

# **Stanovení těkavých látek ve vybraných typech nefermentovaných čajů metodou GC-MS**

Bc. Pavla Mirošová

---

Diplomová práce  
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavla MIROŠOVÁ**  
Osobní číslo: **T10922**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Stanovení těkavých látek ve vybraných typech nefermentovaných čajů metodou GC-MS.**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Stručně popsat technologické postupy zpracování čaje
2. Zpracovat rešerši na téma výskyt těkavých látek v nefermentovaných čajích
3. Pojednat o analytických metodách vhodných pro stanovení těkavých látek

### II. Praktická část

1. Provést sérii experimentů s cílem extrakce těkavých látek ze studovaných vzorků čaje
2. Získané extrakty analyzovat pomocí CG-MS
3. Obdržené výsledky zpracovat a provést jejich interpretaci

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. **ŠTULÍK, Karel a kol. Analytické separační metody. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0852-2.**
2. **Dle provedení literární rešerše s využitím databáze Scopus.**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Michal Rouchal, Ph.D.**

Ústav chemie

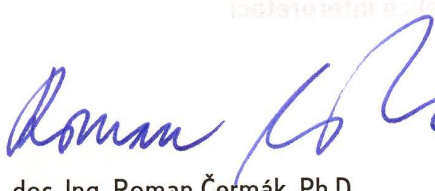
Datum zadání diplomové práce:

**1. února 2012**

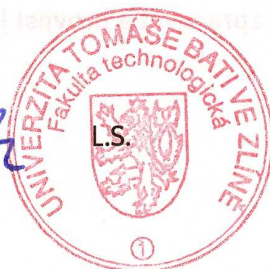
Termín odevzdání diplomové práce:

**2. května 2012**

Ve Zlíně dne 10. února 2012



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 2.5.2012

Mirošová Pavla

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Volné těkavé látky a jejich zastoupení v čaji mají zásadní vliv na jeho výsledné aroma a představují tak zásadní ukazatel jeho sensorické kvality. Tyto látky vybraných druhů nefermentovaného zeleného čaje byly získány pomocí dvou extrakčních metod, kterými byly destilace vodní parou a simultánní destilace-extrakce, a identifikovány metodou strukturní analýzy GC-MS. Na základě získaných výsledků bylo provedeno porovnání obsahu těkavých látek v jednotlivých vzorcích čaje, účinnost použitých extrakčních metod a opakovatelnost metody GC-MS. Součástí práce je také krátká rešerše pojednávající o extrakčních metodách vhodných pro izolaci těkavých látek a metodách jejich stanovení. Samostatná kapitola je věnována hmotnostní spektrometrii.

Klíčová slova: volné těkavé látky, destilace vodní parou, simultánní destilace-extrakce, GC-MS, nefermentovaný čaj

## **ABSTRACT**

Content of the volatile flavour compounds in tea plays a major role in its specific aroma, which also essentially contribute to sensory quality of made tea. These volatiles of pre-selected types of unfermented green teas were extracted by using the hydrodistillation and simultaneous distillation-extraction techniques and investigated by GC-MS. On the basis of achieved results the comparison between volatile compounds in individual kinds of used teas, efficiency of applied extraction methods and repeatability of GC-MS analysis were made. As an important part of this thesis were as well a brief search dealing with suitable extraction methods for isolation and determination of volatiles and mass spectrometry instrumentation possibilities.

Keywords: volatile flavour compounds, hydrodistillation, simultaneous distillation-extraction, GC-MS, unfermented tea

## **Poděkování:**

Je mi velmi milou povinností poděkovat vedoucímu své diplomové práce, Ing. Michalovi Rouchalovi, Ph.D., bez jehož spolupráce by tato práce ani nemohla vzniknout. Děkuji mu tak za čas strávený při korekturách a konzultacích, za odborné rady a cenné připomínky, a v neposlední řadě především za jeho obětavost, psychickou podporu a neutuchající trpělivost.

Velký dík také patří Mgr. Robertu Víchovi, Ph.D. za cenné rady a kolektivu kolegů z Ústavu chemie, především Ing. Evě Babjakové a Ing. Petře Branné, za pomoc při práci v laboratoři a měření vzorků na GC-MS.

Děkuji také Ing. Markétě Šípalové, Ph.D. za zapůjčení aparatury pro simultánní destilaci-extrakci.

Děkuji svým rodičům a celé své rodině za psychickou a finanční podporu po celou dobu svého studia, a za velkou trpělivost, kterou se mnou měli při psaní mé závěrečné práce.

## **Motto:**

„Nebát se a nekrást.“

T. G. Masaryk

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 TECHNOLOGIE ZPRACOVÁNÍ NEFERMENTOVANÉHO ČAJE</b> .....	<b>11</b>
1.1 SBĚR .....	11
1.2 ZAVADÁNÍ.....	12
1.3 PRAŽENÍ NEBO NAPAŘOVÁNÍ.....	12
1.4 SVINOVÁNÍ.....	13
1.5 SUŠENÍ .....	14
<b>2 VÝSKYT TĚKAVÝCH LÁTEK V NEFERMENTOVANÝCH ČAJÍCH</b> .....	<b>15</b>
2.1 NETERPENOIDNÍ LÁTKY .....	15
2.2 TERPENOIDNÍ LÁTKY .....	17
<b>3 EXTRAKČNÍ METODY</b> .....	<b>20</b>
3.1 DESTILACE VODNÍ PAROU.....	20
3.2 VAKUOVÁ DESTILACE.....	20
3.3 SOXHLETOVA EXTRAKCE.....	20
3.4 EXTRAKCE KAPALINA-KAPALINA .....	20
3.5 SIMULTÁNNÍ DESTILACE-EXTRAKCE .....	21
3.6 EXTRAKCE PEVNOU FÁZÍ .....	21
3.7 MIKROEXTRAKCE PEVNOU FÁZÍ.....	21
3.8 DYNAMICKÁ MIKROEXTRAKCE PEVNOU FÁZÍ .....	22
3.9 SUPERKRITICKÁ FLUIDNÍ EXTRAKCE.....	22
3.10 HEADSPACE.....	23
<b>4 ANALYTICKÉ METODY VHDNÉ PRO STANOVENÍ TĚKAVÝCH LÁTEK</b> .....	<b>24</b>
4.1 PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE .....	24
4.1.1 Detektory v plynové chromatografii.....	25
4.2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE .....	27
4.2.1 Iontové zdroje.....	28
4.2.2 Hmotnostní analyzátory .....	31
4.2.3 Detektory v MS .....	34
<b>II EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>36</b>
<b>5 EXTRAKCE VZORKŮ A ANALÝZA ZÍSKANÝCH EXTRAKTŮ</b> .....	<b>37</b>



5.1	MATERIÁL .....	37
5.2	POPIS EXTRAKČNÍCH METOD.....	38
5.2.1	Destilace vodní parou.....	38
5.2.2	Simultánní destilace a extrakce .....	38
5.3	ANALÝZA TĚKAVÝCH LÁTEK METODOU GC-MS .....	38
5.3.1	Popis instrumentace a parametrů analýz GC-MS.....	38
5.3.2	Příprava interního standardu .....	40
5.3.3	Příprava vzorků pro GC-MS .....	40
<b>III</b>	<b>VÝSLEKDY A DISKUZE .....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>EXTRAKCE TĚKAVÝCH LÁTEK .....</b>	<b>43</b>
6.1	DESTILACE VODNÍ PAROU .....	43
6.2	SIMULTÁNNÍ DESTILACE-EXTRAKCE .....	46
<b>7</b>	<b>ANALÝZA TĚKAVÝCH LÁTEK METODOU GC-MS.....</b>	<b>48</b>
7.1	GC-MS ANALÝZA VNITŘNÍHO STANDARDU.....	50
7.2	ANALÝZA EXTRAKTŮ ZÍSKANÝCH DESTILACÍ VODNÍ PAROU .....	52
7.3	ANALÝZA EXTRAKTŮ ZÍSKANÝCH SIMULTÁNNÍ DESTILACÍ-EXTRAKCÍ.....	61
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>70</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>71</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>74</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>76</b>

## ÚVOD

Zelený čaj je jedním z nejvíce konzumovaných nealkoholických nápojů na světě, a to díky svým zdravím prospěšným účinkům a příjemné chuti a vůni, která se vytváří během procesu zpracování. Volné těkavé látky v čaji tvoří široké spektrum sloučenin, a i když je jejich celkový obsah v čaji pouze ve stopovém množství (0,01 % sušiny), tak se významným způsobem podílejí na utváření čajového aroma, které je důležitým kvalitativním parametrem stanovujícím cenu čaje.

Cílem této práce bylo stanovit obsah a zastoupení volných těkavých látek ve vybraných druzích zelených čajů. Ze všech vzorků zkoumaných čajů byly nejprve pomocí extrakčních metod, destilace vodní parou a simultánní destilací-extrakcí, izolovány těkavé látky, které byly následně podrobeny analýze metodou GC-MS.

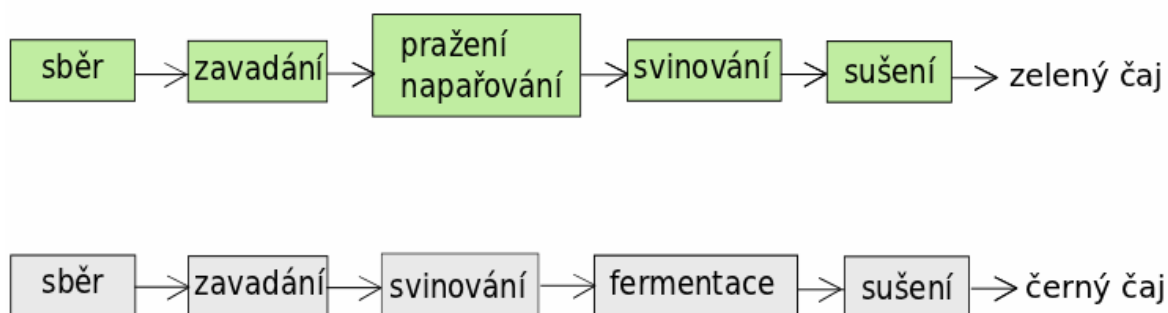
Pro lepší pochopení zkoumané problematiky byla nejprve zpracována krátká literární rešerše, pojednávající o specifickém postupu zpracování zeleného čaje kterým, jak již bylo řečeno, lze významně ovlivnit obsah a zastoupení těkavých látek čaje podílejících se na jeho aroma, a samozřejmě i pojednání o rozdělení těchto látek do jejich specifických skupin na terpenoidní a neterpenoidní, a jejich krátká charakteristika s nejvýznamnějšími zástupci. Součástí rešerše je také základní rozdělení extrakčních metod vhodných pro izolaci těkavých látek, z nichž pro účely této práce byly vybrány destilace vodní parou a simultánní destilace-extrakce. Významná část rešerše byla věnována rovněž deskripci jedné z metod strukturní analýzy, a to kombinované technice plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS).

Praktická část práce je rozdělena do dvou samostatných oddílů, experimentální části a interpretaci získaných výsledků. Postupně je tak pojednáno o použitých technikách pomocí nichž byly ze studovaných vzorků čaje získávány těkavé látky, s následným popisem použitého přístrojového vybavení a parametrech měření. Jádro této práce však představuje část zaměřená na interpretaci získaných výsledků, a to nejen v rámci jednotlivých druhů zeleného čaje, ale také s ohledem na použitý typ extrakční metody.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 TECHNOLOGIE ZPRACOVÁNÍ NEFERMENTOVANÉHO ČAJE

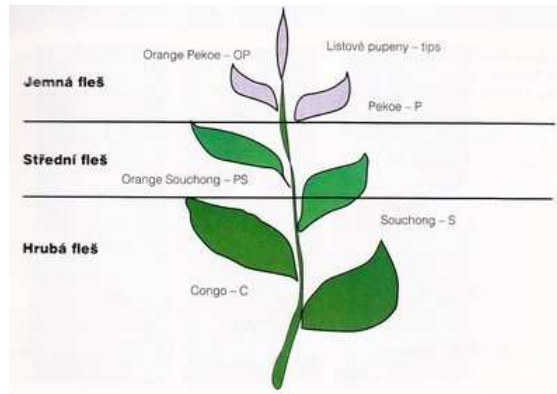
Čaj se zpracovává z čajovníku, což je keř původem z Číny patřící do rodu *Camellia* z čeledi *Theaceae*, do které spadá 267 druhů a poddruhů této rostliny [1, 2]. Na kvalitu čaje má vliv nejen druh čajovníku, ale především část rostliny, ze které jsou čaje zpracovávány, tedy lístky. Technologie zpracování nefermentovaného čaje sestává z po sobě následujících kroků, kterými jsou sběr čajovníkových lístků, zavadání, pražení nebo napařování, svinování, sušení, třídění a balení. U fermentovaných a polofermentovaných čajů se do technologického procesu zařazuje i fermentace, která následuje ihned po svinování, ovšem nejedná se o bakteriální kvašení, ale o enzymatickou oxidaci polyfenolů pomocí vzdušného kyslíku [3, 4]. Na Obrázku 1 je znázorněn rozdílný postup zpracování nefermentovaného (zeleného) a fermentovaného (černého) čaje.



Obrázek 1: Postup zpracování zeleného a černého čaje.

### 1.1 Sběr

Jakost čaje závisí v první řadě na správné a včasné sklizni, v době kdy se mladé listy začínají právě rozvíjet. Nejvyšší kvalitu čaje poskytuje ruční sklizeň, při které se musí dbát na správné ulamování výhonků. Při sklizni se odštěpují koncové mladé výhonky čajovníku tzv. fleše, které sestávají z vrcholového listového pupenu a 2–5 mladých lístků. Podle lístků se rozlišuje fleš jemná (pupen a 2 lístky), střední (pupen a 3 lístky) a hrubá (pupen a 5 lístků), jak je graficky znázorněno na Obrázku 2. Pro vysoce kvalitní čaj se sklízí jemná fleš, poskytující lístky hustě ochmýřené, bohaté na aromatické a extraktivní látky [3].



Obrázek 2: Nákres rozdělení výhonku čajovníku [5].

## 1.2 Zavadání

Po sklizni se čajové lístky nechají zavadnout (Obrázek 3) tak, aby byly lístky natolik vláčné, že snesou rolování. Nesmí totiž dojít k jejich rozdrčení. Během tohoto procesu začínají v listech probíhat některé specifické chemické reakce, které ovlivňují výsledné aroma hotového čaje. Zavadnutí se rozlišuje na lehké, střední a tvrdé [1].



Obrázek 3: Hala na zavadání lístků [6].

## 1.3 Pražení nebo napařování

Tento krok se využívá u výroby zeleného čaje k zabránění fermentace, kdy se pomocí vysoké teploty inaktivují enzymy čajových lístků. Existují dva způsoby, jak zabránit vzniku fermentace. Jedním z nich je japonský způsob napařování lístků (tzv. steaming), při němž se zavadnuté lístky napařují po dobu 2 minut horkou párou ve speciálních bubnech nebo na pásech (Obrázek 4). Druhým z nich je pak čínský způsob, kdy probíhá pražení lístků na pánvi přibližně 30 sekund při teplotě 280 °C, tzv. pražení (pan-firing). Čínský zelený čaj tak získává tmavší barvu než japonský [7, 8, 9].



Obrázek 4: Napařovací stroj [9].

#### 1.4 Svinování

Ke svinování dochází na speciálních strojích tzv. rollerech (Obrázek 5), což je proti sobě se otáčející dutý válec, v němž jsou nasypány zavadnuté čajové lístky, a deska stolu, na níž je válec umístěn. Nejprve se tak srolují nejmenší lístky, které jsou na vibračních sítích vytříděny na nejjakostnější čaje a při opakovaném svinování se svinou a vytřídí i listy střední a největší velikosti. Při svinování dochází k narušení povrchu listů a uvolnění buněčné šťávy [1, 3].



Obrázek 5: Roller na svinování lístků [10].

## 1.5 Sušení

Čajové lístky se suší cirkulujícím suchým vzduchem o teplotě 130 °C po dobu asi 30 minut tak, aby se obsah vody snížil na 4 %. Sušení má velký vliv na chuť a aroma čaje. Dochází při něm k částečnému odpaření aromatických látek a vzniku jiných vonných a chuťových látek, které jsou charakteristické pro hotový čaj. Dále dochází ke změně barvy na hnědočernou až černou, což je způsobeno karamelizací cukrů [1, 3, 11].

## 2 VÝSKYT TĚKAVÝCH LÁTEK V NEFERMENTOVANÝCH ČAJÍCH

Za sensorické vjemy při konzumaci čaje jsou zodpovědné dvě skupiny látek, a to těkavé a netěkavé organické látky. Těkavé látky dávají čaji jeho specifické aroma, zatímco netěkavé látky např. polyfenoly, kofein a aminokyseliny jsou všeobecně zodpovědné za chuť [12]. S ohledem na zaměření této diplomové práce budou dále diskutovány pouze těkavé látky.

Těkavé látky jsou v čaji obsaženy ve velmi malém množství, které představuje jen 0,01% celkového obsahu sušiny, přesto mají značný vliv na sensorickou jakost zpracovaného čaje. Zastoupení a množství těkavých látek v čaji se mění v důsledku enviromentálních a ekologických podmínek prostředí, ve kterých je čaj pěstován, a také technologickým způsobem zpracování. Těkavé látky v čaji lze obecně rozdělit do dvou skupin, přičemž v první skupině převládají neterpenoidní látky, které propůjčují čaji „svěží zelenou chuť“. Druhou skupinu představují terpenoidy, které dodávají finálnímu výrobku příjemné květinové aroma. Jako příklad lze uvést monoterpenoidní alkoholy linalool a geraniol. Přítomnost terpenoidů je v čaji vysoce žádoucí, přičemž poměr terpenoidů vůči neterpenoidům přítomným v čaji tzv. Flavour Index je jedním ze znaků jeho sensorické kvality [11, 13, 14].

### 2.1 Neterpenoidní látky

V této skupině se vyskytují především sloučeniny vznikající rozkladem lipidů, k čemuž pravděpodobně dochází v průběhu technologického zpracování vlivem napařování a pražení. Prekurzory neterpenoidních látek jsou především nenasycené mastné kyseliny, z nichž účinkem enzymů lipoxygenáz vznikají aldehydy a ketony. Tyto karbonylové sloučeniny se v důsledku další degradace působením enzymů oxidoreduktáz redukují až na jednoduché alkoholy. Příkladem takové sloučeniny může být (3E)-hex-3-en-1-ol, vzniklý redukcí (3E)-hex-3-enalu, jehož prekurzorem byla kyselina linoleová. [11, 14, 15].

Degradací nenasycených mastných kyselin vznikají rovněž ketony (např. alkenyl-2-ony), které se formují oxidací mastných kyselin na  $\beta$ -ketokyseliny, jež následně podléhají dekarboxylační reakci za vzniku odpovídajících ketonů. Těmito ketony jsou např. heptan-2-on, oktan-3,5-dien-2-on nebo pent-3-en-2-on [12, 14, 15, 16].

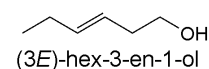
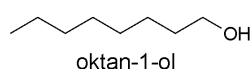
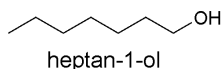
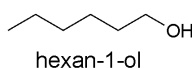


Autooxidací nenasycených mastných kyselin vznikají hydroperoxydy, které jsou nestabilní a rozkládají se na nízkomolekulární sloučeniny (aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny). Linoleová kyselina se tak může oxidovat na 13-hydroperoxylinoleovou kyselinu, jejíž redukcí vzniká hexanal [11, 17].

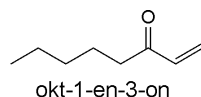
Všechny tyto produkty degradace nenasycených mastných kyselin tvoří až 90 % celkového obsahu neterpenoidních látek v čaji. Zbýlých cca 10 % tvoří karboxylové kyseliny např. hexanová a heptanová kyselina [11, 14, 15].

Nejvýznamnějšími neterpenoidy vytvářejícími v čajích silně aromatickou květinovou vůni jsou (3*E*)-hex-3-enal, (2*E*,4*E*)-hepta-2,4-dienal, pentanal či (2*E*)-hex-2-enal [15]. Na Obrázku 6 je graficky znázorněno rozdělení neterpenoidních těkavých látek s vybranými příklady konkrétních sloučenin nejčastěji se vyskytujících v nefermentovaných čajích [8, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19].

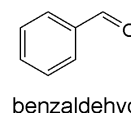
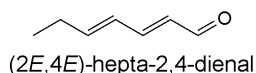
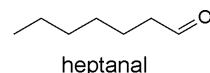
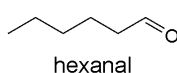
### Alkoholy



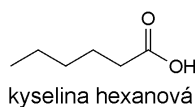
### Ketony



### Aldehydy



### Karboxylové kyseliny



Obrázek 6: Rozdělení a strukturní vzorce vybraných neterpenoidních látek vyskytujících se v zelených čajích.

