

Chromatografické stanovení kofeinu v extraktech z pravých čajů

Petr Janovský

2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petr Janovský**

Osobní číslo: **T14221**

Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Chromatografické stanovení kofeinu v extraktech z pravých čajů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **Pravý čaj, druhy, složení a vlastnosti.**
2. **Kofein, jeho charakteristika, zdroje, analytické metody jeho stanovení.**
3. **Popis chromatografické techniky HPLC.**

II. Praktická část

1. **Stanovení obsahu kofeinu ve vybraných extraktech černých a zelených čajů pomocí techniky HPLC/UV.**
2. **Stanovení obsahu kofeinu ve vybraných extraktech oolong a bílých čajů pomocí techniky HPLC/UV.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 8090239145.

[2] PREEDY, Victor R. *Caffeine: chemistry, analysis, functions and effects*. Cambridge: RSC Publishing, 2012. ISBN 978-1-84973-367-0.

[3] DOUŠA, Michal. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. Brno: ÚKZÚZ, 2002. ISBN 80-865-4809-0.

[4] PETTIGREWOVÁ, Jane. *Čaj – průvodce pro znalce*. Praha: Slovart, 2002. ISBN 80-7209-212-X.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Soňa Škrovánková, Ph.D.

Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání bakalářské práce:

3. února 2017

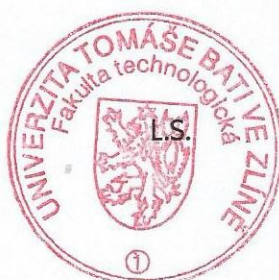
Termín odevzdání bakalářské práce:

5. května 2017

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: JANOVSKÝ PETR

Obor: CHTP

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 obhajoby¹⁾;
- 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. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ 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 § 60³⁾ 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 2.5.2017



¹⁾ 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 nevdělečně 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.

²⁾ 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).

³⁾ 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 přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

V teoretické části bakalářské práce je charakterizován pravý čaj, jeho druhy, složení a zpracování. Dále je popsán kofein, jeho vlastnosti a stanovení kofeinu metodou kapalinové chromatografie. Praktická část bakalářské práce se zabývá stanovením obsahu kofeinu z extraktů pravých čajů (černých, zelených, oolong, bílých) připravených běžným postupem, i jako ledové čaje, pomocí metody HPLC s UV detekcí.

Klíčová slova: čaj pravý, extrakt, kofein, stanovení, HPLC/UV.

ABSTRACT

In the theoretical part there is a characterization of tea, types of tea, its composition and manufacturing process. Further there is described a caffeine, properties of caffeine and its determination using high presence liquid chromatography. The practical part deals with the caffeine determination from tea's extracts (black, green, oolong, white) made with a classic procedure and as an ice tea, by HPLC method with UV detection.

Keywords: Tea, extract, caffeine, determination, HPLC/UV

Rád bych poděkoval mé vedoucí práce paní Ing. Soně Škrovánkové, Ph.D za vedení, rady a trpělivost, kterou se mnou měla při psaní bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat mé rodině za možnost studia a jejich podporu a pomoc, nejen během psaní bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 ČAJ PRAVÝ	12
1.1 HISTORIE	13
1.2 DRUHY PRAVÝCH ČAJŮ.....	13
1.2.1 Čaje zelené	14
1.2.2 Čaje černé.....	15
1.2.3 Čaje bílé	17
1.2.4 Čaje oolong	17
1.3 PĚSTOVÁNÍ A SBĚR	18
1.4 SLOŽENÍ.....	20
1.4.1 Polyfenoly	20
1.4.1.1 Katechiny a gallokatechiny	20
1.4.1.2 Theaflaviny	21
1.4.1.3 Další polyfenoly	21
1.4.2 Proteiny a aminokyseliny	21
1.4.3 Sacharidy.....	22
1.4.4 Minerální prvky	22
1.4.5 Alkaloidy.....	22
1.4.6 Vonné látky	22
1.4.7 Ostatní složky	22
1.5 PŘÍPRAVA ČAJE	23
2 KOFEIN	25
2.1 BIOSYNTÉZA KOFEINU	25
2.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ OBSAH KOFEINU V ČAJI.....	27
3 HPLC	29
II PRAKTICKÁ ČÁST	31
4 CÍL PRÁCE	32
5 MATERIÁL	33
5.1 VZORKY ČAJŮ	33
5.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	35
5.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	36
6 METODIKA PRÁCE	37
6.1 PŘÍPRAVA EXTRAKTU ČAJE	37
6.2 SKLADOVÁNÍ VZORKŮ	37
6.3 STANOVENÍ KOFEINU METODOU HPLC/UV.....	38
7 VÝSLEDKY A DISKUZE	39
7.1 KALIBRAČNÍ KŘIVKA KOFEINU	39
7.2 STANOVENÍ KOFEINU V EXTRAKTECH ČAJE PŘI BĚŽNÉ PŘÍPRAVĚ	40
7.2.1 Černé čaje.....	40
7.2.2 Zelené čaje	41
7.2.3 Oolong čaje	43

