80 °C



Obrázek 10: Graf porovnání koncentrací pro UHPLC pro 8 °C

Podle metody UHPLC, která stanovuje obsah polyfenolů, lze na grafech vidět, že při 80 °C byl obsah polyfenolů vyšší než při 8 °C. Jedinou výjimkou je Sencha HBO, jejíž obsah polyfenolů je vyšší při 8 °C. Další výjimka by mohla být u čaje King puerh, avšak při 80 °C je vidět velká odchylka v měření. Při srovnání s FCM nejsou u výsledků z UHPLC mezi 80 °C a 8 °C tak markantní rozdíly kromě čaje Phoenix. Další zajímavostí je, že Puerh klasika má v obou teplotních případech podobné množství polyfenolů.

Rozdíly mezi dvěma materiály jednoho druhu jsou opět podobné a odpovídají dříve zmíněným vlastnostem materiálů. Lung Ching je zde jako jediná výjimka. Obsahuje v obou teplotních případech větší množství polyfenolů než Sencha HBO.

Srovnáním všech materiálů mezi sebou je vidět, že při 80 °C byly nejvyšší hodnoty naměřeny u čaje Phoenix, avšak při 8 °C jsou průměrné. Bílé a zelené čaje mají mezi sebou u obou teplot podobná množství polyfenolů. Černé čaje se v obsahu polyfenolů nejen vyrovnají, ale někde i převýší zelené i bílé čaje. Nejmarkantnějším rozdílem při srovnání UHPLC a FCM jsou puerhy. V 80 °C mají podobné obsahy jako zelené a bílé čaje. V 8 °C má King puerh průměrné zastoupení a Puerh klasika má dokonce zastoupení nejvyšší. Tyto hodnoty naměřené u čajů pomocí UHPLC mohou být ovšem zavádějící, protože polyfenoly čaje jsou převážně katechiny a jejich galláty, což jsou molekuly, které obsahují alespoň tři benzenová jádra (Velíšek, a další, 2009; Vermerris, et al., 2006). Já ovšem pomocí UHPLC zkoumal hlavně nižší fenolové kyseliny, které

mají v molekule pouze jedno benzenové jádro. Zřejmě tedy kvůli tomu mají všechny čaje podobný obsah polyfenolů. Mate i rooibosy obsahují ze zkoumaných materiálů polyfenolů nejméně.

5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem měl za cíl seznámit se se základními rozdíly různých variant čajovníků, se zpracováním čaje, s obsažnými látkami čaje, jejich účinkem na lidské zdraví; seřadit a popsat polyfenoly, zjistit, jak se laboratorně stanovuje obsah polyfenolů a jejich antioxidační kapacita, a nakonec provést měření na vybraných druzích čajů a bylin a porovnat zjištěné výsledky.

Jelikož čajovník zahrnuje tři varianty a nespočet různých odrůd, může se kvalita následně zpracovaného čaje velmi lišit. Čajovník se také pěstuje téměř po celém světě, a tak kvalita čaje závisí i na terroir. Zpracování čajových lístků vede k čaji. Tento proces zahrnuje několik fází, které určují, jaký druh čaje vznikne. Zpracovatelů čaje je velké množství a každý má svůj tajný přesný postup na výrobu svého čaje. Postup výroby některých druhů čajů jako puerh nebo žlutý čaj byl ještě do nedávna tajemstvím. Kvalita čaje tedy záleží i na zpracovateli. Zjistil jsem, že mezi hlavní zdraví prospěšné látky v čaji patří polyfenoly.

Po prozkoumání odborné literatury jsem zjistil, že pro laboratorní stanovení obsahu polyfenolů se nejčastěji používá metoda FCM a chromatografické metody, nejčastěji však HPLC. Pro zjištění antioxidační kapacity se potom nejčastěji používá metoda TAA.

Při vlastním laboratorním pokusu jsem tedy použil metodu FCM a UHPLC na určení celkového množství polyfenolů a metodu TAA na určení antioxidační kapacity u dvou bílých, dvou zelených, dvou polozelených, dvou černých a dvou tmavých čajů a u dvou mate a dvou rooibosů. Nejvyšší obsahy a antioxidační kapacity byly zjištěny u oolongů a zeleného čaje Sencha HBO. O něco nižší byly zjištěny u zeleného čaje Lung Ching, černého čaje Darjeeling a bílého čaje Pai Mu Tan. Nejmenší hodnoty byly u puerhů, kromě metody UHPLC, kde naopak patřily mezi nejlepší. Nepražené mate překvapilo svým vysokým obsahem polyfenolů srovnatelným se zelenými čaji, avšak jeho antioxidační kapacita byla asi o polovinu menší. Zajímavé výsledky byly získány i pro neoxidovaný rooibos, který byl srovnatelný s bílým čajem Shou Mee nebo s černým čajem Ceylon Yalta.