## 2.2 Terpenoidní látky

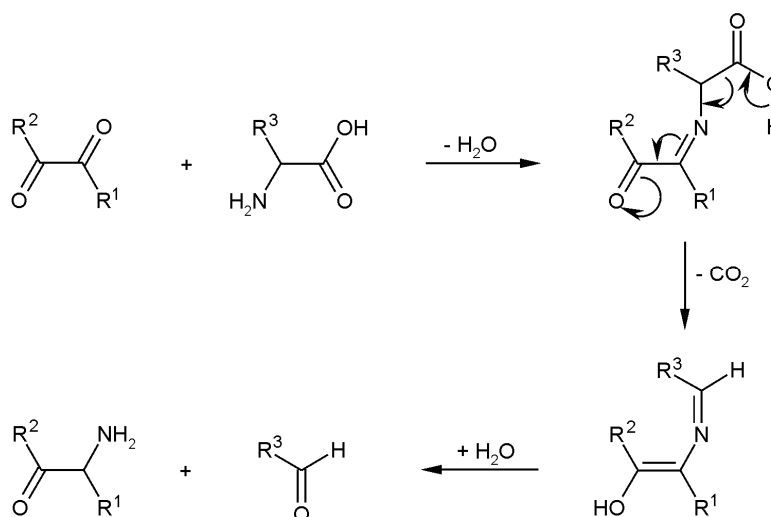
Skupinu terpenoidních látek tvoří především terpeny, aromatické karbonylové sloučeniny a alkoholy odvozené převážně od terpenoidních glykosidů. Jsou to látky vznikající enzymatickou oxidací karotenoidů (např.  $\beta$ -ionon), hydrolýzou terpenoidních glykosidů a také jsou to deriváty aminokyselin a cukrů vzniklé Streckerovou degradací a Maillardovou reakcí, které jsou podstatou neenzymatického hnědnutí potravin. Touto cestou vznikají aromatické aldehydy a jejich oxidací i příslušné alkoholy [11, 15].

### Streckerova degradace

Tento způsob degradace aminokyselin vede k tvorbě karbonylové sloučeniny zpravidla o jeden atom uhlíku kratší, než byla původní aminokyselina. Streckerovo odbourávání patří mezi nejdůležitější reakce vedoucí ke konečné tvorbě sloučenin vzniklých v Maillardově reakci [20].

Aldehydy, které patří mezi terpenoidní látky (epoxyalkenaly, epoxyketony, hydroxyalkoholy), vznikají reakcí aminokyselin s oxidovanými lipidy. Tyto sloučeniny reagují s aminoskupinou aminokyselin, kdy následnou dekarboxylací a hydrolýzou vzniká odpovídající aldehyd. Zahříváním směsi oxidovaných lipidů a aminokyselin v přítomnosti kyslíku vznikají ketodieny. Lipidové hydroperoxydily vznikají oxidací aminokyselin [20].

Schéma 1: Obecné schéma Streckerovy degradace aminokyselin.

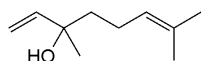
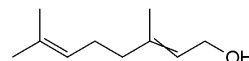
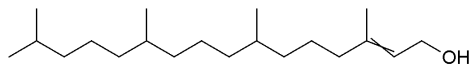
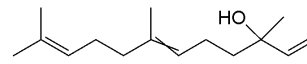
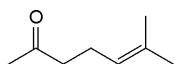


### Maillardova reakce

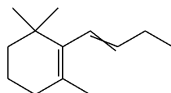
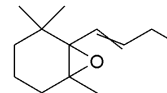
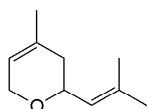
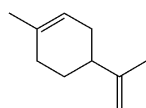
Tato reakce patří mezi nejrozšířenější reakce sacharidů a sloučenin obsahujících aminoskupinu za vzniku heterocyklických sloučenin a pigmentů nazývaných melanoidy.

Maillardova reakce je zahájena vznikem Schiffovy báze, k níž dochází reakcí mezi karbonylovou skupinou redukujících se sacharidů a aminoskupinou příslušné aminokyseliny za vzniku příslušného iminu. Imin se transformuje Amadoriho přesmykem na 1-amino-1-deoxyketosu, která podléhá enolizaci a uvolní tak aminoskupinu. Z enolu dalšími reakcemi, např. kondenzací, dehydratací a izomerací vznikají konečné produkty neenzymatického hnědnutí, tzv. melanoidy [21].

Obrázek 7 ukazuje nejvýznamnější terpenoidy vyskytující se v zelených čajích a utvářející jejich aroma [8, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19], přičemž za klíčové látky lze označit linalool a geraniol [12, 16]. V případě nefermentovaných čajů se mezi terpenoidními látkami neuvádí indol. Důvodem je jeho velmi nízká koncentrace v tomto typu čajů. Obsah indolu rapidně stoupá až s procesem fermentace, což znamená, že může být významným indikátorem (spolu s benzenacetonitrilem a methylsalicylátem) pro rozpoznání zelených a černých čajů [12].

**Alkoholy**3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol  
(linalool)3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-ol  
(geraniol)3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-en-1-ol  
(fytol)3,7,11-trimethyldodeka-1,6,10-trien-3-ol  
(nerolidol)**Ketony**

6-methylhept-5-en-2-on

2-(but-1-enyl)-1,3,3-trimethyl  
cyklohex-1-en ( $\beta$ -ionon)1-(but-1-enyl)-2,2,6-trimethyl-7-oxa-  
bicyklo[4.1.0]heptan ( $\beta$ -ionon-1,6-epoxid)**Heterocyklické sloučeniny**3,6-dihydro-4-methyl-2-(2-methylprop-1-enyl)-2H-pyran  
(nerol oxid)**Uhlovodíky**1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-1-en  
(limonen)

Obrázek 7: Rozdělení a strukturální vzorce vybraných terpenoidních látek vyskytujících se v zelených čajích.

### 3 EXTRAKČNÍ METODY

#### 3.1 Destilace vodní parou

Destilace vodní parou (SD, Steam distillation) je jednou ze základních extrakčních metod umožňující izolaci těkavých látek. Získaný destilát je jímán do předlohy a následně vytřepán do vhodného organického rozpouštědla (např. hexan, dichlormethan či diethylether). V praxi je tato metoda používána jen zřídka a to pouze pro kvantitativní analýzu vzhledem k faktu, že získané těkavé látky jsou v extraktu obsaženy ve velmi zředěné formě. Nevýhodou destilace vodní parou je, že vlivem vysokých teplot, přímým působením páry a kyselým pH může v průběhu destilace docházet ke ztrátě těkavých látek a látek rozpustných ve vodě. V porovnání s nejnovějšími extrakčními technikami je tato metoda rovněž časově velmi náročná [22, 23, 24].

#### 3.2 Vakuová destilace

Vakuová destilace (VHD, Vacuum Hydrodistillation) je destilace za sníženého tlaku, která se využívá k separaci složek směsi na základě jejich rozdílných bodů varu, a k izolaci látek, které by se destilací za normálního tlaku (destilací vodní parou) rozkládaly. Výhodou této metody je účinná separace cílených látek a nízká experimentální teplota, což znamená, že tato metoda představuje vhodný způsob izolace těkavých látek [25, 26, 27].

#### 3.3 Soxhletova extrakce

Soxhletova extrakce (SE, Soxhlet Extraction) je klasická metoda pro separaci organických látek z pevných materiálů. Je považována za vysoce extraktivní metodu, jelikož zkondenzovaná organická fáze kontinuálně prochází přes extrahovaný pevný vzorek [28].

#### 3.4 Extrakce kapalina-kapalina

Tato extrakce označovaná zkratkou LLE (z angl. Liquid-liquid Extraction) představuje nejstarší a nejrozšířenější techniku izolace látek. Při této metodě jsou používána organická rozpouštědla s nízkou polaritou a bodem varu o vysoké extrakční schopnosti např. trichlorofluormethan, pentan, hexan, diethylether nebo dichlormethan

[20]. Hlavními nevýhodami jsou značná spotřeba rozpouštědla, zdlouhavost metody a nízká koncentrace cílených látek ve výsledném extraktu [28].

### 3.5 Simultánní destilace-extrakce

SDE (z angl. Simultaneous Distillation-Extraction) je nejvíce využívaná a nenahraditelná metoda pro analýzu těkavých látek. Na rozdíl od destilace vodní parou, v ní probíhá kondenzace par těkavých látek ze zkoumaného materiálu společně s parami rozpouštědla. Dochází tak ke kontinuálnímu převedení par těkavých látek do organického rozpouštědla (např. dichlormethanu), kde jsou zakoncentrovány. Je-li tato technika vhodně optimalizována, pak může poskytovat, ve srovnání s jinými extrakčními metodami (např. SD či SPE), extrakty s vyšším podílem těkavých látek [28, 29, 31].

### 3.6 Extrakce pevnou fází

Princip extrakce pevnou fází (SPE, Solid-phase Extraction) spočívá v zachycení sledovaných analytů na sorbent, který je umístěn v extrakční mikrokolonce. K sorpci analytu skrz mikrokolonku dochází pomocí vakua. SPE je často používanou metodou pro separaci terpenů a stanovení organických kyselin [23, 24].

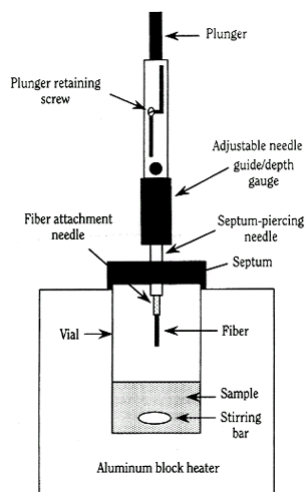
### 3.7 Mikroextrakce pevnou fází

Mikroextrakce pevnou fází (SPME, Solid-phase Microextraction) je poměrně nová metoda použitelná pro extrakci těkavých látek z různých materiálů (např. rostlin) a jejich následnou detekci plynovou chromatografií. Principem této metody je sorbce těkavých látek na stacionární fázi pokrývající křemenné vlákno, které se nachází uvnitř kovové jehly, a to buď přímo ze vzorku, nebo v prostoru nad hladinou vzorku. Po ukončení sorpce je vlákno vloženo do nástřikového prostoru plynového chromatografu (GC). Zde se naadsorbovaný analyt oddělí od křemenného vlákna a projde kolonou GC. Vzorky není potřeba rozpouštět ani jinak upravovat, proto je to velmi jednoduchá a účinná metoda pro běžné analýzy organických látek. Nevýhodou této metody může být křehkost a životnost vlákna [22, 24, 27, 30].

SPME umožňuje provádět dva způsoby extrakce. Prvním způsobem je přímá SPME, označovaná zkratkou **DI-SPME** (Direct Immersing SPME), při které dochází přímo k

ponoření vlákna do vzorku. Druhým způsobem je headspace SPME, označovaná zkratkou **HS-SPME** (Headspace SPME, Obrázek 8), tato varianta využívá extrakci analytů z prostoru nad vzorkem [24, 27].

Největší předností SPME je citlivost, rychlost stanovení a vysoký stupeň automatizace, kdy manuální práce je omezena pouze na navážení vzorku, což vede k vysoké přesnosti a reprodukovatelnosti dané analýzy [22, 27].



Obrázek 8: HS-SPME [34].

### 3.8 Dynamická mikroextrakce pevnou fází

Nejnovější a nejmodernější uspořádání SPME je dynamická mikroextrakce pevnou fází (SPDE, Solid-phase Dynamic Microextraction). Jedná se o dynamickou extrakci kapalných nebo plyných vzorků. Princip metody je obdobný jako u SPME s tím rozdílem, že sorbent je nanesen na vnitřní povrch jehly připojené k plynotěsné stříkačce. Opakovaným nabíráním plynné (HS-SPDE) nebo kapalně fáze (DI-SPDE) dochází k zakoncentrování stanovovaných analytů uvnitř jehly [30, 31].

### 3.9 Superkritická fluidní extrakce

Tento typ extrakční metody, označované zkratkou SFE (z angl. Supercritical Fluid Extraction), využívá vlastnosti  $\text{CO}_2$ , který se v superkritickém stavu vyvolaném nadkritickými teplotami a tlakem chová jako nepolární rozpouštědlo a je tak schopen rozpouštět pevné vzorky. Dalšími pozitivními vlastnostmi nadkritického oxidu uhličitého jsou bezpečnost, netoxičita a nízká extrakční teplota. Účinnost extrakce lze vhodně

upravovat změnami tlaku a teploty. Jelikož je tato metoda rychlá a nepracuje s žádným z organických rozpouštědel, je proto vhodnou technikou pro potravinářský průmysl. Nevýhodou metody je omezená schopnost extrakce polárních látek a instrumentální náročnost [22, 23, 24].

### 3.10 Headspace

Další skupinou metod sloužících k izolaci těkavých látek jsou metody headspace (HS) založené na těkavosti stanovovaných látek. Těmito metodami jsou statický a dynamický headspace. Přední výhodou techniky nazývané **statický headspace (SHS)** je minimální manipulace se vzorkem, jelikož ten je pouze temperován v uzavřeném prostoru (např. ve vialce), dokud se nevytvoří rovnováha mezi kapalnou a plynnou fází. Na chromatografickou kolonu je následně zaveden pouze odebraný plynný podíl z prostoru nad hladinou. Speciálním příkladem statického headspace je mikroextrakce pevnou fází (viz kap. 3.7) [23, 24].

Při **dynamickém headspace (DHS)** je do prostoru nad vzorkem přiváděn inertní plyn, který následně prochází sorpční trubicí, ve které jsou zachycovány uvolněné těkavé látky. Zachycené látky jsou následně převedeny na chromatografickou kolonu.

Nevýhodou obou zmíněných metod je, že umožňují pouze detekci těkavých látek ze silně koncentrovaných vzorků [23, 24].



## 4 ANALYTICKÉ METODY VHODNÉ PRO STANOVENÍ TĚKAVÝCH LÁTEK

Separace je selektivní převod látek mezi fázemi systému, nebo jejich rozdělení pohybem v jedné fázi v určitém směru. Cílem je dosáhnout stavu, ve kterém lze identifikovat (stanovit) požadované složky studovaného systému měřením s požadovaným stupněm nejistoty co nejrychleji, nejsnadněji a pokud možno nejlevněji [25].

### 4.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC, Gass Chromatography) nese své označení podle skupenství mobilní fáze, kterou je plyn. V systému chromatografických metod zaujímá GC velmi významné místo a v průběhu let se stala jednou z nejrozšířenějších metod analytické chemie, což je dáno její jednoduchostí, citlivostí, vysokou separační účinností a rozsáhlými aplikačními možnostmi. Jako taková umožňuje GC identifikaci a stanovení nejen plynů, ale i látek kapalných a pevných, které lze definovaným způsobem převést do plynného skupenství [25, 26].

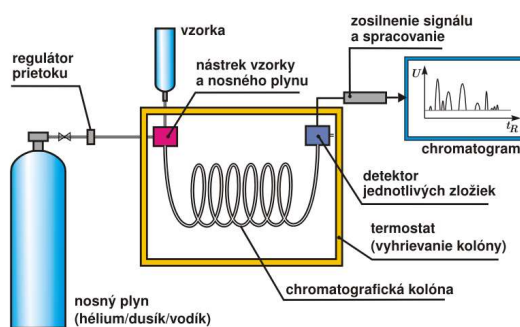
Tato metoda využívá rozdělení koncentrace analytu mezi stacionární a mobilní fázi na základě adsorpce a rozpouštění, přičemž se předpokládá, že toto rozdělení je rovnovážné. Jako zdroje pohybu mobilní fáze využívá tlakový spád. Stacionární fáze je uspořádána v koloně, na které probíhá nejdůležitější část chromatografického postupu. Tato metoda slouží ke kvalitativnímu a kvantitativnímu určení analytu, přičemž měřicí zařízení zaznamenává jeho signál, který je funkcí množství analytu a citlivosti [25, 26].

Mobilní fáze v plynové chromatografii je nejčastěji vodík a helium, méně často dusík, argon či oxid uhličitý. Je známo několik set různých stacionárních fází, ale zpravidla jsou využívány fáze pro adsorpční mechanismus (na bázi grafitizovaného uhlíku, uhlíkových molekulových sít, zeolitových molekulových sít, polymeru, silikagelu nebo oxidu hlinitého) a fáze pro rozpouštěcí mechanismus retence (alifatický uhlovodík pro nepolární fáze nebo polymer ethylen-glykolu pro polární fáze). Obecně platí, že siloxanové stacionární fáze jsou tepelně stabilní a v závislosti na složení funkčních skupin makromolekulárního řetězce pokrývají celý rozsah polarit [25].

Způsob dávkování vzorku je vždy podmíněn typem vzorku a analytickým zadáním. Zpravidla se vzorek dává injekční stříkačkou, která bývá konstrukčně uspořádána tak,

že buď umožňuje nasátí vzorku do kalibrované odměrné části stříkačky, přičemž jehla může být prázdná nebo rovněž naplněná vzorkem, druhý typ pracuje s naplněnou jehlou, přičemž skleněná kalibrovaná odměrná část vzorkem naplněna není [25].

Obraz průběhu separace v koloně je zprostředkován měřicím zařízením (tzv. detektor), do něhož ústí výstup kolony. Měřicí zařízení se neúčastní přímo separace, ale využívá fyzikálních principů, které převádějí množství analytu na elektricky měřitelnou veličinu označovanou jako signál [25].



Obrázek 9: Přístrojové vybavení plynové chromatografie [37].

#### 4.1.1 Detektory v plynové chromatografii

Plynová chromatografie se vyznačuje jak největší variabilitou detekčních možností, tak detektory s nejvyšší citlivostí a selektivitou mezi všemi separačními metodami [25].

##### Detektor elektronového zachytu (ECD, Electron Capture Detector)

Detektor tohoto typu využívá schopnost eluovaných látek vytvořit negativní iont zachycením nízkoenergetického elektronu. Tato schopnost závisí na elektronové konfiguraci atomů a molekul, obecně na elektronové afinitě. Jako zdroj ionizační energie používá radioaktivní zářič, nejčastěji  $^3\text{H}$  nebo  $^{63}\text{Ni}$ , o relativně vysoké energii (67 keV). Jelikož má emitované záření  $\beta$  příliš velkou energii, nemůže být elektronegativními atomy stanovované látky zachyceno. Detektor je tvořen malou kovovou komůrkou, na jejíchž vnitřních stěnách je umístěna fólie se zářičem. V komůrce jsou dvě sběrné elektrody a do komůrky ústí výstup kolony [25, 26].

Tento detektor má vysokou selektivitu k elektronegativním atomům a látkám obsahujícím halogenový atom v molekule (pesticidy, PCB apod.), proto je ECD intenzivně

využíván v analýzách složek životního prostředí, a to zpravidla v kombinaci s univerzálním detektorem, např. plamenově-ionizačním [26].

### **Detektor tepelné vodivosti (TCD, Thermal Conductivity Detector)**

Tento typ detektoru měří změny tepelné vodivosti mobilní fáze způsobené přítomností eluované látky. Detektor má dva paralelní kanálky, jeden referenční s konstantním průtokem nosného plynu a druhý měrný, který je připojen na výstup z kolony. V kanálcích jsou umístěna žhavená tělíska ve formě drátků zalitých ve skle, termistorů nebo transistorů. Tělíska bývají dvě nebo čtyři, podle způsobu elektronického zapojení [25].

Jedná se o univerzální detektor, jehož signál lze vypočítat z molekulových vlastností analytů a přiblížit se tak absolutním měřením a expertním systémům [16]. Jeho výhodou je, že signál poskytují všechny látky. Dále se jedná o typ nedestrukčního detektoru, který má poměrně široký lineárně dynamický rozsah. Přednostně se užívá při analýzách anorganických plynů a nízkomolekulárních organických látek. Velký význam má jeho průmyslové využití v oblasti kontroly technologických procesů a při analýzách složení atmosfér [26].

### **Plamenově-ionizační detektor (FID, Flame Ionization Detector)**

Podstata plamenově-ionizačního detektoru spočívá v měření změny ionizačního proudu vodíko-kyslíkového plamene způsobené přítomností eluovaného analytu. FID je tvořen hořákem, do kterého ústí výstup z kolony a přívod vodíku. Nad ústím hořáku jsou umístěny sběrné elektrody iontů a elektronů, které vznikly při hoření vodíku a analytu, a dále přívod vzduchu pro difúzní plamen [25].

FID nevykazuje selektivitu, je tedy univerzálním detektorem pro organické látky [25]. Je jedním z nejcitlivějších měřících zařízení v plynové chromatografii. Nejmenší detekovatelné množství činí řádově  $10^{-12}$  g·s<sup>-1</sup> a lineární dynamický rozsah se pohybuje v rozmezí šesti řádů [19]. FID ve spojení s GC je používán ke stanovení nejen hlavních složek analytu, ale také je schopen detekovat stopová množství látek v daném analytu [25].

### **Plamenově-fotometrický detektor (FPD, Flame Photometric Detector)**

Je založen na měření intenzity emise heteroatomů přítomných v molekule analytu. Detektor je tvořen hořákem, do kterého ústí výstup z kolony a přívod vodíku. Nad ústím hořáku je umístěn přívod vzduchu pro difúzní redukční plamen a světlovod.