7.2.4	Bílé čaje	43
7.2.5	Maté	44
7.3	STANOVENÍ KOFEINU PŘI PŘÍPRAVĚ LEDOVÉHO ČAJE	45
7.3.1	Černé čaje – ledový čaj	45
7.3.2	Zelené čaje – ledový čaj	46
7.4	STANOVENÍ KOFEINU V ČAJI PO 1. A 3. MĚSÍCI SKLADOVÁNÍ	47
7.4.1	Obsah kofeinu v čaji po 1. měsíci skladování	47
7.4.2	Obsah kofeinu v čaji po 3. měsíci skladování	48
ZÁVĚR		50
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		52
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		55
SEZNAM OBRÁZKŮ		56
SEZNAM TABULEK		57
SEZNAM PŘÍLOH		58

ÚVOD

Čaj pravý je nápoj, vyrobený extrakcí zpracovaných listů pocházejících z rostliny *Camellia sinensis*. Dnes je to jeden z nejvíce konzumovaných a nejvíce rozšířených nápojů. Má nezastupitelnou roli v kultuře a historii, nejedna válka byla započata kvůli čaji a neméně jich bylo u čaje ukončeno.

Čaj pochází z Číny a je to podstatný prvek kultury Dálného východu. V dnešní době je sortiment čajů velmi široký, k dostání je několik druhů čajů pravých a značné množství zástupců každého druhu čaje. Nejvýznamnější druhy čaje jsou čaje bílé, zelené, oolong a černé.

Jeden z důvodů popularity čaje je samotná chuť. Čaje nefermentované bývají chuťově jemné, svěží s příchutí zeleně a je s nimi často spojována chuť umami. Čaje fermentované bývají výraznější, řízné až svíravé. Čaje pravé se navíc při přípravě mohou dále mísit s bylinami nebo ovocnými částmi.

Dalším důvodem konzumace jsou účinky, které má čaj na lidský organizmus. Jsou mu přisuzovány preventivní účinky před srdečními chorobami a vznikem rakoviny. Také má pozitivní vliv na krevní tlak, činnost jater a na imunitní systém. Nezanedbatelná je také antioxidační činnost polyfenolů obsažených v čaji. Nejznámější účinek čaje je povzbuzující efekt. Je způsoben přítomností kofeinu v čajovém listu, který přechází při přípravě čaje do nálevu. Kofein je alkaloid, nejvíce užívaný stimulant, který je obsažen ve více rostlinách, např. také v kávě. Způsobuje povzbuzení a zvýšení pozornosti. Ovšem ve větším množství může způsobit i nevolnost, úzkost či zvýšení nervozity.