Největší blahodárné účinky na organismus mají tedy oolongy. Ze získaných výsledků vyplývá, že i maceráty získané za studena mohou najít úspěšné využití například

v horkých letních měsících a zároveň takto získat cenné látky z čaje i studenou cestou. Konzumenti, kteří neupřednostňují klasický čaj, mohou zvolit mate či rooibos, které mají také poměrně vysoký obsah antioxidantů.

6 POUŽITÁ LITERATURA

Carloni, Patricia, et al. 2013. Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar. *Food Research International*. 2013, Vol. 53, 2, pp. 900-908.

Coufal, Pavel. 1996. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. [Online] 2.. 3. 1996. [Citace: 30.. 1. 2015.] Dostupné na: [<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>].

Dasgupta, Amitava and Klein, Kimberly. 2014. Chapter 13 - Tea, Coffee, and Chocolate: Rich Sources of Antioxidants. *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements*. s.l. : Elsevier Ltd., 2014, pp. 237-257.

Dolby, Victoria. 2002. *O Zeleném čaji: otázky a odpovědi*. [překl.] Jana Novotná. Pragma o zdraví. Hodkovičky [Praha] : PRAGMA, 2002. str. 95. ISBN 80-7205-892-4.

Inbaraj, Stephen B., et al. 2010. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC–DAD–ESI–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010, Vol. 51, 3, pp. 549 - 556.

Medina and Marjorie, B. 2011. Simple and Rapid Method for the Analysis of Phenolic Compounds in Beverages and Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, Vol. 59, 5, pp. 1565 - 1571.

Re, Roberta, et al. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, Vol. 26, 9 - 10, pp. 1231 - 1237.

Rosen, Diana. 2000. *Rádce milovníka zeleného čaje*. [překl.] Markéta Janouchová. Praha : PRAGMA, 2000. str. 139. ISBN 80-7205-755-3.

Rusak, Gordana, et al. 2008. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*. 2008, Vol. 110, 4, pp. 852-858.

Soon, Edwin. 2011. *Cesta čaje Dilmah*. [překl.] Vojtěch Šnytr. 1. vydání. Praha : Euromedia Group, k. s. - Ikar, 2011. str. 152. ISBN 978-80-249-1757-3.

Stodt, Ulf and Engelhardt, Ulrich H. 2013. Progress in the analysis of selected tea constituents the past 20 years. *Food Research International*. 2013, Vol. 53, 2, pp. 636-648.

Thomová, Soňa, Thoma, Michal and Thoma, Zdeněk. 2002. *Příběh čaje*. 1. vydání. Praha : Argo, 2002. p. 398. ISBN 80-7203-447-2.

Valter, Karel. 2000. *Vše o čaji pro čajomily*. 1. vydání. Praha : Granit, 2000. str. 190. ISBN 80-85805-91-X.

van der Pijl, P.C., Chen, L. and Mulder, T.P.J. 2010. Human disposition of L-theanine in tea or aqueous solution. *Journal of functional foods*. 2010, Vol. 2, 4, pp. 239-244.

Velíšek, Jan a Hajšlová, Jana. 2009. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vydání. Tábor : OSSIS, 2009. str. 644. Sv. 2. ISBN 978-80-86659-17-6.

Vermerris, W. and Nicholson, R. 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. 1. vydání. Dordrecht : Springer, 2006. p. 276. ISBN 978-1-4020-5163-0.

Vinson, Joe A. and Dabbagh, Yousef A. 1998. Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fraction and their binding with lipoproteins. *Nutrition Research*. 1998, Vol. 18, 6, pp. 1067-1075.

Wang, Li, et al. 2012. Column-chromatographic extraction and separation of polyphenols, caffeine and theanine from green tea. *Food chemistry*. 2012, Vol. 131, 4, pp. 1539-1545.

7 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Chemické vzorce epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin-3-gallát (ECG) a epigallocatechin-3-gallát (EGCG), upraveno v ACD/ChemSketch podle předlohy z (Vermerris, et al., 2006).....	19
Obrázek 2: Příklad chromatogramu (Coufal, 1996)	23
Obrázek 3: Příklad kalibrační přímky pro FCM.....	30
Obrázek 4: Příklad kalibrační přímky pro TAA	30
Obrázek 5: Graf porovnání koncentrací pro FCM pro 80 °C	31
Obrázek 6: Graf porovnání koncentrací pro FCM pro 8 °C	31
Obrázek 7: Graf porovnání koncentrací pro TAA pro 80 °C	33
Obrázek 8: Graf porovnání koncentrací pro TAA pro 8 °C	34
Obrázek 9: Graf porovnání koncentrací pro UHPLC pro 80 °C.....	35
Obrázek 10: Graf porovnání koncentrací pro UHPLC pro 8 °C.....	36