FPD ve spojení s plynovou chromatografií vykazuje vysokou selektivitu pro organické látky obsahující fosfor, síru, halogen či skupinu CN v molekule, a proto je vhodný pro měření jejich stopových množství v komplexních maticích vzorků životního prostředí (pesticidů, PCB apod.), a to zpravidla v kombinaci s univerzálním detektorem, např. FID [25, 26].

### **Hmotnostně-spektrometrický detektor (MS, Mass Spectrometric Detector)**

Jedná se o nejčastěji používaný detektor v kombinaci s plynovou chromatografií. U MS však nelze hovořit o detektoru ve stejném slova smyslu jako u výše uvedených detektorů. Důvodem je, že na rozdíl od výše uvedených, může být MS používán jako samostatný analytický nástroj. Řada jeho detekčních variant vede k vysoké selektivě a snížení zbytkové nejistoty identifikace, proto je MS používán pro analýzy komplexních matic. Jeho citlivost je však až 1000krát menší než FIDu, proto pro zajištění citlivých a selektivních měření je velmi časté spojení detektorů FID-MS [25].

Hmotnostní spektrometrii je věnována následující kapitola.

## **4.2 Hmotnostní spektrometrie**

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda vhodná pro určování hmotností atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné nebo záporné ionty. Těžištěm analytického využití hmotnostní spektrometrie je především stopová analýza organických látek s důrazem na zjištění jejich struktury. Ve spojení s plynovou chromatografií (GC-MS) výrazně zvyšuje selektivitu a umožňuje provádět identifikaci komponent vzorku ve složité matici. V GC-MS pak hmotnostní spektrometr vystupuje jako strukturně selektivní nástroj umožňující, jak registraci zón látek eluovaných z kolony, tak i jejich identifikaci na základě získaného hmotnostního spektra [25].

Základními stavebními prvky hmotnostního spektrometru jsou:

1. **Iontový zdroj** - slouží k převedení analyzované látky do ionizovaného stavu.
2. **Hmotnostní analyzátor** - slouží jako disperzní prvek a umožňuje rozdělit v prostoru nebo čase směs iontů o různých poměrech hmotnosti k náboji ( $m/z$ ), produkovanou v iontovém zdroji.
3. **Detektor** - poskytuje analogový signál úměrný počtu dopadajících iontů.

Signál je po digitalizaci převeden do **počítače** s vhodným softwarovým vybavením a zpracován do formy hmotnostních spekter. Počítač zajišťuje, kromě sběru dat v reálném čase a jejich zpracování, rovněž řídicí a kontrolní funkce související s chodem přístroje a optimalizací jeho provozních parametrů. MS je zařízení pracující za velmi nízkých tlaků, proto je součástí také výkonný, nejčastěji dvoustupňový **vakuový čerpací systém**, umožňující udržet dostatečně nízký tlak za všech provozních podmínek. Nedílnou součástí je i vhodný **vstup** sloužící k převedení vzorku analyzované látky z vnějšího prostředí do prostoru iontového zdroje. V případě kombinace GC-MS je do prostoru iontového zdroje přiváděna mobilní fáze spolu s látkami vystupujícími z kolony, buď přímo, nebo přes vhodné **rozhraní** snižující podíl mobilní fáze [25].

#### 4.2.1 Iontové zdroje

Nezbytným předpokladem MS analýzy je ionizace analyzované látky, jejíž energetická náročnost závisí na typu analytu. Prahová ionizační energie pro většinu organických látek se pohybuje v rozmezí 7–16 eV, děje přesahující tuto hodnotu vedou k přechodu látky do ionizovaného stavu [25].

Podle množství dodané energie se ionizační techniky dělí na tzv. **měkké**, při nichž je přebytek energie dodaný ionizované molekule malý a pravděpodobnost fragmentace nízká, a **tvrdé**, při nichž dodaná energie poskytuje rozsáhlejší fragmentace vzniklého iontu [25].

## a) měkké ionizační techniky

### **Chemická ionizace (CI, Chemical Ionization)**

Chemická ionizace je běžně používaná měkká ionizační technika z plynné fáze. Spolu s ionizací elektrony (blíže viz tvrdé ionizační techniky) se běžně využívá u kombinace GC-MS. Primárním zdrojem je proud urychlených elektronů, jejichž energie je přenášena na ionizovanou molekulu přes reakční plyn (např. methan, dusík). Výběr reakčního média značně ovlivňuje množství energie předané při ionizaci, a tím i rozsah možných fragmentací [25].

Jako zdroj elektronů se nejčastěji používá elektricky žhavené vlákno např. wolframové, které slouží jako katoda. Proud elektronů je směřován prostorem iontového zdroje k anodě. Za standardní energii, která zajišťuje vznik maximálního počtu iontů a jejich rozsáhlou fragmentaci, se považuje 70 eV [25].

### **Termosprejová ionizace (TSI, Thermospray Ionization)**

Tato technika je jednou z nejstarších sprejových ionizačních technik řadící se do měkkých ionizačních technik v kapalně fázi, které jsou vhodné pro kombinaci hmotnostního spektrometru s vysokoúčinným kapalinovým chromatografem (HPLC-MS) a kapilární elektroforézou (CE-MS) [25].

Charakteristický znak této metody představuje kovová kapilára vyhřívaná na teplotu 200–300 °C, do které je veden výstup z chromatografické kolony. Při této teplotě dojde k prudkému varu mobilní fáze a tím k tzv. přímému vypaření iontů z kapalně fáze do plynně. Vzniklé ionty jsou vedeny vstupní štěrbinou přes iontovou optiku do hmotnostního analyzátoru. Nevýhodou chemické ionizace je závislost výtěžku ionizace na složení mobilní fáze a teplotě vyhřívané kapiláry, proto je tento způsob nevhodný pro termolabilní látky [25].

### **Elektrosprejová ionizace (ESI, Electrospray Ionization)**

Elektrosprej je v současnosti nejpoužívanější iontový zdroj pro kombinaci HPLC-MS, což je dáno zdaleka nejširší oblastí aplikací, ve kterých lze tento iontový zdroj využít. K rozprášení kapalně fáze dochází mezi ústím kapiláry, na kterou je vloženo vysoké napětí a protielektrodou, jež je uzemněna. Rozprášené drobné kapičky kapalně fáze jsou rychle vysušeny proudem inertního plynu ( $N_2$  o teplotě 200–300 °C) a mechanismem iontového

vypařování přecházejí přímo do plynné fáze. Vzniklé ionty jsou vedeny vstupní šěrbinou přes iontovou optiku do hmotnostního analyzátoru. Ve spektrech prvního řádu pozitivně nabitých částic lze běžně pozorovat nejen protonovanou formu molekulového iontu  $[M+H]^+$ , ale také jeho sodné  $[M+Na]^+$ , draselné  $[M+K]^+$  či amonné  $[M+NH_4]^+$  adukty. Pro negativní skenovací mód je pak typická přítomnost deprotonovaného molekulového iontu  $[M-H]^+$ , který může být nejčastěji doprovázen chloridovým  $[M+Cl]^-$  aduktem molekulového iontu. Při této ionizační technice může docházet k tvorbě vícekrát nabitých iontů (2–8krát), což umožňuje i analýzu sloučenin s relativně velkou molekulovou hmotností [24, 25].

### **Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionization)**

Tento iontový zdroj je stejně jako TSI a ESI zařazen do kategorie měkkých ionizačních technik pro kapalnou fázi. Vzorek je přiveden do vyhřívané části iontového zdroje (až 700 °C), kde dochází k efektivnímu rozprášení a odpaření kapalně fáze společně s rozpouštědlem. Ionizace probíhá v koronovém výboji pomocí jehly, na kterou je vloženo vysoké napětí. Vzniká vyšší energetická ionizace oproti ESI, čímž dochází k větší fragmentaci vzorku. Hlavním rozdílem APCI je, ve srovnání s ESI, nemožnost vytvářet sodné, amonné, draselné či chloridové adukty v průběhu ionizace, což znamená, že ve spektrech prvního řádu lze pozorovat pouze protonovanou, příp. deprotonovanou formu molekulového iontu. Tento fakt je způsobem tvorbou kapiček s menším povrchem než je tomu v případě ESI a také vlivem rychlejšího sušícího procesu vznikajících kapiček. Určitou nevýhodou tohoto iontového zdroje je oblast, v níž jej lze aplikovat. APCI nachází uplatnění pouze při analýze nepolárních nízkomolekulárních sloučenin (zpravidla  $<500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Modifikacemi této metody mohou být např. APPI (fotoionizace za atmosférického tlaku) nebo APLI (laserová ionizace za atmosférického tlaku) [24, 25].

### **Ionizace urychlenými atomy (FAB, Fast Atom Bombardment)**

Vzorek je nanesen spolu s matricí (glycerol) na vzorkovací terčík a je ionizován proudem urychlených atomů Xe nebo Ar. Metoda je vhodná pro široké spektrum látek, a ionizace je relativně šetrná. Nevýhodami této metody jsou instrumentální náročnost a obsah kontaminujících iontů z matrice ve výsledném spektru [23, 24].

### **Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)**

V případě této techniky je analyzovaná látka nanесena společně s matricí na terčík, kde dochází ke krystalizaci obou složek. Jako matrice se využívají látky schopné absorbovat energii laseru a následně ionizovat analyt (kyselina  $\alpha$ -hydroxyskořicová). Díky tvorbě mnohonásobně nabitých iontů (až 20krát) umožňuje tato technika analyzovat sloučeniny s relativně velkou molekulovou hmotností (např. proteiny) [24].

### **b) tvrdé ionizační techniky**

#### **Ionizace elektrony (EI, Electron Impact)**

Jedna z doposud nejpoužívanějších tvrdých ionizačních technik v plynné fázi obzvláště ve spojení s GC-MS. Energetickým procesem vedoucím k tvorbě iontů je interakce molekul analytu s proudem urychlených elektronů. Vznikají spektra bohatá na fragmenty. Konstrukce iontového zdroje je prakticky totožná s konstrukcí zdroje pro chemickou ionizaci (viz Chemická ionizace), proto se u většiny moderních hmotnostních spektrometrů využívá kombinovaný zdroj EI-CI umožňující používat obě ionizační techniky [24, 25].

## **4.2.2 Hmotnostní analyzátory**

### **Magnetický hmotnostní analyzátor (Magnetic Mass Analyzer)**

Je nejstarším typem hmotnostního analyzátoru. Z hlediska hmotnostního rozsahu a rozlišení je to velmi kvalitní disperzní prvek. Umožňuje prostorové rozdělení monoenergetického svazku iontů podle  $m/z$ . Konstrukčně se jedná o elektromagnet, mezi jehož pólovými nástavci mohou procházet ionty [25].

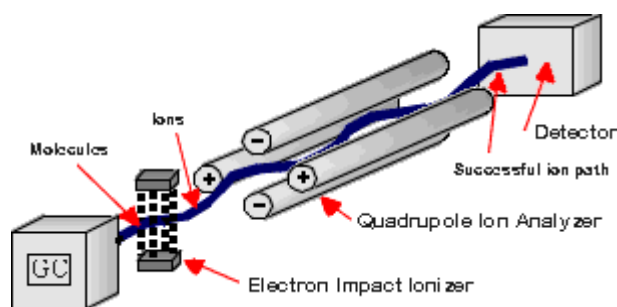
### **Kvadrupólový analyzátor (Q, Quadrupole)**

Kvadrupól se běžně uplatňuje u hmotnostních spektrometrů určených pro spojení s plynovou chromatografií (GC), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) či kapilární elektroforézou (CE). Konstrukčně se jedná o čtyři kovové tyče kruhového nebo hyperbolického průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. Zařízení se chová jako hmotnostní filtr nastavený



na určitou hodnotu  $m/z$ . Postupnou změnou napětí na kvadrupól je možno nechat tímto filtrem projít jen ionty ve zvoleném intervalu hodnot  $m/z$  [25].

Hlavní výhodou tohoto analyzátoru je možnost rychlé změny hodnot napětí vkládaných na tyče, což umožňuje zvolit rychlý sken a mnohonásobně zaznamenat hmotnostní spektra i velmi úzkých chromatografických píků. Další výhodou je relativně rychlý záznam měřeného spektra a linearita stupnice  $m/z$ . Nevýhodou kvadrupólu je jeho nízké rozlišení a rozsah hodnot  $m/z$  (40–4000). Využití nalézá při analýzách anorganických a lehkých až středně velkých organických sloučenin. U tohoto typu analyzátoru není možné měřit tandemová spektra, to je možné pouze ve spojení s tandemovým uspořádáním MS. Příkladem může být použití trojitého kvadrupólu (QqQ) nebo kombinace hmotnostních analyzátorů Q-TOF. Ve spojení s ESI je možná rovněž analýza peptidů a malých proteinů [24, 25].



Obrázek 10: Kvadrupólový analyzátor [36].

### **Iontová past (IT, Ion-trap)**

Iontová past je trojrozměrnou obdobou kvadrupólového analyzátoru, která umožňuje pomocí střídavého elektrického pole uzavřít ionty v ohraničeném prostoru. Hmotnostní rozsah (až 10 kDa) a relativně vysoké rozlišení umožňují využití iontové pasti v oblasti GC-MS při analýzách stopových množství organických látek a to i pro analýzy vysokomolekulárních látek. Jednou z největších výhod tohoto hmotnostního analyzátoru je možnost provádět fragmentaci vybraných iontů do více stupňů obecně označovanou ( $MS^n$ ). Iontové pasti dostupné na trhu umožňují fragmentaci v rozmezí  $MS^6$ – $MS^{11}$  [24, 25].

### **Průletový analyzátor (TOF, Time of Flight)**

Principiálně jde o nejjednodušší typ hmotnostního analyzátoru, který je tvořený pouze evakuovanou trubicí. K časovému rozdělení iontů o rozdílných hodnotách  $m/z$  dochází na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru, tzn. že lehčí

iont uletí danou vzdálenost v kratším čase. Hlavní předností tohoto zařízení je teoreticky neomezený hmotnostní rozsah [24].

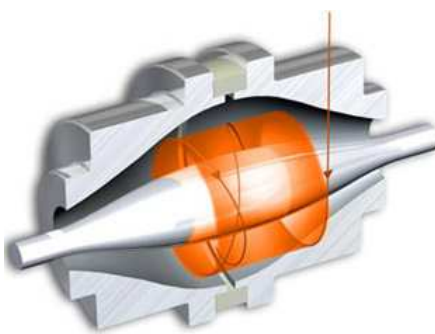
Průletový analyzátor existuje v dnešní době ve dvou možných provedeních a to, jako *lineární TOF analyzátor*, a nebo jako *TOF analyzátor s reflektorem*. Reflektornový analyzátor umožňuje dosažení vyšší přesnosti a rozlišení hmotnostního spektra analyzované látky, ale jeho hmotnostní rozsah je limitován. Naopak lineární TOF nedosahuje takové přesnosti, ale výhodou je jeho neomezený hmotnostní rozsah ( $m/z$ ) [24].

Převážně se TOF analyzátor používá v kombinaci s iontovým zdrojem MALDI (MALDI-TOF), výjimkou není ani spojení s ESI (ESI-TOF). V současnosti se tento analyzátor používá v kombinaci s HPLC pro analýzu vysokomolekulárních látek a v kombinaci s kvadrupólovými hmotnostními analyzátory u hybridních tandemových přístrojů pro fragmentaci do n-tého stupně ( $MS^n$ ) [24, 25].

### Orbitrap

Tento hmotnostní analyzátor, nazývaný také jako Orbitrap hmotnostní analyzátor, je jedním z nejnovějších a nejmodernějších. Dosahuje vysoké přesnosti a rozlišení (až 150 000), což nalézá uplatnění v řadě biochemických aplikací hmotnostní spektrometrie [24].

Ionty v orbitrapu neoscilují pouze radiálním směrem kolem centrálního vřetena, ale také kolem jeho os. Jestliže je orbitrap v kombinaci s ESI je schopen analýzy vysokomolekulárních látek např. biopolymerů [24].



Obrázek 11: Orbitrap [37].

### Cyklotron (ICR, Ion-Cyclotron Resonance)

ICR analyzátor je v dnešní době nejkvalitnějším rozlišovacím analyzátozem na trhu, umožňujícím rozlišení nad 150 000, což zdaleka přesahuje všechny komerčně dostupné analyzátozy (Q, IT, TOF). Cyklotron pracuje s vysokým magnetickým polem supravodivého magnetu, které způsobuje rotaci iontů i uvnitř buněk analyzované látky [24].

#### 4.2.3 Detektory v MS

Detektory používané v hmotnostní spektrometrii je možné rozdělit do dvou kategorií. Detektory pro přímá měření, kde detekující elektrický proud vzniká dopadem iontů (elektronnásobičové detektory) a násobičové detektory, které využívají efekt násobení elektronů vzniklých po dopadu iontů a poskytující měřitelné signály i pro jednotlivé ionty (fotonásobičové) [25].

#### Elektronnásobičové detektory

Tyto detektory se používají např. pro měření přesného izotopového zastoupení prvků při určování stáří hornin. Jsou většinou součástí specializovaných zakázkových systémů. Existují dva typy elektronnásobičových detektorů:

1. *s diskrétním dynodovým polem* – série tvarovaných kovových destiček (dynod) elektricky propojených přes vhodné odpory tak, že po vložení vysokého napětí mezi první a poslední řadu dynod jsou elektrony urychlovány směrem k následující dynodě a nakonec zachyceny kolektorem. Po dopadu iontu jsou z materiálu první konverzní dynody vyraženy elektrony, jejichž počet se dopadem na další dynody násobí. Běžné je žaluziové uspořádání zabraňující zpětné emisi náhodně vzniklých kladných iontů do vstupního prostoru. Tyto násobiče se většinou konstruují jako 17–20 stupňové a dosahují zesílení  $10^7$ – $10^8$  [25].
2. *s kontinuální dynodou* – zakřivená trubice z olovnatého skla s vysokým elektrickým odporem, pokrytá na vnitřní straně vrstvičkou oxidu berylnatého nebo hlinitého. Kontakty na obou koncích trubice jsou připojeny ke zdroji vysokého napětí. Elektrony, které jsou po dopadu iontu vyraženy z materiálu trubice, jsou urychlovány elektrickým polem

směrem ke kolektoru. Opakovanými nárazy na stěnu trubice spojenými s emisí dalších elektronů jejich počet lavinově roste. Zakřivení trubice brání průchodu náhodně vzniklých kladných iontů do vstupního prostoru násobiče [25].

### **Fotonásobičové detektory**

Při použití tohoto typu detektoru jsou ionty na pomocné kovové elektrodě předem konvertovány na elektrony, ty po dopadu na scintilační stínítko poskytují fotony, jež vstupují do fotonásobiče. Tento typ je konstrukčně složitější než elektronásobičový detektor, ale má vyšší citlivost a delší životnost, jelikož vnitřek fotonásobiče není ve styku s vnitřním prostředím MS [25].

Závěrem této kapitoly lze uvést, že hmotnostní spektrometrie umožňuje značnou variabilitu při sestavování požadovaného typu přístroje. V podstatě záleží jen na požadavcích a pochopitelně také na finančních možnostech daného zákazníka. Konečný produkt pak může mít mnoho podob, kdy nejběžnějšími kombinacemi jsou EI-Q-MS, ESI-QqQ-MS, MALDI-Q-TOF-MS či ESI-IT-MS [24].

## **II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 5 EXTRAKCE VZORKŮ A ANALÝZA ZÍSKANÝCH EXTRAKTŮ

### 5.1 Materiál

Všechny vzorky nefermentovaných zelených čajů (Obrázek 12) byly zakoupeny v komerční síti se zaměřením na nejvyšší kvalitu dostupnou na tuzemském trhu a použity bez další úpravy.

Vzorek č. 1: Assam green tea – země původu: Indie

Vzorek č. 2: Gundpowder green tea – země původu: Čína

Vzorek č. 3: Lung Ching „Dračí studna“ green tea – země původu: Čína

Vzorek č. 4: Sencha green tea – země původu: Čína



Obrázek 12: Vzorky použitých zelených čajů (zleva: vzorek 1 – Assam Green Tea, vzorek 2 – Extra Gundpowder Green Tea, vzorek 3 – Lung Ching Green Tea, vzorek 4 – China Sencha Green Tea)

## 5.2 Popis extrakčních metod

### 5.2.1 Destilace vodní parou

Do 500 cm<sup>3</sup> destilační baňky bylo naváženo 10 g (s přesností na 0,1 g) příslušného vzorku čaje, poté bylo do baňky přidáno 250 cm<sup>3</sup> destilované vody. V okamžiku prokazatelného úniku vodní páry z vyvíječky páry byla celá aparatura uzavřena a bylo přistoupeno k destilaci (pro přenos páry z vyvíječky do destilační baňky byla použita měděná trubka). Jako přímý zdroj tepla bylo použito topné hnízdo. Destilace byla prováděna buďto po dobu 2 hodin, nebo do okamžiku získání cca 500 cm<sup>3</sup> kapalného podílu v předloze. Po ukončení destilace byl získaný kapalný podíl extrahován 6 × 20 cm<sup>3</sup> dichlormethanu. Spojené organické podíly byly promyty nasyceným roztokem chloridu sodného (2 × 15 cm<sup>3</sup>), vysušeny nad síranem sodným a poté zahuštěny za vakua na objem 0,5 cm<sup>3</sup>. Takto získaný extrakt byl po přidání vnitřního standardu (kap. 5.3.2) připraven k analýze metodou GC-MS.