Přesné množství kofeinu je možné stanovit např. pomocí spektrofotometrických nebo chromatografických metod. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie využívající zpomalení částic v důsledku interakce se stacionární fází s detekcí v UV oblasti je pro analýzu kofeinu vhodná metoda poskytující přesné výsledky.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ČAJ PRAVÝ

Dle vyhlášky Ministerstva zemědělství 330/2003 Sb. je čaj pravý definován jako „čaj vyrobený z výhonků, listů pupenů nebo jemných částí zdřevnatělých stonků čajovníku *Camellia sinensis* (Linnaeus) O. Kunze, popřípadě jejich kombinací.“ [12].

Čaj je nápoj vyrobený z lístků rostliny patřící do rodu *Camellia*, obsahující asi 90 druhů, přičemž pro zpracování čaje se využívá pouze *Camellia sinensis* (obr. 1) a *Camellia assamica*. Tyto druhy se liší velikostí, texturou a tvarem listů, kdy *Camellia assamica* má větší listy a lehce odlišné nároky na pěstování [5].

Oba dva druhy jsou vhodné pro přípravu čajů v závislosti na jejich odrůdě a chuťovým vlastnostem, protože každá odrůda je vhodná pro určité zpracování. Ovšem velkolisté druhy se používají více pro výrobu více fermentovaných čajů a druhy s menšími listy pro přípravu nefermentovaných nebo lehce fermentovaných čajů [5].

Čajovník je stálezelená, listnatá dřevina, která má žluto-bílé zoubkované listy 2,5 až 3,5cm dlouhé, závisí na druhu a odrůdě. Listy mají tvar obdélníkový až elipsoidní. Mladé lístky mají jemné bílé chloupky na spodní straně listu. Mladé větve jsou šedavě žluté, ale výhonky větví jsou purpurové. Konečné pupeny jsou stříbřitě šedé. Semena čajovníku jsou hnědá, kulovitá s průměrem 1-1,4cm. Čajovník rozkvétá od října do února a plodí od srpna do října [7].



Obr. 1 *Camellia sinensis*
(<http://www.plantsrescue.com>)

1.1 Historie

Čaj patří mezi nejoblíbenější nápoje už po stovky let. Dnes sice víme, že čaj pochází z Číny, ale bohužel nelze přesně datovat, kdy se začal z čajových lístků připravovat nápoj. Určité pověsti povídají, že s pitím čaje se začalo v roce 2737 před naším letopočtem. Ovšem první písemný důkaz o pití čaje pochází až z třetího století před naším letopočtem. Hovoří se v něm o jistém čínském lékaři, který pití čaje doporučoval pro posílení a povzbuzení. V té době se čaj nepřipravoval dnes, jak ho známe. Nápoj se připravoval jako tonikum z čerstvých listů divokých čajovníků. Pravděpodobně pro pokrytí poptávky po stále více oblíbenějším čaji se začali ve 4. století zakládat čajové plantáže. Postupně se čaj začal připravovat ve formě nápoje. Čaj byl ve formě slisovaných cihliček, které se museli před přípravou nahřát, aby je bylo možné rozdrolit a poté se nasypali do vroucí vody. Sklizené čajové lístky se napařily a rozmělnily na pastu, která se lisovala. Takže tehdejší čajové cihličky byly podobné zelenému čaji. Takovou podobu měl čaj až do 14. Století, kdy se začal objevovat čaj ve formě napařených a poté usušených listů, který se blíží dnešním sypaným čajům. Takový čaj si ovšem nechoval dlouhodobě aroma a chuť. Proto se začal čaj konzervovat oxidací pomocí přirozených enzymů čajovníku, čímž byla započata výroba černého čaje. S postupem času se začal zpracování čajového listu vyvíjet, řízením úrovně fermentace vznikl čaj typu oolong, čaje se svinovaly do různých tvarů, nebo se míchaly s bylinkami nebo ovocem [4].

Čaj byl vysoce oblíbený po celém světě. V 9. století se čajovníky začali pěstovat v Japonsku. V Japonsku byl, a dosud je, čaj velice oblíben a zvyk pití čaje je spjat i s buddhismem. Od 17. století se čaj dostal do Evropy. Oblíbený byl především v Británii a Rusku. V 19. století byl zastaven dovoz čaje z Číny do Británie, kvůli válce mezi těmito zeměmi. Proto Británie začala pěstovat čajovník v Indii a na Sri Lance [4].

1.2 Druhy pravých čajů

Čaje pravé lze rozdělit do skupin dle technologie jejich výroby a stupni fermentace, jedná se přesněji o oxidaci, protože zde nedochází k úpravě potraviny pomocí mikroorganismů. Čtyři hlavní skupiny čajů jsou zelené, černé, bílé a oolong čaje (obr. 2). Rozdíly mezi těmito čaji je rozdílná úroveň oxidace při zpracování čaje a v důsledku toho rozdílné složení, chuť, barva a vůně [5, 6].



Obr. 2 Druhy čaje (<http://www.octaviatea.com/>)

1.2.1 Čaje zelené

Čaje zelené jsou také často označeny jako nefermentované, protože v procesu jeho výroby nedochází k žádné oxidaci. Vyznačují se světle, až tmavě zeleným nálevem a aroma mají svěžší a podobné senu. Samotné listy by měly být zelené, nesmějí být hnědé [9].

Prvním krokem po sklizení je zavadnutí. Sklizené čajové lístky se ihned po sklizení rozprostřou na bambusové nebo jiné síti na 1 až 3 hodiny a s občasným otáčením se nechají sušit. Během sušení začne hydrolýza ve vodě nerozpustných sacharidů a pektinů. Začnou se formovat a hromadit katechiny. Uvolňuje se vůně podobná senu, typická pro zelený čaj a odpařuje se až 30% vlhkosti z listů [6, 8].

Dalším krokem výroby zeleného čaje je vystavení tepla čajovému listu k inaktivaci enzymů, které jsou v listu obsaženy a jsou odpovědné za metabolické pochody. Mezi hlavní enzymy patří polyfenol oxidáza, kataláza, peroxidáza, askorbáza. Tyto enzymy začnou být více aktivní po utržení listu, a proto musí být deaktivovány teplem. Množství enzymů v listech také závisí na stáří listu, mladší listy obsahují enzymů více a používá se tedy vyšší teplota k jejich inaktivaci. Využívají se dvě metody a je to pražení nebo napařování. Pražení čaje probíhá na velkých pánvích při teplotách kolem 180 °C. Tato metoda pochází z Číny a pomocí této metody se vyrábí většina zelených čajů. Napařování inaktivuje enzymy pomocí horké vodní páry při teplotě 100 °C, tato metoda pochází z Japonska a čaje vyráběné touto metodou si zachovávají více barvy, více polyfenolů a antioxidantů než při pražení. Je nutné dodržovat správné teploty, při použití vysokých

teplot čajový list tmavne a dostává kouřové aroma a v důsledku přesušení znemožňuje další zpracování. Působením tepla během procesu ztrácí čajový list až 40% vlhkosti [6, 8].

Dalším krokem je svinování čajových listů, z důvodu narušení buněčných stěn a uvolnění rozpustných látek. Čajové listy se svinují do více různých tvarů dle příslušného čaje [6, 8].

Posledním krokem je sušení, které může probíhat na pánvi přímým teplem, na slunci, nebo horkým vzduchem. Dle příslušné metody může sušení trvat minuty až hodiny. Usušený čajový list má vlhkost kolem 2 - 3% a je již hotov k přípravě čaje [6, 8].

Výjimkou jsou čaje matcha (obr. 3), které mají jiné podmínky pěstování. Největší rozdíl oproti výrobě je postupné snižování slunečního svitu dopadajícího na rostlinu. Listy jsou v důsledku vyšší produkce chlorofylu tmavší. Čajové listy jsou dále zpracovány jako zelený čaj ovšem po usušení jsou nadrceny na jemný prášek. U čajů typu matcha je možné připravit jen první nálev, protože čaj se pije i se sedlinou [4, 6, 8].