### 5.2.2 Simultánní destilace a extrakce

Jednotlivé reakce byly prováděny v Likensonově-Nickersonově aparatuře. Do 500 cm<sup>3</sup> destilační baňky bylo naváženo 10 g (s přesností na 0,1 g) příslušného vzorku čaje, poté bylo do baňky přidáno 250 cm<sup>3</sup> destilované vody. Do druhé destilační baňky o objemu 250 cm<sup>3</sup> bylo přidáno 100 cm<sup>3</sup> dichlormethanu. Extrakce byla prováděna po dobu 1,5 hodiny nebo do okamžiku vydestilování cca 70 °C organického podílu s tím, že získané organické podíly byly jímány do Erlenmeyerovy baňky se zábrusem o objemu 100 cm<sup>3</sup>. Spojené organické podíly byly vysušeny nad síranem sodným a poté zahuštěny za vakua na objem 0,5 cm<sup>3</sup>. Takto získaný extrakt byl po přidání vnitřního standardu (kap. 5.3.2) připraven k analýze metodou GC-MS.

## 5.3 Analýza těkavých látek metodou GC-MS

### 5.3.1 Popis instrumentace a parametrů analýz GC-MS

Analýzy všech studovaných vzorků (kapitola 4.1) metodou GC-MS byly prováděny na plynovém chromatografu GC-2010 (Shimadzu) spojeného s hmotnostním spektrometrem GCMS-QP2010 (Shimadzu) vybaveným kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem (Příloha I). Jednotlivé vzorky byly do plynového chromatografu přiváděny

pomocí mikrostříkačky (Hamilton) v objemu 1,0  $\mu\text{l}$ . Nejdůležitější parametry měření jsou uvedeny níže.

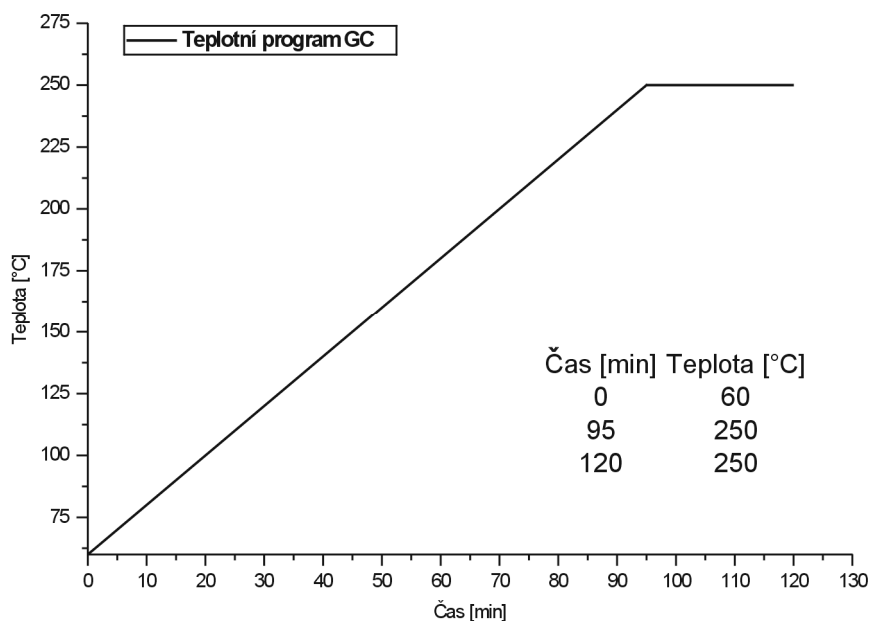
#### Vybrané parametry pro GC

Chromatografická kolona:	Equity <sup>TM</sup> -1 (30 m $\times$ 0,32 mm $\times$ 1,0 $\mu\text{m}$ ; Supelco)
Teplotní program [14]:	60 °C/0 min; 2 °C/min zvýšení na 250 °C/25 min (Obrázek 13)
Tlak na koloně:	20,8 kPa
Nosný plyn:	Helium
Průtok nosného plynu:	45 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$
Injekční mód:	Splitovací
Splitovací poměr:	50,0
Teplota nástřiku:	250 °C

#### Vybrané parametry pro MS

Skenování mód:	Pozitivní
Ionizace:	Ionizace elektrony
Iontový zdroj:	70 eV, 200 °C
Interface:	250 °C
Skenovací rychlost:	10 000 $m/z\cdot\text{s}^{-1}$
Počátek analýzy:	4,50 min
Konec analýzy:	119,9 min
Rozsah $m/z$ :	40–450





Obrázek 13: Teplotní program na chromatografické koloně během analýzy GC-MS.

Pro samotná měření, stejně jako pro vyhodnocování výsledků jednotlivých analýz, byl používán software GC-MS Solution typu Real time analysis a Postrun analysis. Při kvantifikaci jednotlivých látek byla plocha všech píků vztažena vůči ploše píku vnitřního standardu (kap. 5.3.2). Při určování struktury jednotlivých látek byla použita integrovaná knihovna hmotnostních spekter NIST 02.

### 5.3.2 Příprava interního standardu

Jako interní standard (IS) byl zvolen ethyl-dekanoát [11, 12], který byl zakoupen z komerčních zdrojů (Sigma-Aldrich) v analytické kvalitě a na základě provedené analýzy GC-MS (kap. 7.1) byl používán bez jakýchkoliv dalších úprav. Při přípravě IS bylo postupováno následujícím způsobem. Nejprve byl připraven zásobní roztok IS o koncentraci  $5 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ , kdy bylo do  $10 \text{ cm}^3$  dichlormethanu přidáno  $50 \mu\text{l}$  IS. Ze zásobního roztoku IS bylo vždy bezprostředně před samotnou analýzou GC-MS odebráno takové množství, aby výsledná koncentrace IS v analyzovaném extraktu činila  $0,1 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### 5.3.3 Příprava vzorků pro GC-MS

Extrakty získané ze všech studovaných vzorků čaje byly zahuštěny za vakua na objem  $0,5 \text{ cm}^3$  a uchovávány ve skleněných vialkách pod ochrannou argonovou atmosférou při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  na tmavém místě. Veškeré vzorky byly analyzovány metodou GC-MS (po

přidání IS, viz kap. 5.3.2) v co nejkratší možné době od jejich získání, nejpozději však do 24 hodin.

### **III. VÝSLEKDY A DISKUZE**

## 6 EXTRAKCE TĚKAVÝCH LÁTEK

Pro extrakci těkavých látek z nefermentovaných čajů byly použity 4 různé druhy zeleného čaje zakoupené v komerční síti (viz kap. 5.1). U každého ze studovaných vzorků čaje byly provedeny 2 různé typy extrakce, a sice destilace vodní parou a simultánní destilace-extrakce, přičemž každý experiment byl, s cílem ověřit opakovatelnost dané extrakční metody, proveden dvakrát.

Nutno podotknout, že byla vyzkoušena také Soxhletova extrakce, nicméně od této metody bylo po několika úvodních experimentech ustoupeno. Důvodem bylo prokazatelné znečišťování systému GC-MS při analýzách vzorků získaných touto metodou, kdy docházelo k velmi rychlému zanášení části hmotnostního spektrometru (tzv. lineru), který tak musel být opakovaně čištěn. I přes zavedení několika opatření (snížení koncentrace vzorků, opakovaná filtrace získaného extraktu) se nepodařilo výše zmiňované komplikace odstranit, proto bylo od této extrakční metody upuštěno.

### 6.1 Destilace vodní parou

Pro destilaci vodní parou byla použita klasická aparatura s vyvíječkou vodních par. Páry mohou být do destilační baňky s extrahovaným vzorkem vedeny pomocí několika nosičů. Pro potřeby této práce byly vyzkoušeny celkem tři, a sice silikonová hadice, polyethylenová hadice a měděná trubka.

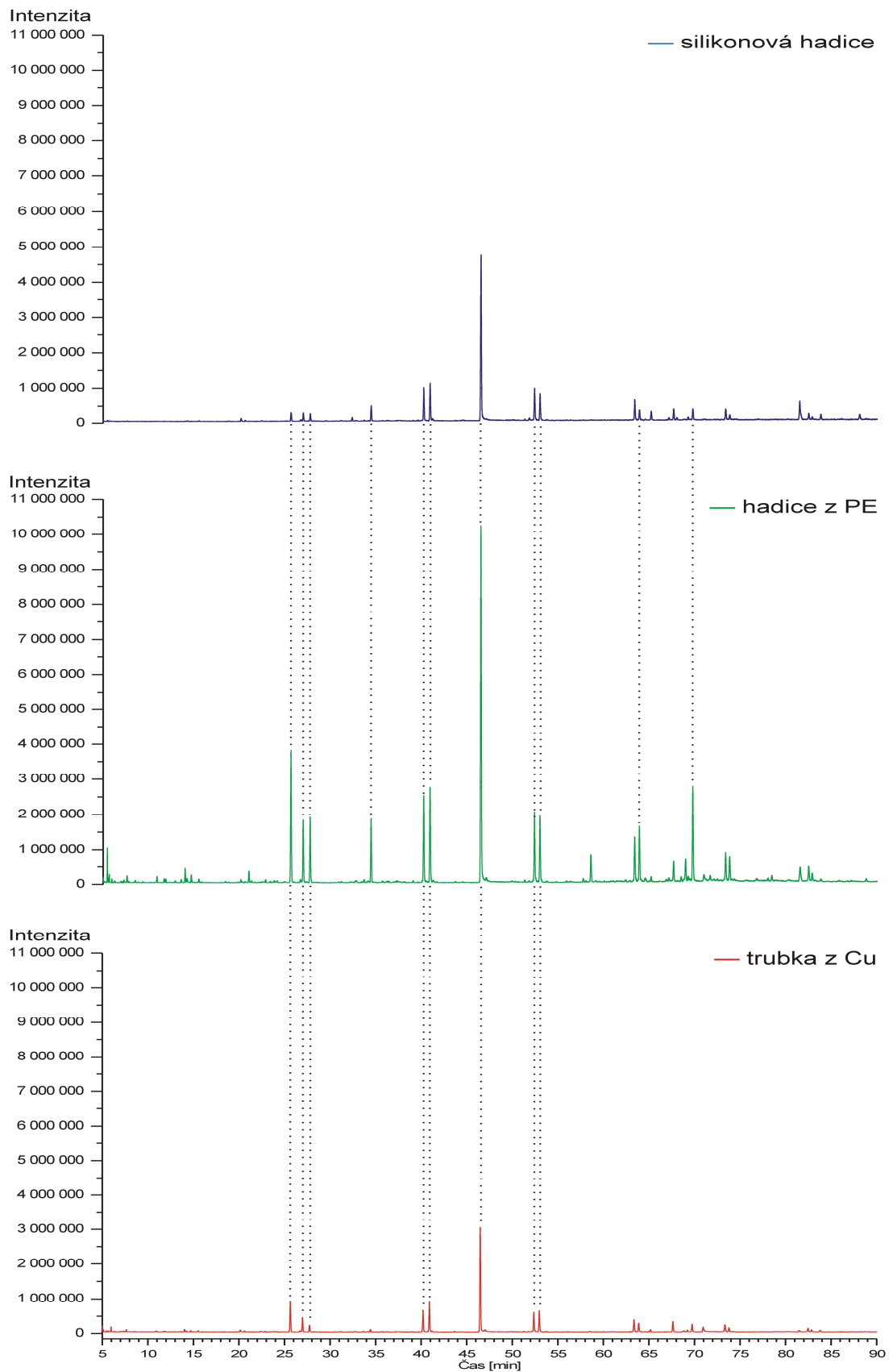
Pro zjištění, který z uvedených nosičů bude nejvhodnější pro vedení par, a za účelem ověření jejich čistoty byly provedeny slepé pokusy, které byly analyzovány metodou GC-MS. Ze získaných dat byla jako nejvhodnější médium pro přenos vodních par zvolena měděná trubka, která prokazovala oproti silikonové a polyethylenové (PE) hadici nejnižší koncentraci znečišťujících látek. Z chromatogramů uvedených na Obrázku 14 je patrné, že v případě PE hadice byla intenzita a množství kontaminujících látek nejvyšší. Ve všech slepých pokusech bylo identifikováno celkem 12 shodných kontaminantů (Příloha II: Tabulka kontaminantů), převážně vyšších uhlovodíků, silikátů a ftalátů. Nejvýznamnějším z nich a zároveň nejintenzivnějším byl 2,4-di-*tert*-butylfenol, který se používá jako antioxidační činidlo nejen v potravinářství, ale také v jiných průmyslových odvětvích, např. při výrobě různých typů hadic a plastů. Vzhledem k tomu, že výskyt kontaminujících látek byl pozorován i při použití měděné trubky, lze uvažovat, že mohou pocházet z jiné části

aparatury (např. z pryžové zátky uzavírající ústí vyvíječky vodních par). V úvahu přicházela rovněž možnost, že původcem kontaminace může být použité rozpouštědlo (dichlormethan) či interní standard. Ty možnosti však byly, na základě provedených analýz GC-MS (Obrázek 16 a 17, strana 51 a 52), vyloučeny.

Vzhledem k tomu, že nejnižší obsah kontaminujících látek byl pozorován při použití měděné trubky, bylo pro celou sérii experimentů s reálnými vzorky použito pro přenos vodních par právě toto médium. Při vyhodnocování získaných chromatogramů pak nebyly píky pozorované ve slepých pokuse brány v úvahu.

Následně byla provedena optimalizace metody s použitím reálných vzorků. Byl sledován průběh extrakce, z čehož bylo stanoveno, že ideální doba extrakce je 2 hodiny, případně doba, po kterou dojde k vydestilování 500 cm<sup>3</sup> extraktu (vždy >1,5 hodiny). Součástí optimalizace metody byla také volba správného typu organického rozpouštědla, do kterého by se ideálním způsobem extrahovaly všechny těkavé látky ze získaných destilátů. Předem bylo vyloučeno použití nepolárních alifatických rozpouštědel jako je např. hexan. Důvodem nebyla pouze obava z možného obsahu jiných uhlovodíků, ale také nižší extrakční schopnost tohoto typu rozpouštědel. Nakonec byla vybrána dvě rozpouštědla, a sice dichlormethan a diethylether. Jako vhodnější rozpouštědlo byl vybrán dichlormethan, jelikož při použití diethyletheru docházelo ke vzniku žluté pěny, která znemožňovala oddělení organického podílu od vodné fáze (nepomohlo ani přidání nasyceného roztoku chloridu sodného).

Po samotné extrakci vodné fáze organickým rozpouštědlem byly získané organické podíly promyty nasyceným roztokem chloridu sodného (z důvodu odstranění molekul vody) a následně po dobu 12 hodin dosušeny na tmavém místě nad síranem sodným. Poté byly organické podíly zahuštěny na rotační vakuové odparce na objem 0,5 cm<sup>3</sup> a profouknuty inertním plynem (argonem). Takto získaný extrakt byl (po přidání interního standardu) co nejdříve analyzován metodou GC-MS.

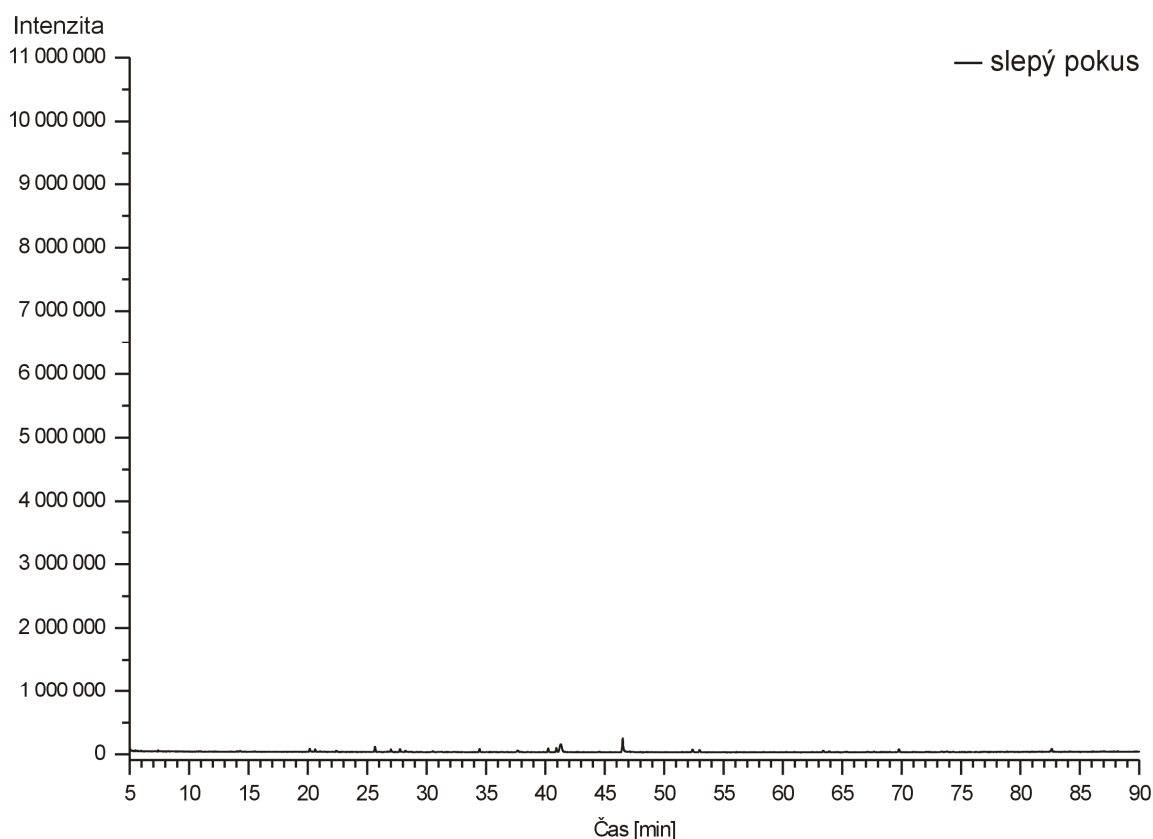


Obrázek 14: Destilace vodní parou – chromatogramy slepých pokusů.

## 6.2 Simultánní destilace-extrakce

Pro simultánní destilaci-extrakci byla použita Likensonova-Nickersova aparatura [32], v níž dochází ke společné kondenzaci par těkavých látek zkoumaného materiálu společně s parami organického rozpouštědla.

Stejně jako u destilace vodní parou, byl nejprve proveden slepý pokus. Chromatogram získaný metodou GC-MS (Obrázek 15) obsahoval taktéž kontaminanty strukturně podobné již detekovaných kontaminantům z destilace vodní parou (kap. 6.1) avšak ve velmi nízké koncentraci. Na základě toho, nelze s určitostí poukazovat na zdroj, ze kterého tyto látky pocházejí. Stejně jako v případě destilace vodní parou, nebyly také v případě SDE tyto látky při vyhodnocování získaných výsledků uvažovány.



Obrázek 15: SDE – chromatogram slepého pokusu.

Stejně jako v případě destilace vodní parou, byl také při extrakci těkavých látek ze zkoumaných vzorků použit jako organické rozpouštědlo dichlormethan. Vzhledem k odlišnému principu této metody, byly získané organické podíly přímo obsahující těkavé

látky převáděny přímo z aparatury do Erlenmeyerovy baňky. Následně byly spojené organické podíly vysušeny po dobu 12 hodin sušeny nad síranem sodným na tmavém místě. Další postup byl analogický jako u destilace vodní parou.

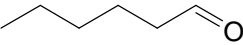
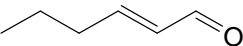
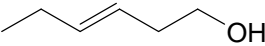
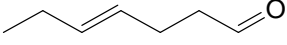
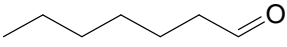
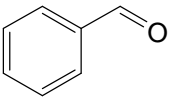
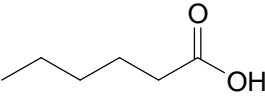


## 7 ANALÝZA TĚKAVÝCH LÁTEK METODOU GC-MS

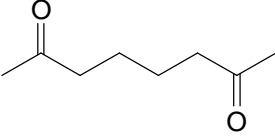
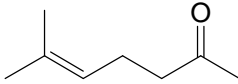
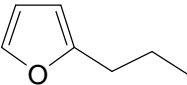
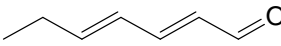
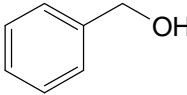
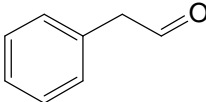
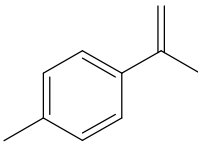
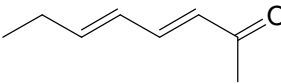
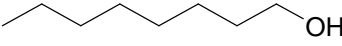
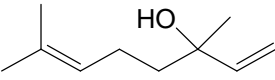
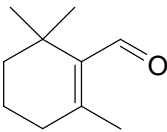
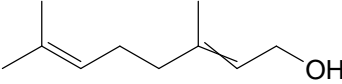
Obsah těkavých látek v získaných extraktech všech vzorků čaje byl studován metodou GC-MS. Všechny zahuštěné extrakty obsahující interní standard byly měřeny vždy duplicitně pro potvrzení opakovatelnosti metody GC-MS. Ve všech případech byla zjištěná experimentální chyba menší než 5 %, a byla tedy v souladu s limitem určujícím opakovatelnost GC. Vzniklé chyby jsou způsobeny experimentální chybou dané extrakční metody a bude o nich pojednáno v následujících kapitolách.