Obr. 3 Zelený čaj matcha
(<http://www.mightyleaf.com/>)

1.2.2 Čaje černé

Černé čaje patří mezi nejoblíbenější čaje, činí 70% ze všech konzumovaných čajů. Vyznačují se tmavým červenohnědým nálevem a trpkou svíravou chutí, která je rozdílná oproti čaji zelenému kvůli razantní změně ve složení polyfenolů [6].

Výroba černého čaje začíná opět sběrem čajových listů na plantážích. Po utržení listu začnou být aktivní enzymy, které se ovšem nedeaktivují teplem jako v případě výroby zelených čajů, ale nechají se pracovat. Za štěpení sacharidů vzniklých fotosyntézou se

pomocí enzymů degradují velké organické molekuly, jako celulóza a lignin, na jednodušší [15].

Po sklizení čajových listů je nutné nechat listy zavadnout. Listy je nutné rozprostřít a nechat sušit, k tomu se používají bambusové/kovové sítě a čajové listy se nechají dýchat. Pro získání energie k degradačním procesům je nutný přístup kyslíku, přesto že degradace je možná i za anaerobních podmínek, produkty anaerobního štěpení nejsou žádoucí. Důležitý je také prostor pro odcházející CO₂ a vody z listů jako produkty degradace glukózy a odcházející vody jako vlhkosti. Listy se mohou nechat rozprostřené na slunci či pod teplým vzduchem. Po tomto kroku si list ponechává 70-80% původní vlhkosti a ztrácí 4% rozpustné sušiny následkem štěpení sacharidů jako zdrojů energie [6, 15].

Dosud je cesta všech černých čajů podobná, ovšem možností výroby černých čajů je více, jedná se o cestu ortodoxní a možnost výroby označenou jako CTC [6, 15].

Název metody CTC pochází z anglického crushing, tearing, curling. Dnes převážná většina čajů z Indie, Srí Lanky a Keni je vyráběna touto metodou. Výhodou CTC metody je automatizace procesu a možnost uniformity produktů. CTC metoda spočívá v narušování listu pomocí dvou proti sobě rotujících ozubených válců různou rychlostí. Ostrými zuby válců jsou listy sekány, plochami zubů jsou drceny a protichůdným pohybem válců jsou listy svinovány. Výsledkem je rozdrčený, narušený list o nastavené velikosti, který uvolní více enzymů pro následující fermentaci. Proces může být opakován vícekrát, obvykle 3-4krát. Vzhledem k probíhajícímu tření a listy vypouštějícími teplo je nutné zachovat vhodnou cirkulaci vzduchu pro udržení stálé teploty stroje [9, 15].

Ortodoxní metoda výroby černých čajů je většinou používána v Číně. Spočívá v ručním nebo mechanizovaném svinování listu, čímž dojde k narušení listu a uvolnění enzymů [9].

Dalším krokem výroby je fermentace. Fermentace je oxidace složek čajového listu, které projdou několika chemickými reakcemi. Fermentace umožňuje rozpustnost polyfenolů v cytoplazmě za dostatečného množství kyslíku, což je doprovázeno změnou zelené barvy na hnědou. Nejedná se ovšem o činnost mikroorganismů [15].

Proces započne hned po porušení listu, kdy se katechiny a enzymy dostanou do kontaktu. Během těchto procesů se tvoří také sensoricky aktivní látky. Fermentace by měla probíhat za teploty 29 °C [15].

Posledním krokem výroby je sušení. Provádí se pro denaturaci enzymů způsobující fermentaci a pro snížení vlhkosti. Sušení probíhá pomocí horkého vzduchu a výměníků tepla. Cílem sušení je snížit vlhkost v čajovém listu po fermentaci z 55-60% na 2,5-3,0%. Během tohoto kroku se změní hnědá barva na finální černou. Po sušení je čaj hotový k přípravě [15].

Černé čaje jsou klasifikovány dle typu a kvality použitých listů.

Orange Pekoe (OP) – Čaj z mladých výhonků.

Flowery Orange Pekoe (FOP) – Čaj z ještě nevyvinutých vrcholových výhonků. Kvalitní s výrazným aroma.

Golden Flowery Orange Pekoe (GFOP), Tippy Golden Flowery Orange Pekoe (TGfOP), Finest Tippy Golden Flowery Orange Pekoe (FTGFOP) – Označují čaje vyšší kvality, zvyšující se s podílem výhonků a pupenů [4].

1.2.3 Čaje bílé

Bílý čaj, pojmenovaný po bílé barvě zpracovaných listů, se velmi liší od ostatních typů čajů pravých. Nejen svou výrobou, ale i chutí a také chemickou skladbou. Ze všech typů čajů se nejvíce blíží čerstvému čajovému listu [6, 14].

Výroba bílých čajů se od ostatních liší absencí jakéhokoliv narušování čajového listu. Pro bílé čaje jsou vybrány nejčastěji pupeny listů. Listy po sklizení jsou ponechány na slunci k zavadnutí. A poté mohou být dosušeny pomocí vzduchu, ponechány na slunci k dosušení nebo je možné použití tepla [6].

1.2.4 Čaje oolong

Pravé čaje typu oolong se vyznačují částečnou fermentací čajových listů, takže jsou mezistupněm mezi nefermentovaným zeleným čajem a čajem černým. Bývají nazývány také polofermentované. Druhů oolong čajů je více a liší se stupněm fermentace a tak i výslednou chutí, vzhledem i barvou nálevu [5].

Výroba čaje oolong je oproti ostatním druhům čaje složitější. Spojují se zde prvky výroby nefermentovaných a fermentovaných čajů. Nesmí zde dojít k velkému narušení listů, musí se jen lehce narušit obvod listu, což se docílí pouze třením listů mezi sebou. Skladba látek se nesmí změnit úplně jako při fermentaci černého čaje. Oxidace musí být pouze částečná,

a proto je nutné ukončit proces včas ukončit. Tyto prvky dělají výrobu oolong čaje složitější [5].

Po sběru čajových listů se čerstvé listy rozprostřou na síť a nechají se na slunci zavadnout s občasným opatrným otáčením, aby se listy ještě nenarušily. Sušení nemusí probíhat nutně na slunci, ale i pomocí horkého vzduchu. Během zavadnutí čajové listy ztrácí 30 – 35 % vlhkosti. Po zavadnutí se listy nechají ležet. To umožňuje uvolnění vlhkosti z cév listu do zbytku listu. Poté následuje protřepávání, které probíhá v bambusových nebo drátěných klecích, k docílení narušení obvodu listů čímž dojde k uvolnění enzymů, které mohou začít list oxidovat. Během protřepávání uvolňuje list další vlhkost. Když je list protřepán začíná v něm v důsledku lehkého narušení listů fermentace. Fermentace se po určitém čase ukončí inaktivací enzymů. Proces probíhá pomocí tepla a svinování ve dvou cyklech. První pražení na pánvi probíhá při 180 - 220 °C po dobu 5 - 7 minut. Ještě horký list je mechanicky svinován, tento krok poškodí strukturu listu a umožní následujícímu tepelnému ošetření inaktivovat všechny enzymy. Druhá tepelná úprava probíhá při teplotě nižší a to 150 – 180 °C. Druhé svinování se provádí hlavně pro získání výsledného tvaru. Konečným krokem je sušení. To probíhá ve dvou krocích, první sušení při 120 – 130 °C do doby kdy list ztratí dost vlhkosti a sušina listu bude alespoň 70 %. Takhle předsušený list nechá 1 až 2 hodiny chladit a poté se začne znovu sušit při 80 – 90 °C do vysušení, kdy vlhkost listu je 2 – 3 % [5].

1.3 Pěstování a sběr

Pěstování čajovníku je možné pouze v místech se srážkami 120 až 150 mm a teplotách mezi 12 °C a 30 °C s optimem 18-20 °C. Čajovníky rostou ve všech nadmořských výškách od hladiny moře až po 3000 m n. m. a udává se, že ve vyšších nadmořských výškách rostou čajovníky kvalitnější. Dalším nárokem rostliny je potřeba aspoň 5 hodin přímého světla nebo 11 hodin nepřímého. Často jsou mladé čajovníky pěstovány do 2 až 4 let v kontrolovaných podmínkách a teprve poté vysazovány na plantáže. Čajovníky bývají zastřihávány pro rozrůstání do šířky a udržení nízké výšky pro snazší sběr listů [7].