Následně byly získané výsledky vyhodnoceny za použití softwarového vybavení GC-MS tzv. Postrun analysis, díky které byla detekována přítomnost a navržena struktura těkavých látek obsažených v jednotlivých vzorcích. Na základě toho byl vytvořen seznam všech identifikovaných těkavých látek (Tabulka 1) vyskytujících se v analyzovaných vzorcích zelených čajů seřazených vzestupně dle jejich specifických retenčních časů ( $t_R$ ). Pro snadnější orientaci případného čtenáře v textu je seznam všech identifikovaných látek přiložen k diplomové práci ve formě tzv. „handoutu“.

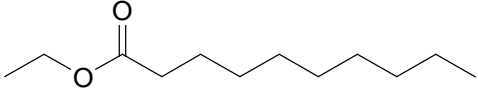
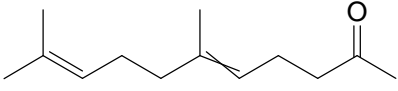
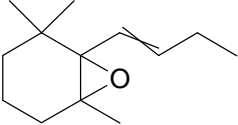
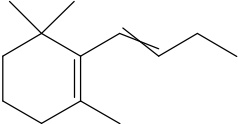
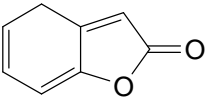
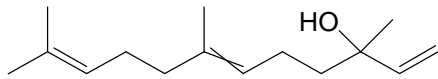
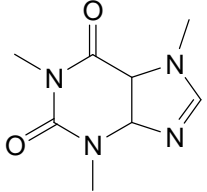
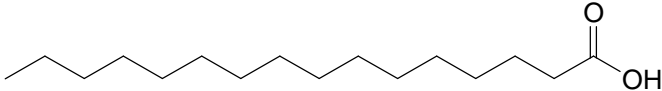
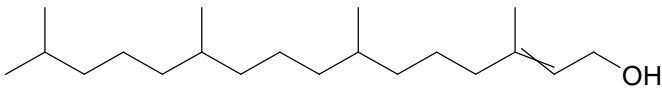
Tabulka 1: Seznam všech identifikovaných těkavých látek.

Číslo látky	$t_R$ [min]	Název sloučeniny	Strukturní vzorec
1	4,94	hexanal	
2	6,43	(2 <i>E</i> )-hex-2-enal	
3	6,85	(3 <i>E</i> )-hex-3-en-1-ol	
4	8,25	(4 <i>E</i> )-hept-4-enal	
5	8,45	heptanal	
6	10,82	benzaldehyd	
7	12,31	hexanová kyselina	

Tabulka 1: pokračování

8	12,48	oktan-2,7-dion	
9	12,57	6-methylhept-5-en-2-on	
10	12,89	2-propylfuran	
11	13,56	(2E,4E)-hepta-2,4-dienal	
12	14,92	benzylalkohol	
13	15,22	benzenacetaldehyd	
14	16,04	limonen	
15	17,3	(3E,5E)-okta-3,5-dien-2-on	
16	18,07	oktan-1-ol	
17	19,93	linalool	
18	27,38	$\beta$ -cyklocitral	
19	30,0	geraniol	

Tabulka 1: pokračování

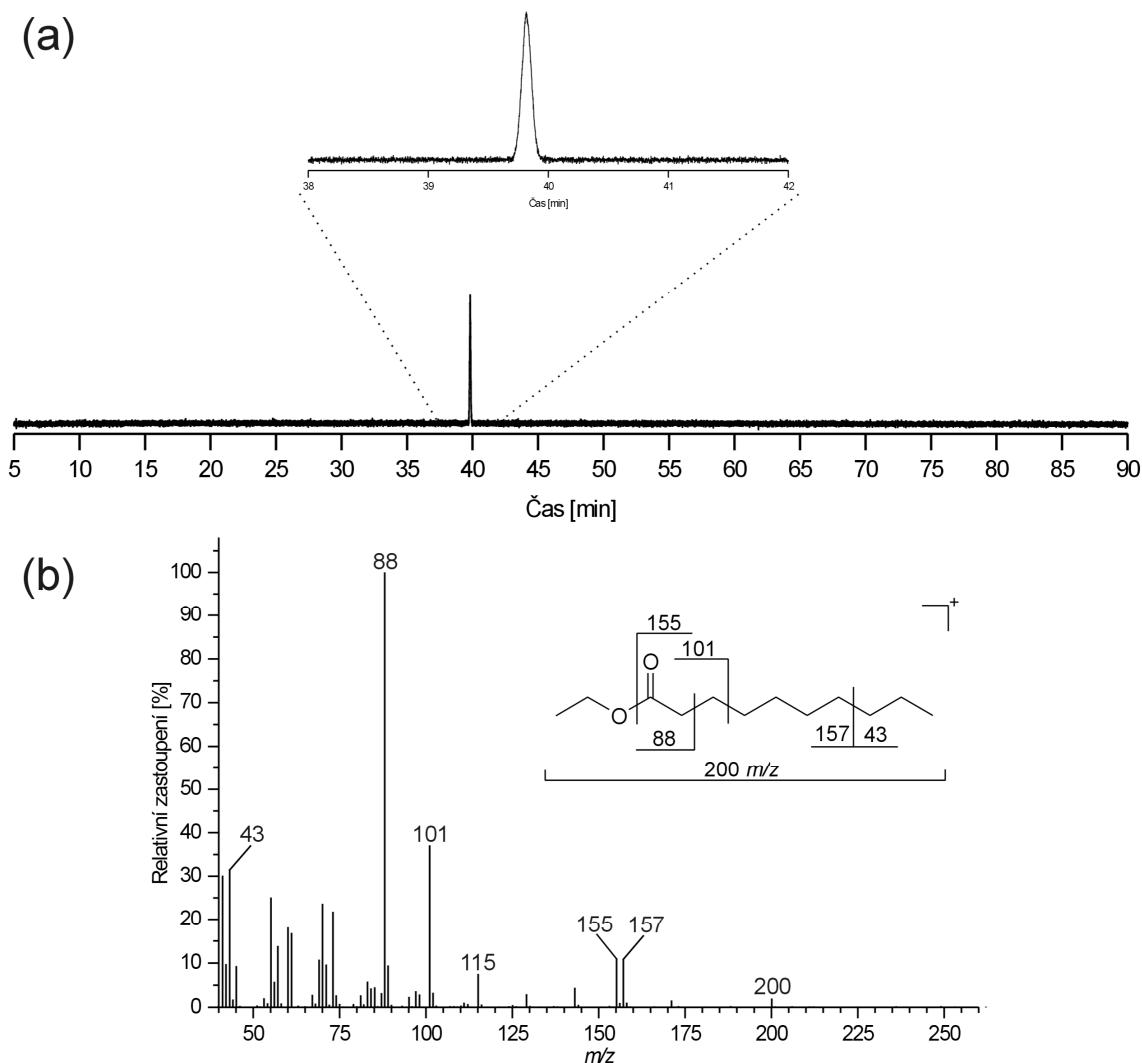
IS	39,49	ethyl-dekanoát	
20	42,6	geranylaceton	
21	44,45	$\beta$ -ionon-1,6-epoxid	
22	44,65	$\beta$ -ionon	
23	45,83	2(4H)-benzofuranon	
24	49,82	nerolidol	
25	62,34	kofein	
26	70,95	palmitová kyselina	
27	78,3	fytol	

## 7.1 GC-MS analýza vnitřního standardu

Při analýzách těkavých látek v čaji se obecně jako interní standard používají estery nasycených mastných kyselin [11, 12], které nejsou jejich přirozenou součástí. Pro potřeby této práce byl zvolen ethyl-dekanoát, který byl zakoupen z komerčních zdrojů v analytické kvalitě. Přesto byla čistota použitého IS ověřena pomocí GC-MS. Z Obrázku 16a je patrné,

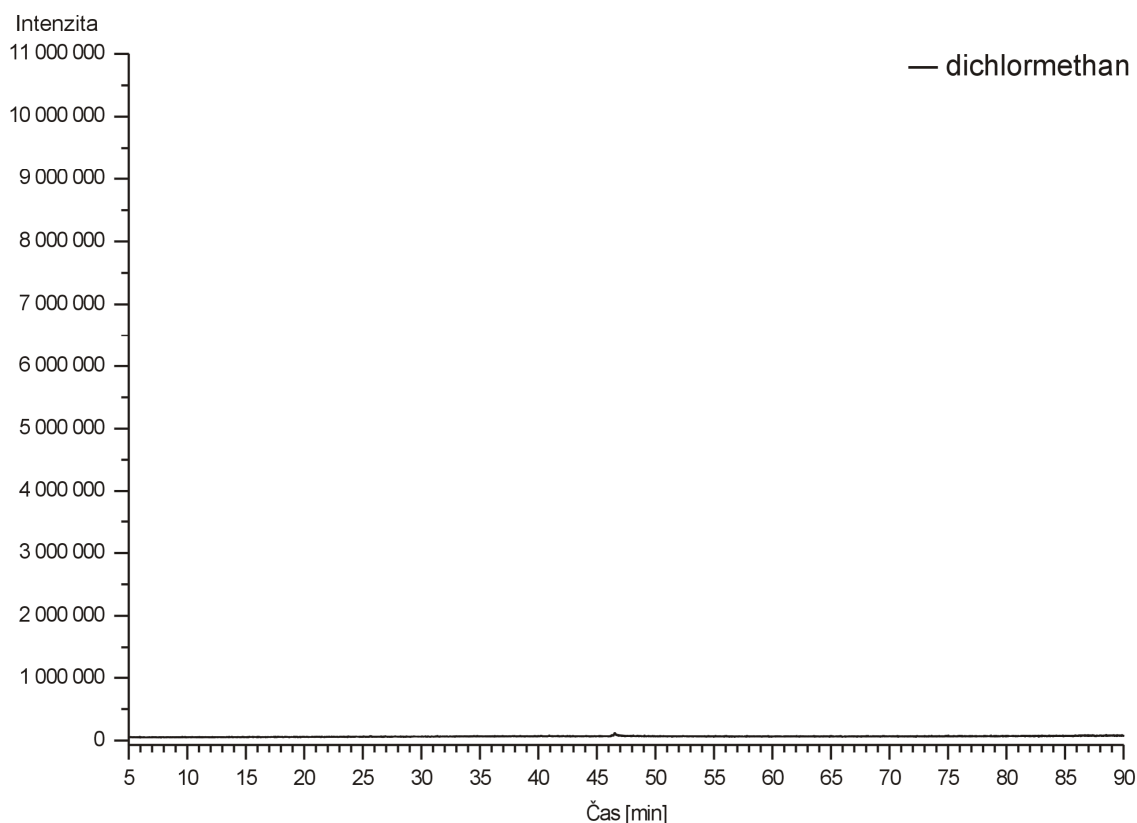
že použitý IS byl naprosto čistý, bez obsahu jakýchkoliv kontaminujících látek. Důležité bylo rovněž určení retenčního času ( $t_R$ ) IS za daných podmínek, kdy se  $t_R = 39,49$  minut.

Ethyl-dekanoát poskytuje v EI-MS spektru kromě molekulového iontu ( $m/z$  200) řadu dalších významných fragmentů vznikajících při ionizačním procesu (Obrázek 16b). Základním píkem je fragment o  $m/z$  88 vznikající odtržením  $C_4H_8O_2$  z molekuly IS. Dále byly v MS spektru této látky pozorovány fragmenty o  $m/z$  157, 155 a 101 vznikající odtržením  $C_9H_{17}O_2$ ,  $C_{10}H_{19}O$  a  $C_5H_9O_2$ . Získané hmotnostní spektrum IS mohlo být porovnáno se spektrem obsaženým v knihovně MS NIST 02, přičemž shoda mezi naměřeným spektrem a spektrem z databáze činila 98 %.



Obrázek 16: GC-MS analýza interního standardu; (a) chromatogram získaný GC-MS analýzou ethyl-dekanoátu, (b) hmotnostní spektrum ethyl-dekanoátu a návrh jeho fragmentace.

Ze stejného důvodu, jako byla provedena GC-MS analýza interního standardu, bylo podrobeno GC-MS analýze také použité rozpouštědlo (dichlormethan), který byl taktéž zakoupen z komerčních zdrojů (IPL - Ing. Petr Lukeš). Přiložený chromatogram (Obrázek 17) potvrzuje čistotu používaného rozpouštědla. Nutno podotknout, že pík náležící dichlormethanu není na Obrázku 17 uveden záměrně. Důvodem je počátek analýzy v čase 4,50 min, přičemž pík odpovídající dichlormethanu by mohl být za daných podmínek očekáván v rozmezí 3 až 4 minuty. Jedná se o běžnou praxi, kdy cílem je šetření hmotnostního spektrometru, který by byl, s ohledem na příliš vysokou koncentraci rozpouštědla v měřeném vzorku, zcela jistě vysaturován a tak naprosto neopodstatněně zatěžován.



Obrázek 17: GC-MS analýza extrakčního rozpouštědla.

## 7.2 Analýza extraktů získaných destilací vodní parou

Dle stanovené metodiky a teplotního programu (kap. 5.3.1) byla provedena strukturní analýza zkoumaných vzorků čaje. Každý vzorek byl dvakrát extrahován a každý z extraktů následně dvakrát analyzován pomocí GC-MS. Ve všech spektrech (4) každého z analyzovaných vzorků čaje byla studiem získaných hmotnostních spekter navržena

struktura jednotlivých těkavých látek a dále provedena jejich kvantifikace vztažením k ploše píku vnitřního standardu. Ze získaných výsledků byla sestavena tabulka (Tabulka 2) relativního zastoupení těkavých látek ve vybraných nefermentovaných čajích získaná ze čtyř měření.

Tabulka 2: Zastoupení těkavých látek detekovaných metodou GC-MS po destilaci vodní parou.

Číslo látky	$t_R$ [min]	Název sloučeniny	Vzorek 1 <sup>a</sup>	Vzorek 2 <sup>a</sup>	Vzorek 3 <sup>a</sup>	Vzorek 4 <sup>a</sup>
2	6,547	(2E)-hexenal	ND <sup>b</sup>	0,045 ± 0,002	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
4	8,383	(4E)-heptenal	ND <sup>b</sup>	0,075 ± 0,003	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
5	8,575	heptanal	ND <sup>b</sup>	0,109 ± 0,031	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
10	13,051	2-propylfuran	0,071 ± 0,002	0,566 ± 0,008	0,060 ± 0,008	ND <sup>b</sup>
11	13,751	(2E,4E)-hepta-2,4-dienal	0,106 ± 0,013	0,493 ± 0,026	0,065 ± 0,014	0,109 ± 0,004
12	15,123	benzylalkohol	0,055 ± 0,006	0,152 ± 0,010	0,116 ± 0,004	0,160 ± 0,012
13	15,368	benzenacetaldehyd	0,048 ± 0,002	0,118 ± 0,002	0,104 ± 0,015	0,026 ± 0,016
15	17,477	(3E,5E)-okta-3,5-dien-2-on	ND <sup>b</sup>	0,120 ± 0,001	0,070 ± 0,018	0,045 ± 0,004
17	20,159	linalool	0,161 ± 0,008	0,618 ± 0,001	0,528 ± 0,018	0,312 ± 0,006
19	30,207	geraniol	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	0,113 ± 0,011	ND <sup>b</sup>
20	42,837	geranylaceton	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	0,085 ± 0,004
21	44,671	β-ionon-1,6-epoxid	0,073 ± 0,012	0,157 ± 0,035	0,142 ± 0,049	0,107 ± 0,013
22	44,888	β-ionon	0,087 ± 0,014	0,209 ± 0,026	0,112 ± 0,000	0,156 ± 0,004
23	46,097	2(4H)-benzofuranon	0,244 ± 0,007	1,225 ± 0,145	0,393 ± 0,086	0,338 ± 0,010
25	62,621	kofein	0,881 ± 0,030	17,080 ± 6,797	1,255 ± 0,323	2,207 ± 0,122
26	71,13	palmitová kyselina	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	0,343 ± 0,167	0,446 ± 0,070
27	78,523	fytol	0,622 ± 0,011	0,500 ± 0,163	0,231 ± 0,094	0,301 ± 0,063

Vzorek 1: Assam Green Tea

Vzorek 2: Gundpowder Green Tea

Vzorek 3: Lung Ching Green Tea

Vzorek 4: Sencha Green Tea

<sup>a</sup> relativní zastoupení detekovaných látek vztaženo k vnitřnímu standardu

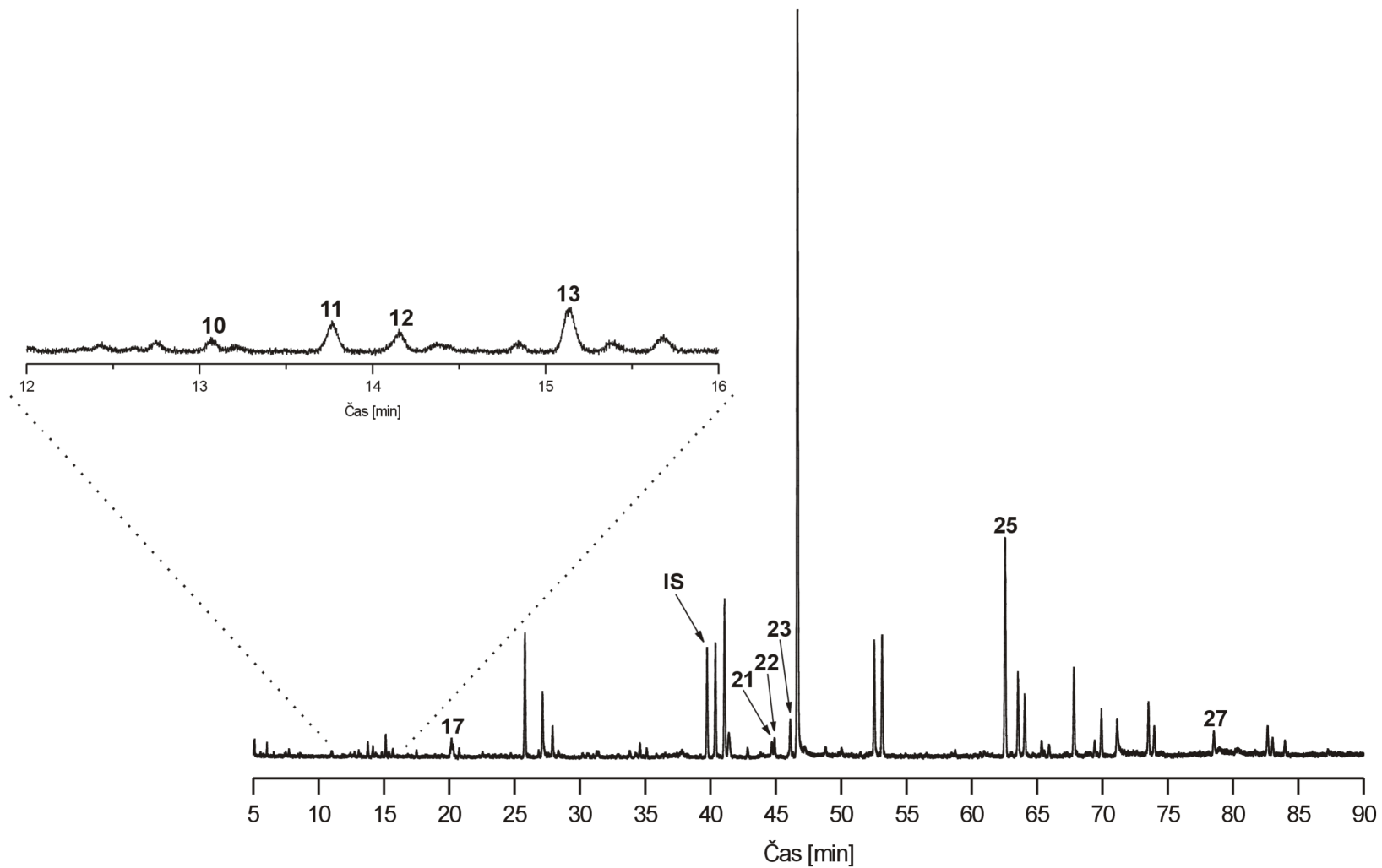
<sup>b</sup> ND: not detected - nedetekováno

Z Tabulky 2 je patrné, že ve všech analyzovaných vzorcích bylo detekováno celkem 16 těkavých látek a kofein, které jsou zařazeny pod svým specifickým číslem vzestupně podle retenčních časů, jak již bylo zmíněno dříve (Tabulka 1, strana 48–50). Na první pohled je patrné, že významnou část detekovaných látek tvoří terpenoidní látky (sloučeniny **17**, **21**, **22**, **23** a **27**). Z neterpenoidních látek byly u všech vzorků detekovány pouze benzylalkohol (**12**) a benzenacetaldehyd (**13**), kdežto aldehydy **2**, **4** a **5** byly obsaženy pouze ve vzorku číslo 2. Ve vzorcích číslo 1, 2 a 3 pak byla detekována přítomnost 2-propylfuranu (**10**), přičemž nejvyšší koncentrace této sloučeniny byla zaznamenána ve vzorku číslo 2. Minoritními látkami vyskytujícími se v jednotlivých vzorcích byly keton **15**, geraniol (**19**) a geranylaceton (**20**). Destilací vodní parou došlo také k izolaci

purinového alkaloidu kofeinu (**25**). Ten svojí povahou sice nespadá do skupiny těkavých látek, ale jak je patrné nejen z Tabulky 2, ale především z přiložených chromatogramů získaných analýzami GC-MS (Obrázky 18, 19, 20 a 21), nachází se zde ve významných množstvích. Obsah kofeinu byl však zatížen relativně velkou experimentální chybou (zejména u vzorku číslo 2). Další významné experimentální chyby byly zjištěny u palmitové kyseliny (**26**), fytolu (**27**), a ve vzorcích 2 a 3 také u 2(4*H*)-benzofuranonu (**23**).

### Vzorek 1: Assam Green Tea

V tomto vzorku bylo metodou GC-MS po destilaci vodní parou detekováno celkem 9 těkavých látek a kofein (Tabulka 2, Obrázek 18). Ve vzorku byly obsaženy převážně terpenoidní látky, ze kterých byl nejvíce zastoupeným fytol (**27**). Ve větším množství se vyskytovaly také 2(4*H*)-benzofuranon (**23**) a terpenoid linalool (**17**). Ostatní terpenoidy,  $\beta$ -ionon-1,6-epoxid (**21**) a  $\beta$ -ionon (**22**), byly zastoupeny v minoritním množství. Z neterpenoidních látek se ve vzorku 1 objevily pouze sloučeniny **10**, **11**, **12** a **13**. V rámci zjištěných hodnot relativního zastoupení těkavých látek v tomto vzorku čaje nebyla pozorována žádná významná experimentální chyba a lze tedy poukazovat na opakovatelnost použité metody. Na druhou stranu je třeba říci, že koncentrace všech detekovaných látek byla velmi nízká.



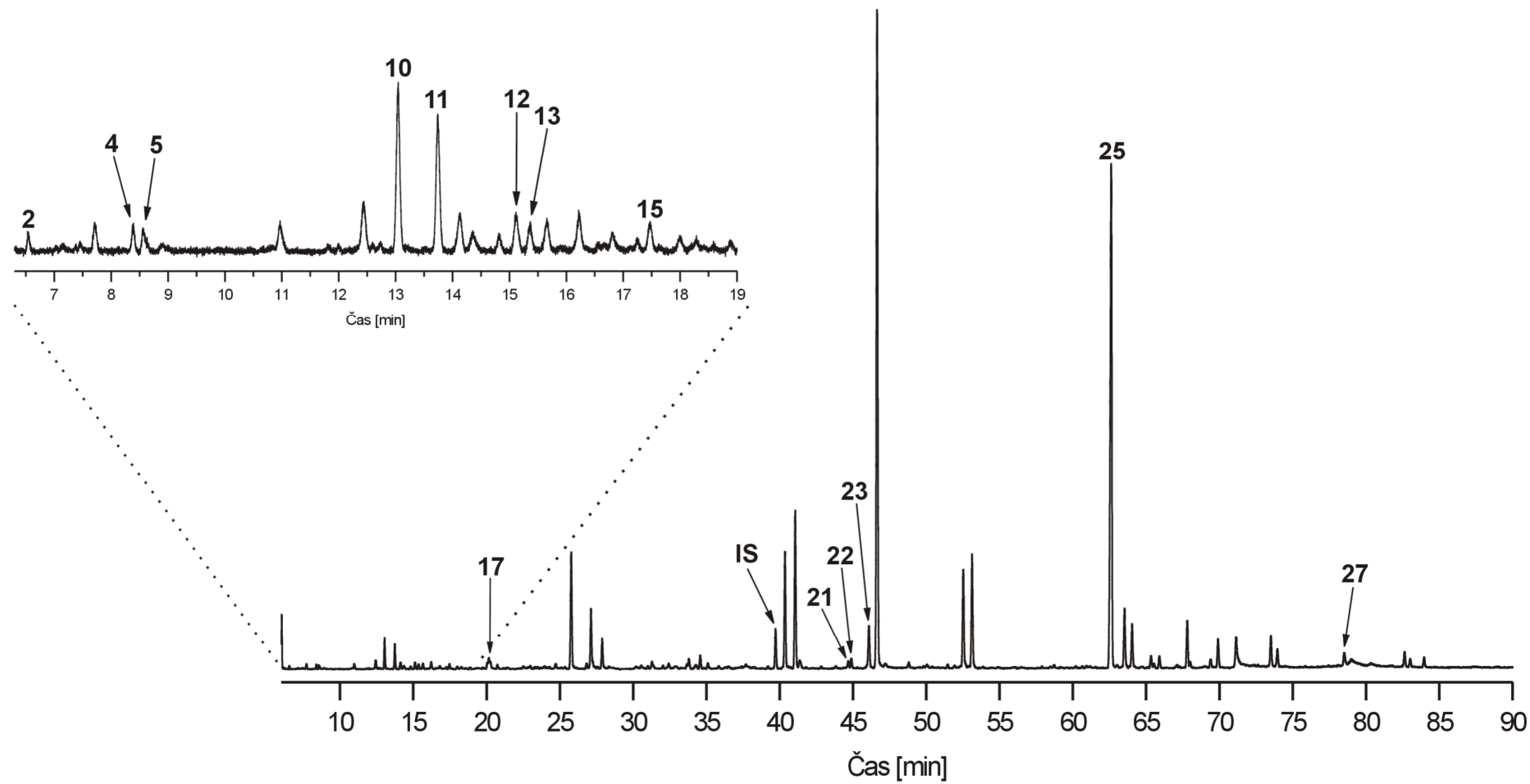
Obrázek 18: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 1 (Assam Green Tea) po destilaci vodní parou.



## Vzorek 2: Gundpowder Green Tea

Profil tohoto zeleného čaje tvořilo celkem 13 těkavých látek a kofein (Tabulka 2, Obrázek 19), který byl obsažen ve velmi významném množství. Nicméně, množství kofeinu se ve dvou provedených extrakčních experimentech výrazně lišilo, což může být způsobeno právě použitým typem extrakce. Další sloučeniny, u nichž byly naměřené hodnoty zatíženy relativně vysokou experimentální chybou byly 2(4*H*)benzofuranon (**23**) a fytol (**27**), které představovaly jedny z nejvíce zastoupených sloučenin ve zkoumaném vzorku. Na druhou stranu, u dalších sloučenin s významným zastoupením, jako např. 2-propylfuranu (**10**) a linaloolu (**17**) byly ze dvou nezávislých experimentů získány v podstatě shodné hodnoty, a sice  $0,566 \pm 0,008$  pro látku **10** a  $0,618 \pm 0,001$  pro sloučeninu **17**.

V souhrnu lze konstatovat, že ve vzorku 2 byly zastoupeny jak terpenoidní, tak neterpenoidní látky, přičemž z terpenoidů tvořil nejvýznamnější podíl linalool (**17**), a z neterpenoidních sloučenin byly nejvíce zastoupeny heterocyklus **10** a aldehyd **11**. V minoritním množství byly ve vzorku 2 obsaženy také některé jednoduché aldehydy jako např. (2*E*)-hexenal (**2**), (2*E*)-heptenal (**4**) a heptanal (**5**). Zaznamenána byla také přítomnost ketonu **15**. Z terpenoidů se pak vyskytovaly  $\beta$ -ionon-1,6-epoxid (**21**) a  $\beta$ -ionon (**22**). Rovněž obsah benzylalkoholu (**12**) a benzenacetaldehydu (**13**) byl minoritní.



Obrázek 19: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 2 (Gundpower Green Tea) po destilaci vodní parou.

### Vzorek 3: Lung Ching Green Tea

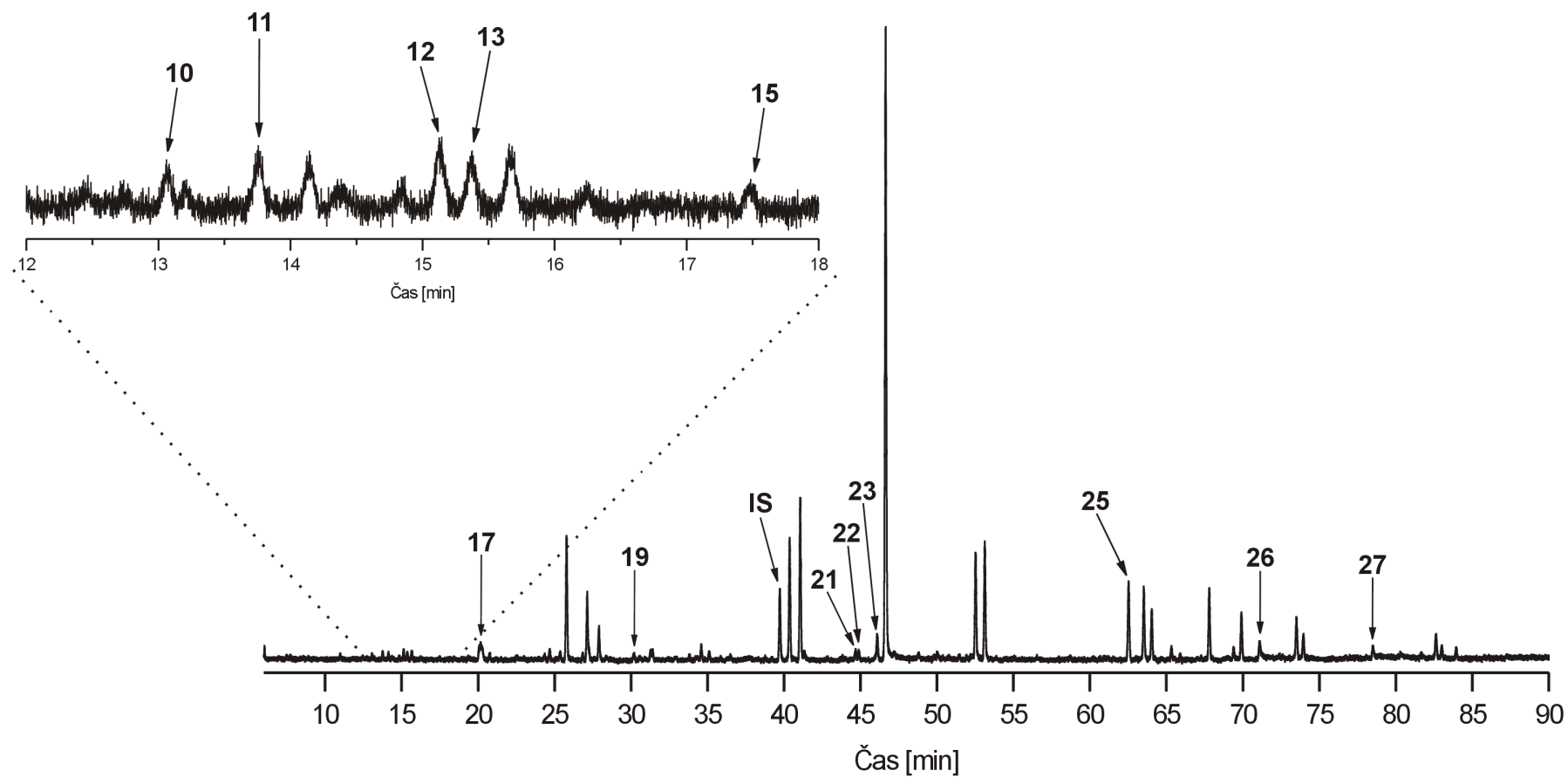
V tomto typu nefermentovaného čaje bylo detekováno celkem 12 těkavých látek a kofein (Tabulka 2, Obrázek 20), který byl opět zatížen relativně významnou experimentální chybou. Dalšími látkami, jejichž zastoupení se v extraktech získaných dvěma nezávislými experimenty významně lišilo byly 2(4*H*)benzofuranon (**23**), kyselina palmitová (**26**) a fytol (**27**).

Z terpenoidních látek tvořil nejvýznamnější podíl linalool (**17**), dále byly v menší míře zastoupeny  $\beta$ -ionon-1,6-epoxid (**21**) a  $\beta$ -ionon (**22**). Jako v jediném ze studovaných typů nefermentovaných čajů se v tomto vzorku podařilo detekovat přítomnost významného terpenoidu známého pod triviálním názvem geraniol (**19**). Neterpenoidní látky **10**, **11**, **12**, **13** a **15** tvořily pouze velmi malý podíl v celkovém obsahu těkavých látek v tomto vzorku zeleného čaje.

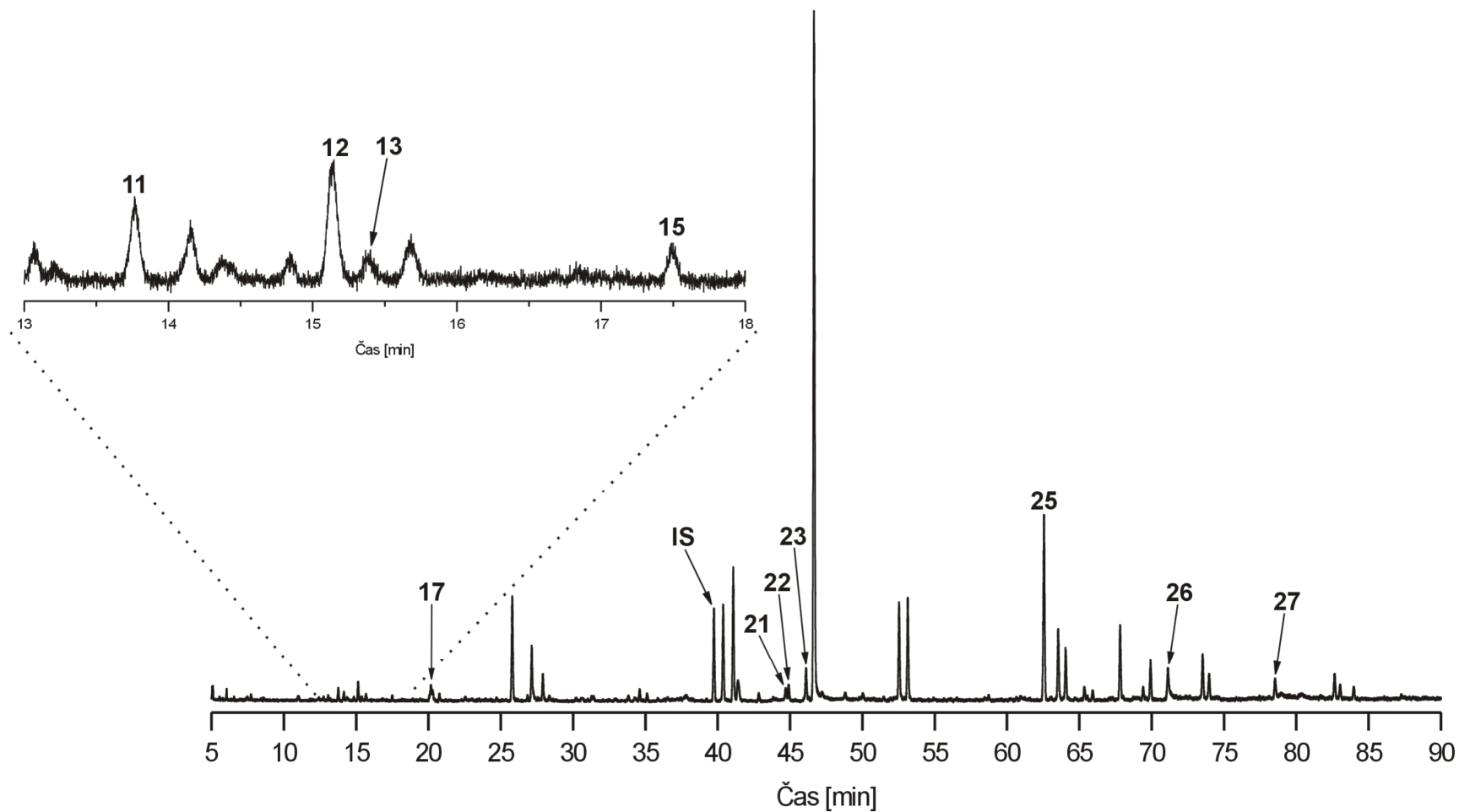
### Vzorek 4: Sencha Green Tea

Pomocí metody GC-MS bylo ve vzorku 4 detekováno celkem 11 volných těkavých látek a kofein, přičemž převážnou část tvořily terpenoidní látky (Tabulka 2, Obrázek 21). Obsah sloučenin **26** a **27**, tedy kyseliny palmitové a fytolu, byl, v porovnání s ostatními detekovanými látkami, opět zatížen relativně vysokou experimentální chybou. To samé lze konstatovat pro obsah kofeinu.

Na tvorbě aroma tohoto vzorku čaje se významným způsobem podílejí 2(4*H*)benzofuranon (**23**) a terpenoid linalool (**17**), které jsou doplněny v menší míře  $\beta$ -ionon-1,6-epoxidem (**21**) a  $\beta$ -iononem (**22**). Jako v jediném vzorku podrobeném destilaci vodní parou byl v minimálním množství detekován také geranylaceton (**20**). Z neterpenoidních látek se na tvorbě aroma tohoto typu čaje podílí sloučenina **11** a ve velmi nízkých koncentracích jsou obsaženy také sloučeniny **12**, **13** a **15**.



Obrázek 20: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 3 (Lung Ching Green Tea) po destilaci vodní parou.



Obrázek 21: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 4 (Sencha Green Tea) po destilaci vodní parou.

Z výsledků získaných pomocí GC-MS analýz extraktů všech vzorků čaje izolovaných destilací vodní parou je zřejmé, že 4 ze 17 detekovaných látek byly prakticky ve všech studovaných vzorcích zatíženy významnou experimentální chybou. Konkrétně se jednalo o kofein (**25**), 2(4*H*)-benzofuranon (**23**), palmitovou kyselinu (**26**) a fytol (**27**). Na tomto místě lze pouze spekulovat, zda k tak významným experimentálním chybám docházelo v důsledku špatné opakovatelnosti použité metody, nebo z důvodu fyzikálně-chemických vlastností uvedených sloučenin.

Závěrem této kapitoly lze konstatovat, že destilace vodní parou nepředstavuje příliš vhodnou metodu pro izolaci těkavých látek z nefermentovaných čajů. Důvodem je detekce pouze 16 sloučenin z celkového množství 26 látek detekovaných ve vzorcích extrahovaných metodou SDE (kap. 7.3). Pouze v případě vzorku 2 (Gundpowder Green Tea) bylo analýzou GC-MS zjištěno relativně významné zastoupení jak terpenoidních, tak i neterpenoidních látek.

### 7.3 Analýza extraktů získaných simultánní destilací-extrakcí

Všechna data, která budou diskutována v této kapitole, byla získána totožným způsobem jako při destilaci vodní parou (kap. 7.2). V Tabulce 3 jsou uvedena konkrétní data z GC-MS analýz extraktů získaných simultánní destilací-extrakcí (SDE). V případě této metody bylo detekováno celkem 27 sloučenin, z nichž 26 bylo těkavých a jednou byl ve stopových množstvích obsažen kofein, který do této skupiny látek nepatří. Převážná část detekovaných látek byla ve zkoumaných vzorcích obsažena, vůči internímu standardu, ve velmi malém množství. Pouze u tří sloučenin, a to ne ve všech vzorcích, byly získané výsledky zatíženy významnější experimentální chybou, což ve výsledku poukazuje na výbornou opakovatelnost této metody.

Následujících 17 látek bylo obsaženo ve všech zkoumaných vzorcích čaje, jsou tedy společným znakem jejich senzorického profilu. Jedná se o sloučeniny **1, 2, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23** a **27**.

Tabulka 3: Zastoupení těkavých látek detekovaných metodou GC-MS po SDE.