Těmto podmínkám vyhovuje zejména Čína, Taiwan, Japonsko, Vietnam, Korea, Sri Lanka, Darjeeling v Indii, Thajsko a dnes i Afrika, Turecko, Argentina i Rusko [7, 9].

Sběr čajových listů už je prvním krokem výroby. Pro výrobu čajů se sklízí výhonky a vrchní 2 až 3 listy pod výhonky. Nejmladší listy se používají pro výrobu nejkvalitnějších čajů, starší listy jsou vhodnější pro zpracování více oxidovaných čajů. Sklizení listů čajovníků probíhá buď mechanicky, nebo ručně, přičemž ruční sběr je náročnější a pomalejší než sběr mechanický. Ale jen pomocí ručního sběru je možné docílit výběru nejkvalitnějších lístků a právě nejkvalitnější čaje jsou sbírány ručně. Listy mohou být sklizeny v intervalu 4 až 14 dní [6].

Sběr probíhá 3 až 4 krát do roka, dle sezóny a reprodukčního cyklu rostliny. Doba sběru je určující pro kvalitu čaje a i pro obsah kofeinu. Například v Číně a Japonsku se čaj sbírá na jaře, v létě a v zimě. Jarní sezóna začíná během první půlky března do poloviny dubna, tato sezóna bývá označována jak nejvýdělečnější protože je to období kdy rostou nejkvalitnější listy. Poté začíná sezóna dešťů pokračující až do srpna. Čaj sklizený v této době má nejnižší kvalitu v porovnání k ostatním sezónám. Je to způsobeno namáháním půdy a odplavováním živin stálými dešti což má na rostlinu zásadní dopad. Na sezónu dešťů navazuje podzimní sezóna, ta pokračuje až do půlky listopadu. Čaj sklizený v této sezóně má kvalitu průměrnou mezi jarní a letní sezónou [7].

Čajové plantáže v Indii bývají také sklizeny 3 krát ročně. V Indii začíná jarní sezóna mezi koncem února až začátkem března a pokračuje přes duben. Čaj z listů sklizených během jarní sezóny je chuťově plný, aromatický a lehce svíravý. Letní sezóna před začátkem období dešťů trvá od půlky května do půlky až konce června. Období dešťů začíná ke konci června a trvá do konce srpna. V Indii se v tomto období čaj neskylí, protože i zde má čaj nejnižší kvalitu ze všech sezón a jeho chuť bývá planá [7].

V souvislosti s dobou sběru indických čajů se používá označení:

First Flush – označuje sběr od března do dubna (jarní sezóna)

In between – označuje čaj sbíraný mezi sezónami, tedy od dubna do května

Second Flush – označuje sběr od května do června (letní sezóna před obdobím dešťů) [9].

Na Srí Lance se čaje sklízí po celý rok nepřetržitě, a tedy nenastává zde vegetační klid. Kvalita sklizených čajů je nejvyšší v zimě a od prosince do března. Ovšem čajové zahrady umístěné v jihozápadní části jsou vystavovány od května do srpna dešťům a v této době je kvalita sklizených čajových lístků nejnižší [7].

1.4 Složení

Čajový list obsahuje velké množství látek, ovšem jen malá část přechází do nálevu při přípravě čaje. Množství látek v extraktu je závislé na teplotě vody a doby extrakce [7].

Nejdůležitější skupiny látek obsažené v čaji jsou polyfenoly, alkaloidy, peptidy, aminokyseliny a arómata. Dále jsou to vitamíny, minerálie, sacharidy, organické kyseliny, a pigmenty [8, 24].