Číslo látky	t <sub>R</sub> [min]	Název sloučeniny	Vzorek 1 <sup>a</sup>	Vzorek 2 <sup>a</sup>	Vzorek 3 <sup>a</sup>	Vzorek 4 <sup>a</sup>
1	4,97	hexanal	0,083 ± 0,001	0,128 ± 0,003	0,079 ± 0,017	0,079 ± 0,001
2	6,48	(2E)-hexenal	0,032 ± 0,004	0,047 ± 0,008	0,022 ± 0,006	0,020 ± 0,005
3	6,83	(3E)-hexen-1-ol	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	0,034 ± 0,002	ND <sup>b</sup>
4	8,29	(4E)-heptenal	ND <sup>b</sup>	0,048 ± 0,000	ND <sup>b</sup>	0,013 ± 0,002
5	8,47	heptanal	0,021 ± 0,001	0,075 ± 0,011	0,043 ± 0,004	0,039 ± 0,001
6	10,87	benzaldehyd	0,026 ± 0,001	0,107 ± 0,006	0,065 ± 0,006	0,065 ± 0,015
7	12,32	hexanová kyselina	ND <sup>b</sup>	0,074 ± 0,000	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
8	12,50	2,7-oktandion	ND <sup>b</sup>	0,022 ± 0,001	0,023 ± 0,001	ND <sup>b</sup>
9	12,62	6-methylhept-5-en-2-on	0,023 ± 0,007	0,030 ± 0,001	0,046 ± 0,014	0,073 ± 0,008
10	12,92	2-propylfuran	0,022 ± 0,015	0,095 ± 0,007	ND <sup>b</sup>	0,042 ± 0,002
11	13,63	(2E,4E)-hepta-2,4-dienal	0,097 ± 0,007	0,303 ± 0,001	0,047 ± 0,001	0,122 ± 0,000
12	14,98	benzylalkohol	0,020 ± 0,007	0,031 ± 0,004	0,046 ± 0,009	0,036 ± 0,005
13	15,25	benzenacetaldehyd	0,057 ± 0,012	0,080 ± 0,019	0,084 ± 0,006	0,036 ± 0,018
14	16,06	limonen	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	0,080 ± 0,004
15	17,32	(3E,5E)-oktan-3,5-dien-2-on	0,039 ± 0,008	0,115 ± 0,010	0,036 ± 0,006	0,083 ± 0,006
16	18,12	1-oktanol	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	0,028 ± 0,001
17	20,00	linalool	0,243 ± 0,001	0,465 ± 0,062	0,503 ± 0,061	0,286 ± 0,027
18	27,42	β-cyklocitral	0,028 ± 0,019	0,080 ± 0,016	0,033 ± 0,021	0,068 ± 0,006
19	30,03	geraniol	0,045 ± 0,001	0,093 ± 0,001	0,111 ± 0,003	0,076 ± 0,019
20	42,65	geranylaceton	0,071 ± 0,001	0,111 ± 0,020	0,069 ± 0,011	0,134 ± 0,006
21	44,50	β-ionon-1,6-epoxid	0,054 ± 0,003	0,135 ± 0,005	0,087 ± 0,005	0,132 ± 0,009
22	44,71	β-ionon	0,105 ± 0,001	0,283 ± 0,011	0,183 ± 0,009	0,212 ± 0,017
23	45,91	2-(4H)-benzofuranon	0,018 ± 0,002	0,081 ± 0,022	0,057 ± 0,004	0,039 ± 0,006
24	49,83	nerolidol	ND <sup>b</sup>	0,069 ± 0,007	0,097 ± 0,005	0,052 ± 0,013
25	62,32	kofein	ND <sup>b</sup>	0,053 ± 0,011	0,051 ± 0,015	ND <sup>b</sup>
26	70,94	palmitová kyselina	ND <sup>b</sup>	0,237 ± 0,013	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
27	78,33	fytol	0,689 ± 0,077	0,480 ± 0,002	0,203 ± 0,017	0,134 ± 0,011

Vzorek 1: Assam Green Tea

Vzorek 2: Gundpowder Green Tea

Vzorek 3: Lung Ching Green Tea

Vzorek 4: Sencha Green Tea

<sup>a</sup> reaktivní zastoupení detekovaných látek vztaženo k vnitřnímu standardu<sup>b</sup> ND: not detected - nedetekováno

### Vzorek 1: Assam Green Tea

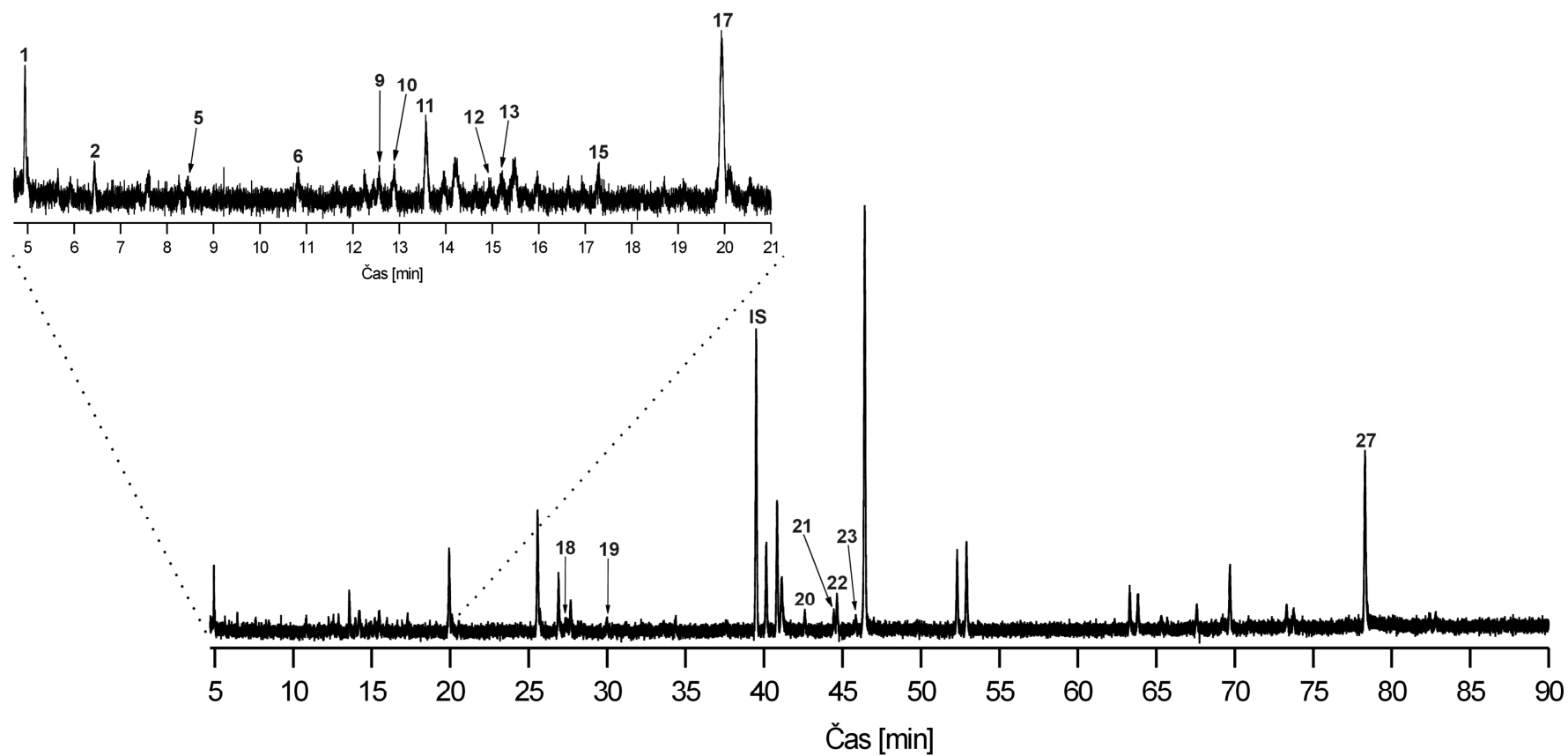
Ve vzorku tohoto čaje bylo detekováno celkem 17 těkavých látek a kofein (Tabulka 3, Obrázek 22), z nichž pouze fytol (**27**) obsažený v největším množství vykazoval významnější experimentální chybu (7,7 %). Nejvíce obsaženým neterpenoidem byl hexanal (**1**) a (*2E,4E*)-hepta-2,4-dienal (**11**), i když jejich obsah se pohyboval v řádu jednotek procent. Další neterpenoidy (sloučeniny **2, 5, 6, 9, 10, 12, 15** a **23**) byly obsaženy ve velmi nízkých koncentracích stejně, jako terpenoidy (**18, 19, 20** a **21**). Významnější koncentrace byly zaznamenány pouze u terpenoidních těkavých látek **17** a **22**, tedy u linaloolu a  $\beta$ -iononu.

### Vzorek 2: Gundpowder Green Tea

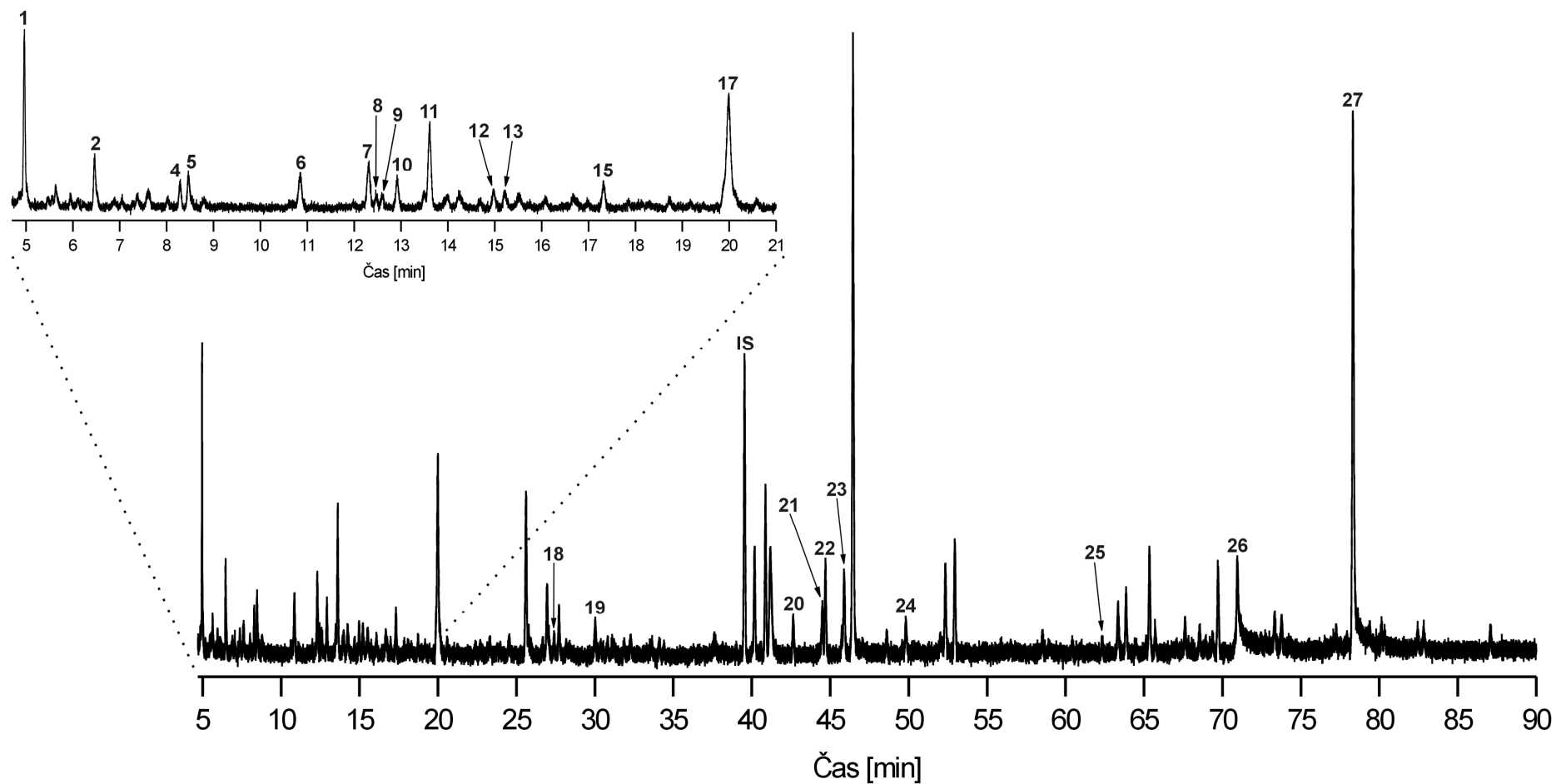
V tomto vzorku zeleného čaje bylo identifikováno celkem 22 těkavých látek a kofein (Tabulka 3, Obrázek 23), z nichž 17 bylo detekováno ve všech studovaných typech čaje. Tento druh čaje jako jediný obsahoval kyselinu hexanovou (**7**) a také palmitovou kyselinu (**26**), která byla obsažena v relativně vysoké koncentraci (ve srovnání s ostatními detekovanými látkami). Nejvýznamnější podíl těkavých terpenoidních látek v tomto druhu tvořily látky **17, 20, 21, 22** a **27**, přičemž obsah linaloolu (**17**) byl zatížen experimentální chybou 6 %. Další z terpenoidních látek byly již obsaženy v menší míře (sloučeniny **18, 19** a **24**). V případě neterpenoidů se zde ve vyšších množstvích vyskytly hexanal (**1**), benzaldehyd (**6**), (*2E,4E*)-hepta-2,4-dienal (**11**) a (*3E,5E*)-okta-3,5-dien-2-on (**15**), zbytek detekovaných neterpenoidů nabýval hodnot téměř prahových (**2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12** a **13**). V tomto vzorku byl detekován také kofein (**25**), který jak již bylo uvedeno v kapitole 7.2 mezi těkavé látky nepatří, a jeho obsah nabýval pouze prahových hodnot.

Z výše uvedeného vyplývá, že ze všech 23 látek detekovaných na základě dvou nezávislých experimentů, byl pouze obsah jedné z nich, a sice linaloolu (**17**), zatížen významnější experimentální chybou. Proto lze říci, že použitá extrakční metoda zajišťuje také velmi dobrou opakovatelnost získaných výsledků.





Obrázek 22: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 1 (Assam Green Tea) po simultánní destilaci-extrakci



Obrázek 23: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 2 (Gundpower Green Tea) po simultánní destilaci-extrakci.

### Vzorek 3: Lung Ching Green Tea

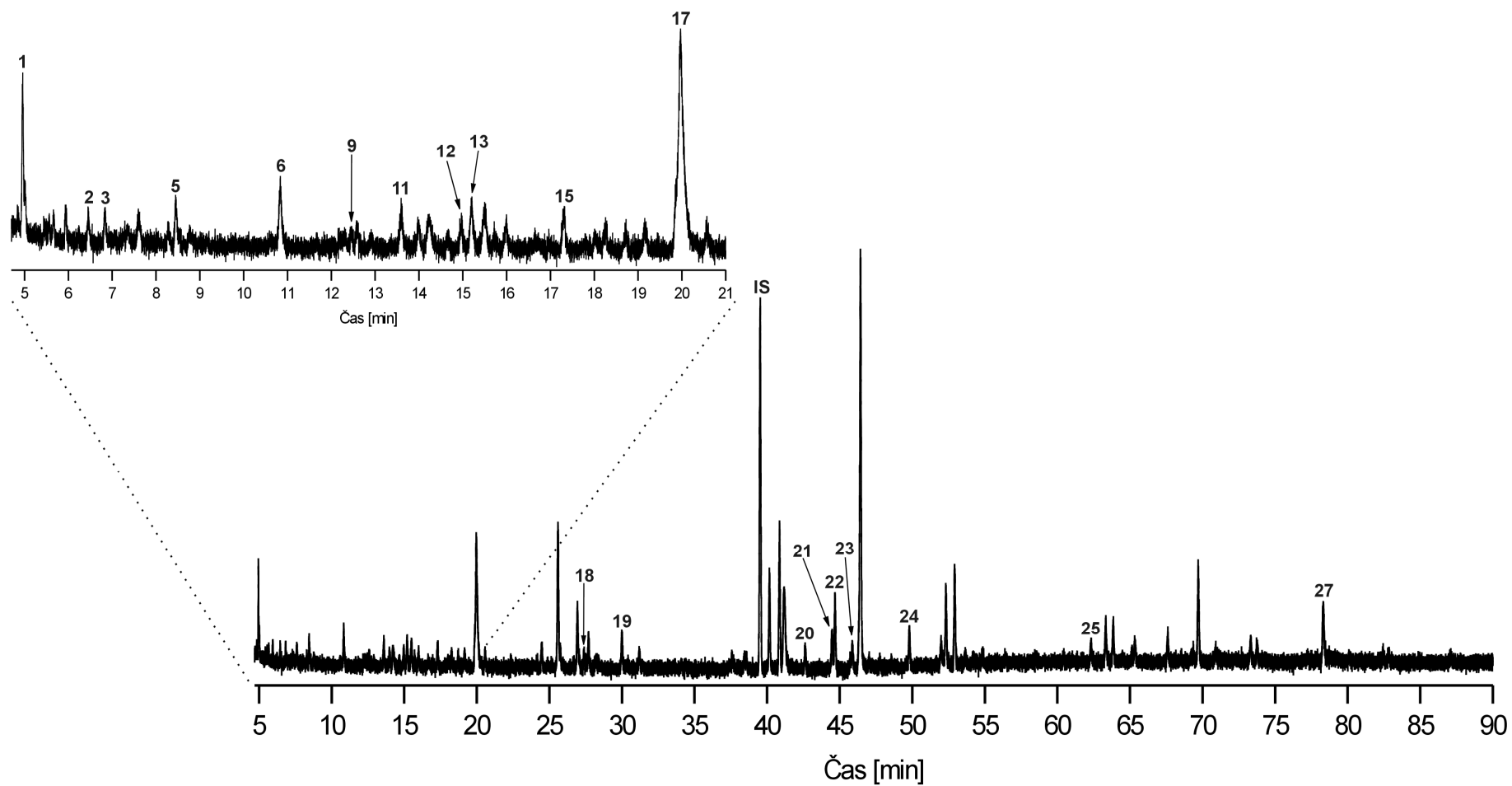
Pomocí metody GC-MS bylo ve vzorku 3 (Tabulka 3, Obrázek 24) detekováno celkem 22 volných těkavých látek a kofein (**25**), který se zde projevil pouze v nepatrném množství  $0,051 \pm 0,015$ . Linalool (**17**) jako jediný z detekovaných látek vykazoval významnější experimentální chybu (6,1 %), zároveň byl ale jeho obsah v tomto vzorku nejvyšší. Na rozdíl od ostatních vzorků čaje se v profilu toho vzorku objevil neterpenoidní alkohol (3*E*)-hexen-1-ol (**3**), kdežto sloučenina 2-propylfuran (**10**) zde detekována nebyla.

Z terpenoidních látek se na utváření aroma vzorku 3 podílely, kromě již zmíněného linaloolu (**17**), ve významném množství také geraniol (**19**),  $\beta$ -ionon (**22**) a fytol (**27**). Dalšími zástupci terpenoidů obsažených v tomto vzorku jsou látky **18**, **20**, **21** a **24**. V malých množstvích bylo obsaženo i široké spektrum neterpenoidních látek (sloučeniny **2**, **3**, **5**, **6**, **8**, **9**, **11**, **13** a **15**), přičemž významných množství, v rámci hodnot této skupiny, nabývaly pouze hexanal (**1**), benzaldehyd (**6**) a benzenacetaldehyd (**13**). V malých množstvích se v tomto čaji vyskytl i benzylalkohol (**12**).

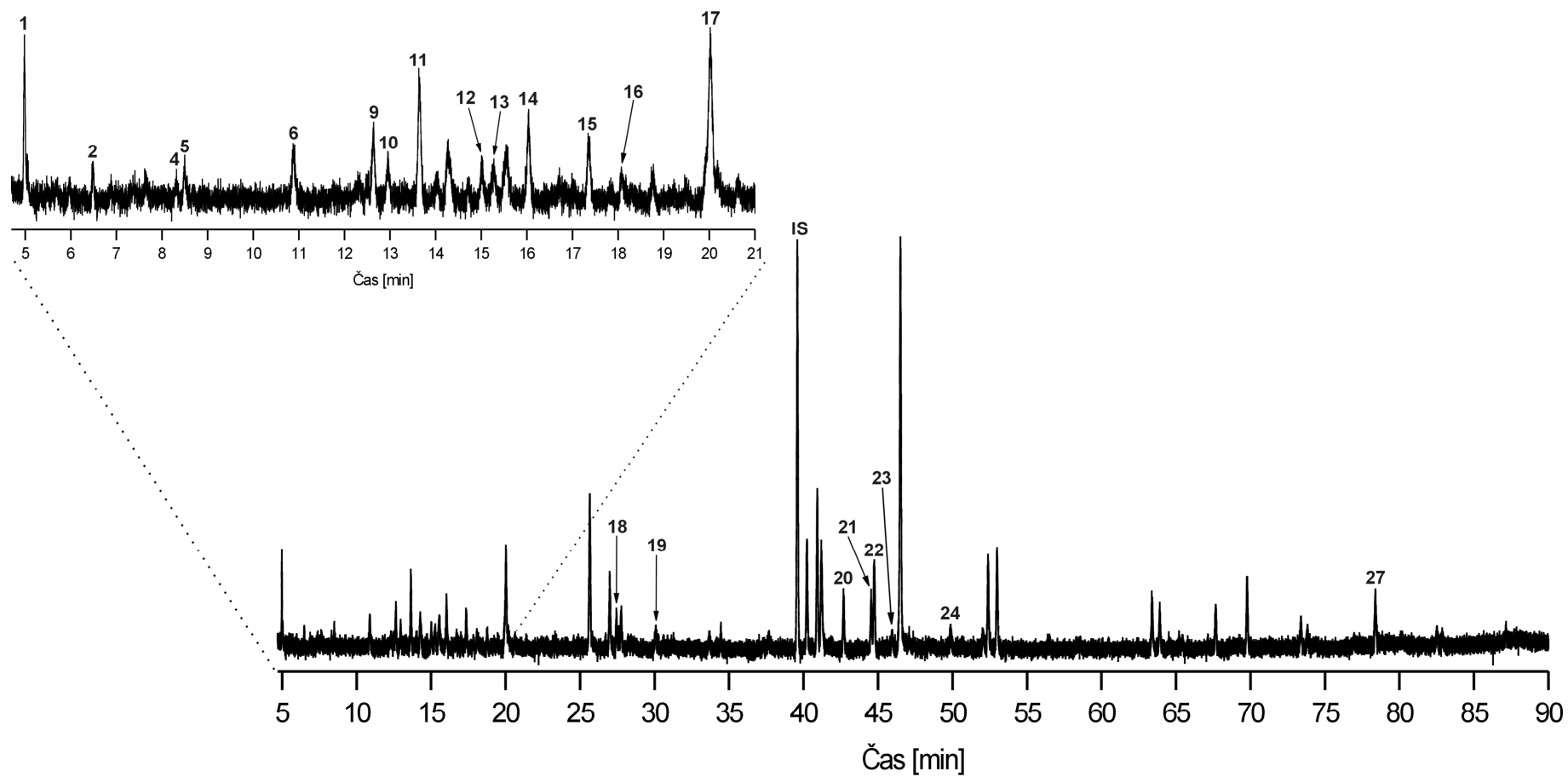
### Vzorek 4: Sencha Green Tea

Profil zeleného čaje Sencha (Tabulka 3, Obrázek 25) tvořilo 22 těkavých látek, z nichž ani jedna nebyla zatížena experimentální chybou vyšší než 3 %, což potvrzuje výbornou opakovatelnost použité metody. Nově se v tomto vzorku objevil terpenoid **14** (limonen) a primární alkohol **16** (oktan-1-ol).

Nejvíce obsaženými neterpenoidy byly hexanal (**1**), benzaldehyd (**6**), 6-methylhept-5-en-2-on (**9**) a 3,5-oktadien-2-on (**15**) přesto, že se jejich obsah pohyboval pouze v řádech jednotek procent. U terpenoidních těkavých látek byly významnější koncentrace zaznamenány u linaloolu (**17**), geranylacetonu (**20**),  $\beta$ -ionon-1,6-epoxidu (**21**),  $\beta$ -iononu (**22**) a fytolu (**27**). Další terpenoidy (sloučeniny **18**, **19**, **23** a **24**) byly obsaženy ve velmi nízkých koncentracích, stejně jako neterpenoidy **2**, **4**, **5**, **10**, **12** a **13**.



Obrázek 24: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 3 (Lung Ching Green Tea) po simultánní destilaci-extrakci



Obrázek 25: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 4 (Sencha Green Tea) po simultánní destilaci-extrakci

Všechny analyzované vzorky čaje získané metodou simultánní destilace-extrakce obsahovaly poměrně široké spektrum látek, přičemž 17 detekovaných látek bylo ve všech vzorcích totožných a většina z nich se vyskytovala (ve vztahu k internímu standardu) v přibližně stejných množstvích a mohou tak být považovány za významné složky determinující aroma nefermentovaného čaje.

Závěrem lze konstatovat, že simultánní destilace-extrakce se ukázala být vhodnější metodou pro stanovení těkavých látek, než destilace vodní parou, jelikož výsledky získané pomocí GC-MS analýzy byly pouze u dvou látek zatíženy významnější experimentální chybou. Těmito látkami byly terpenoidy linalool (**17**) a fytol (**27**), obsažené ve vysokém množství ve všech analyzovaných vzorcích, přičemž experimentální chyba ani u jedné ze sloučenin nepřesahovala hodnotu 8 %. Dalším důkazem poukazujícím na vhodnost použité metody, je množství volných těkavých látek (celkem 26 sloučenin), které byly pomocí SDE získány. Ve studovaných extraktech byly metodou GC-MS detekovány jak látky neterpenoidního charakteru, tak i terpenoidní sloučeniny.

## ZÁVĚR

Obě provedené extrakční metody, tedy jak destilace vodní parou, tak simultánní destilace-extrakce, se podařilo úspěšně optimalizovat a byly tak použity pro extrakci těkavých látek ze 4 různých typů nefermentovaného zeleného čaje. Jako vhodnější extrakční metoda se ukázala být simultánní destilace-extrakce, a to nejen proto, že z jednotlivých vzorků čaje bylo pomocí této metody vyextrahováno širší spektrum těkavých látek, ale také s ohledem na zjištěné experimentální chyby, kterými byl obsah detekovaných sloučenin ve studovaných vzorcích čajů zatížen.

V rámci předložené diplomové práce byla úspěšně aplikována metoda GC-MS, která se při analýze těkavých látek běžně používá. Po optimalizaci parametrů měření (např. teplotního programu, splitovacího poměru a samozřejmě také koncentrace použitého interního standardu) bylo přistoupeno k analýzám reálných vzorků čaje. Každý získaný extrakt byl analyzován pomocí dvou bezprostředně na sebe navazujících měření, přičemž chyba měření nepřesáhla v téměř žádném případě hodnotu 5 %. Tento fakt poukazuje na dosažení velmi dobré opakovatelnosti měření GC-MS.

Při vyhodnocování výsledků získaných metodou GC-MS byla detailně studována hmotnostní spektra všech detekovaných látek. Po vyloučení kontaminantů (zejm. vyšších uhlovodíků, ftalátů, silikátů a jednoho antioxidantu) bylo v jednotlivých vzorcích nefermentovaných čajů detekováno celkem 27 sloučenin. V případě nejistoty při určování konfigurační izomerie některých detekovaných látek (např. geraniolu (**19**),  $\beta$ -iononu (**22**) či nerolidolu (**24**)) nebyla tato vlastnost příslušné sloučeniny uvažována.

Z celkového počtu 27 detekovaných sloučenin, bylo pouze 8 z nich obsaženo v každém ze čtyř studovaných vzorků (nehledě na použitý typ extrakce). Těmito látkami byly (2*E*,4*E*)-hepta-2,4-dienal (**11**), benzylalkohol (**12**), benzenacetaldehyd (**13**), linalool (**17**),  $\beta$ -ionon-1,6-epoxid (**21**),  $\beta$ -ionon (**22**), 2(4*H*)-benzofuranon (**23**) a fytol (**27**).

Vzhledem k tomu, že u žádného ze studovaných vzorků nebyla pomocí GC-MS analýz detekována přítomnost indolu, benzenacetonitrilu ani methylsalicylátu, tedy látek jejichž obsah je typický pro fermentované čaje, lze konstatovat, že žádný ze studovaných vzorků čaje nebyl podroben fermentačnímu procesu, jak deklarují výrobci jednotlivých výrobků na jejich etiketě.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] K. Valter: Vše o čaji pro čajomily, Praha, **2000**, ISBN 80-7296-013-X
- [2] V. Wachendorfová: Čaj **2007**, 96 s, Praha, ISBN 978-80-7209-922-1.
- [3] O. Rop, J. Hrabě: Nealkoholické a alkoholické nápoje **2009**, 126 s, 1. vyd. Zlín, ISBN 978-80-7318-748-4.
- [4] URL: <<http://podhorama.oriental.cz/Zpracovani-caje/>> [cit. 2012-03-05].
- [5] URL: <<http://caje-necaje.svetu.cz/9128-sber-caje.html/>> [cit. 24. 4. 2012].
- [6] URL:<<http://www.gourmet-chick.com/2010/04/tea-country-gourmet-chick-in-sri-lanka.html/>> [cit. 24. 4. 2012].
- [7] URL:<<http://www.ronnefeldt.cz/vyroba-a-zpracovani-caje/zelene-caje/>> [cit. 2012-03-05].
- [8] K. Kumazawa, H. Masuda: Identification of Potent Odorants in Different Green Tea Varieties Using Flavor Dilution Technique. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5660-5663.
- [9] URL:<<http://steamykitchen.com/15329-art-of-tea-tasting.html> /> [cit. 24. 4. 2012].
- [10] URL:<<http://www.sksstearollers.com/single-action-tea-rolling-machine.htm/>> [cit. 24. 4. 2012].
- [11] R. Ravichandran, R. Parthiban: The impact of processing techniques on tea volatiles. *Food Chem.* **1998**, *6,2* 347-353.
- [12] L. Wang, J. Lee, J. Chung, J. Baik, S. So, S. Park: Discrimination of teas with different degrees of fermentation by SPME-GC analysis of the characteristic volatile flavour compounds. *Food Chem.* **2008**, *109*, 196-206.
- [13] R. Rawat, A. Gulati, G. D. K. Babu, R. Acharya, V. K. Kaul, B. Singh: Characterization of volatile components of Kangra orthodox black tea by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* **2007**, *105*, 229-235
- [14] P. Pripdeevech, T. Machan: Fingerprint of volatile flavour constituents and antioxidant activities of teas from Thailand. *Food Chem.* **2011**, *125*, 797-802



- [15] J. A. Baptista, J. F. P. Tavares, R. C. B. Carvalho: Comparison of catechins and aromas among different green teas using HPLC/SPME-GC. *Food Res. Int.* **1998**, *3*, 729-736.
- [16] M. Zhu, E. Li, H. HE: Determination of Volatile Chemical Constitutes in Tea by Simultaneous Distillation Extraction, Vacuum Hydrodistillation and Thermal Desorption. *Chromatografia* **2008**, *68*, 603-610.
- [17] H. Kaneda, J. Y. Kano, M. Kamimura, T. Osawa, S. Kawakishis: Analysis of long-chain fatty acids in beer by HPLC-Fluorescence. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1363-1367.
- [18] Y. Kim, K. L. Goodner, J. Park, J. Choi, S. T. Talcott: Changes in antioxidant phytochemicals and volatile composition of *Camellia sinensis* by oxidation during tea fermentation. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1331-1342.
- [19] K. Jumtee, H. Komura, T. Bamba, E. Fukusaki: Predication of Japanese green tea (Sen-cha) ranking by volatile profiling using gas chromatography mass spectrometry and multivariate analysis. *J. Biosc. Bioeng.* **2011**, *112*, 252-255.
- [20] R. Zamora, E. C. Gallardo, F. J. Hidalgo: Model studies on the degradation of phenylalanine initiated by lipid hydroperoxides and their secondary and tertiary oxidation products. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7970-7975.
- [21] B. Vanderhaegen, F. Delvaux, L. Daenen, H. Verachtert, F. R. Delvaux: Aging characteristics of different beer types. *Food Chem.* **2007**, *103*, 404-412.
- [22] J. Richter, I. Schellenberg: Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 2207-2217.
- [23] URL: <[www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/Jelinek.pdf](http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/Jelinek.pdf)> [cit. 24. 4. 2012].
- [24] Ch. A. Schalley, A. Springer: *Mass Spectrometry and Gass-Phase Chemistry of Non-Covalent Complexes*. New Jersey: John Wiley and Sons, **2009**. ISBN 978-0-470-13115-2.
- [25] K. Štulík: *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, **2005**. ISBN 80-246-0852-9.

- [26] E. Smolková: *Analýza látek v plynném stavu*. Praha: SNTL, **1991**. ISBN 80-03-00604-X.
- [27] URL:<[http://fvhe.vfu.cz/export/sites/fvhe/adresa/sekce\\_ustavy/uvozp/Teorie\\_SP\\_ME.pdf/](http://fvhe.vfu.cz/export/sites/fvhe/adresa/sekce_ustavy/uvozp/Teorie_SP_ME.pdf/)> [cit. 22. 4. 2012].
- [28] E. F. López, E. F. Gómez: Comparison of Solvents for Determination of Monoterpenes in Wine Using Liquid-Liquid Extraction. *Chromatografia* **2000**, *52*, 798-802.
- [29] X. Gu, Z. Zhang, X. Wan, J. Ning. Ch. Yao, W. Shao: Simultaneous Distillation Extraction of Some Volatile Flavor Components from Pu-erh Tea Samples- Comparison with Steam Distillation-Liquid/Liquid Extraction and Soxhlet Extraction. *Int. J. Anal. Chem.* **2009**, ID 276713, 6 pages.
- [30] K. Štěrbá, P. Dostálek, M. Karabín: Moderní postupy využívané při přípravě vzorků pro stanovení alkoholů, esterů a kyselin v pivu. *Chem. Listy* **2011**, *105*, 603-610.
- [31] R. Mikulíková, Z. Svoboda, K. Benešová, S. Běláková: Využití moderních analytických metod SPDE a TDAS při stanovení sirných těkavých látek. *Kvasný Prům.* **2011**, *57*, 7-8.
- [32] A. Chaintreau: Simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity-review. *Flavour Fragr J.* **2000**, *16*, 136-148.
- [33] URL:<[http://www.umel.feec.vutbr.cz/~bousek/vak/DESTILACE\\_METALURGIE/Vakuova\\_destilace\\_Soukup\\_9.pdf/](http://www.umel.feec.vutbr.cz/~bousek/vak/DESTILACE_METALURGIE/Vakuova_destilace_Soukup_9.pdf/)> [cit. 2012-04-28].
- [34] URL: <<http://ulceet.com/site30.php/>> [cit. 24. 4. 2012].
- [35] URL:<[http://en.wikibooks.org/wiki/Alevel\\_Applied\\_Science/Finding\\_out\\_about\\_substances/Chromatography/](http://en.wikibooks.org/wiki/Alevel_Applied_Science/Finding_out_about_substances/Chromatography/)> [cit. 24. 4. 2012].
- [36] URL:<[http://huygenscms.gsfc.nasa.gov/Mass\\_Spec\\_Intro.htm/](http://huygenscms.gsfc.nasa.gov/Mass_Spec_Intro.htm/)> [cit. 24. 4. 2012].
- [37] URL<<http://www.thermoscientific.com/ecom/servlet/home?storeId=11152/>> [cit. 24. 4. 2012].

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Postup zpracování zeleného a černého čaje .....	11
Obrázek 2: Nákres rozdělení výhonku čajovníku [32] .....	12
Obrázek 3: Hala na zavádání lístků [33].....	12
Obrázek 4: Napařovací stroj [34].....	13
Obrázek 5: Roller na svinování lístků [35].....	13
Obrázek 6: Rozdělení a strukturní vzorce vybraných neterpenoidních látek vyskytujících se v zelených čajích.....	16
Obrázek 7: Rozdělení a strukturní vzorce vybraných terpenoidních látek vyskytujících se v zelených čajích.....	19
Obrázek 8: HS-SPME [36].....	22
Obrázek 9: Přístrojové vybavení plynové chromatografie [37].....	25
Obrázek 10: Kvadrupólový analyzátor [38].....	32
Obrázek 11: Orbitrap [39].....	33
Obrázek 12: Vzorky použitých zelených čajů (zleva: vzorek 1 – Assam Green Tea, vzorek 2 – Extra Gundpowder Green Tea, vzorek 3 – Lung Ching Green Tea, vzorek 4 – China Sencha Green Tea).....	37
Obrázek 13: Teplotní program na chromatografické koloně během analýzy GC-MS.....	40
Obrázek 14: Destilace vodní parou – chromatogramy slepých pokusů.....	45
Obrázek 15: SDE – chromatogram slepého pokusu.....	46
Obrázek 16: GC-MS analýza interního standardu; a) chromatogram získaný GC-MS analýzou ethyl-dekanoátu, b) hmotnostní spektrum ethyl-dekanoátu a návrh jeho fragmentace.....	51
Obrázek 17: GC-MS analýza extrakčního rozpouštědla.....	52
Obrázek 18: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 1 (Assam Green Tea) po destilaci vodní parou.....	55
Obrázek 19: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 2 (Gundpower Green Tea) po destilaci vodní parou.....	57
Obrázek 20: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 3 (Lung Ching Green Tea) po destilaci vodní parou.....	59
Obrázek 21: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 4 (Sencha Green Tea) po destilaci vodní parou.....	60

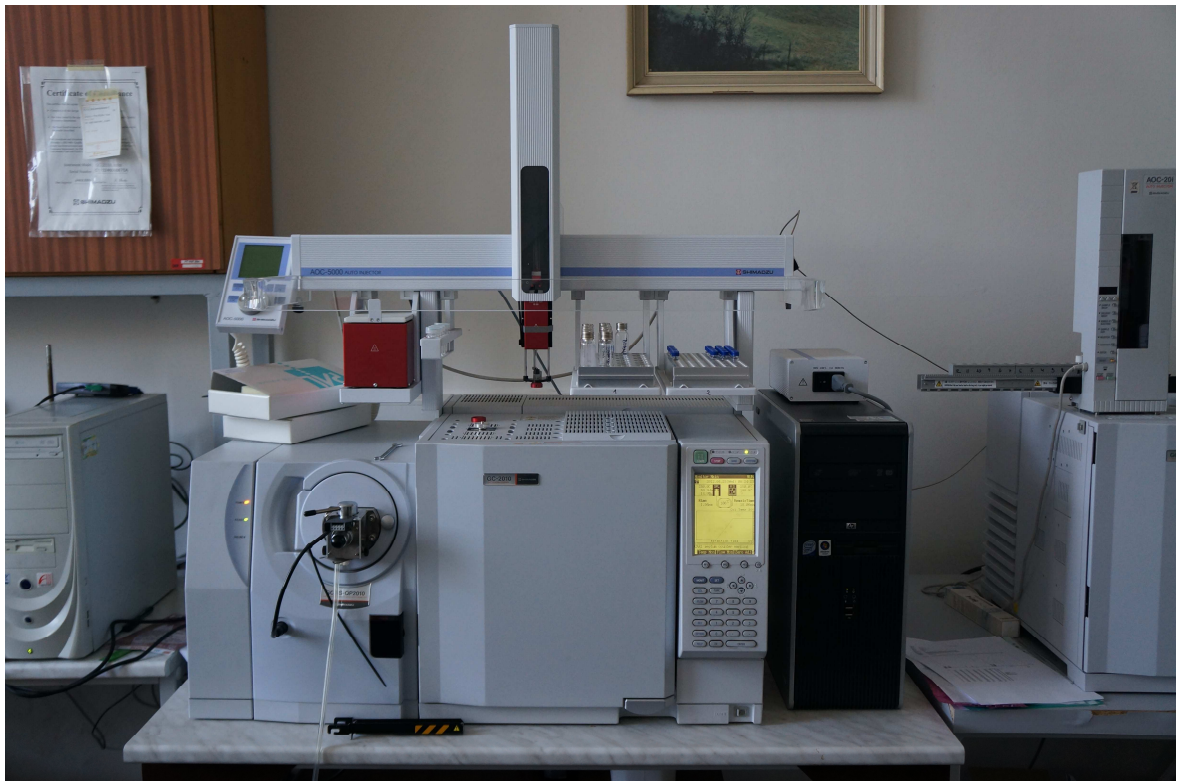
---

Obrázek 22: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 1 (Assam Green Tea) po simultánní destilaci-extrakci. ....	64
Obrázek 23: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 2 (Gundpower Green Tea) po simultánní destilaci-extrakci.....	65
Obrázek 24: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 3 (Lung Ching Green Tea) po simultánní destilaci-extrakci.....	67
Obrázek 25: Výsledek GC-MS analýzy vzorku 4 (Sencha Green Tea) po simultánní destilaci-extrakci .....	68

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Seznam všech identifikovaných těkavých látek. ....	48
Tabulka 2: Zastoupení těkavých látek detekovaných metodou GC-MS po destilaci vodní parou. ....	53
Tabulka 3: Zastoupení těkavých látek detekovaných metodou GC-MS po SDE. ....	62

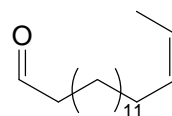
## PŘÍLOHA P I: GC-MS SHIMADZU QP-2010



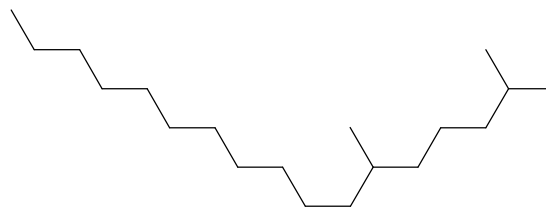
## PŘÍLOHA P II: KONTAMINUJÍCÍ LÁTKY

$t_R$ [min]	Název sloučeniny	Strukturní vzorec
25,63	„silikát“	
26,98	(2Z)-tridec-2-en	
27,73	tridekan	
34,44	undekan	
40,22	dodec-1-en	
40,90	2,6,10,14-tetramethylheptadekan	
46,50	2,4-di <i>tert</i> -butylfenol	
52,38	pentadec-1-en	
52,98	eikosan	

63,38 (15*E*)-heptadec-15-enal



63,90 2,6-dimethylheptadekan



69,77 dibutylftalát