1.4.1 Polyfenoly

Pod pojem polyfenoly patří množství přírodních molekul aromatického charakteru vyznačující se větším počtem hydroxylových skupin. Jsou to důležité antioxidanty a látky ovlivňující chuť [1, 7, 8].

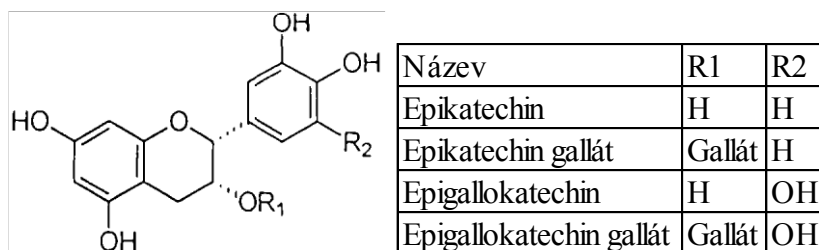
Čaj patří mezi významné zdroje polyfenolových látek. Čajovník produkuje více druhů polyfenolů a předpokládá se, že hlavní důvod je ochrana před hmyzem či zvířaty. V čaji jsou odpovědné za trpkou či svíravou chuť a ovlivňují barvu nálevu. Jsou to důležité antioxidanty [1, 7, 8].

Důležitá skupina polyfenolů obsažených v čaji jsou flavonoidy, mezi které patří dvě hlavní podskupiny a to flavonoly, flavanoly. Pod flavonoly patří katechiny a flavanoly. [1,7].

1.4.1.1 Katechiny a gallokatechiny

Katechiny představují většinu polyfenolů zelených čajů. Katechiny patří společně s afzelechiny a gallokatechiny do podskupiny flavanolů (nebo flavan 3 – olů). Katechiny a gallokatechiny představují až 3% rozpuštěných látek v čajovém nálevu. Podstatná část katechinů v čaji je ve formě esterů s kyselinou gallovou [7].

Nejdůležitější katechiny jsou epigallokatechin gallát, epigallokatechin, epikatechin gallát a epikatechin. Katechin a gallokatechin se v čaji vyskytuje v menším množství než ostatní katechiny. Největší koncentrace katechinů je v čerstvém čajovém listu, technologické procesy jako oxidace, sušení, zahřívání a mechanické namáhání snižují obsah katechinů. Vzorce katechinů jsou znázorněny v obrázku 1 [7, 8].



Obr. 4 Vzorec katechinů přítomných v čaji (Matthew E. Harbowy, *Tea chemistry*)

1.4.1.2 Theaflaviny

Theaflaviny jsou polyfenoly, kterými se černé čaje odlišují od zelených. Vznikají v procesu fermentace jako produkty enzymatických reakcí a jsou jedním z faktorů odpovědných za aroma, chuť a červeno-oranžovou barvu nálevu černého čaje. Theaflaviny jsou charakteristické benzotropolonovým kruhem vzniklým dimerizací katechinu a gallokatechinů, během tohoto procesu vznikají i vedlejší produkty také s benzotropolonovým kruhem a jsou to isotheaflaviny, neotheaflaviny a theaflavinové kyseliny [7, 8].

1.4.1.3 Další polyfenoly

K další polyfenolům obsažených v čaji patří flavonoly, jako kaempferol, quercetin a myricetin a jejich glykosidy, které tvoří převážnou část polyfenolů zelených čajů. V zelených čajích jsou obsaženy také jednoduché polyfenoly a to kyselina gallová a její estery s kyselinou chinovou. V oolong čaji jsou obsaženy polyfenoly jako oolongtheanin a theasinesin. Mezi polyfenoly čajů patří i katechiny, kam se řadí estery kyseliny gallové s katechiny a produkty jejich oxidace a další hydrolyzovatelné taniny, například camelliatannin A [7, 8].

1.4.2 Proteiny a aminokyseliny

Čajový list obsahuje 18 vázaných a volných aminokyselin. Nejvýznamnější volnou aminokyselinou je L-theanin (γ -N-ethyl glutamát), který je zastoupen v největším množství, až 40 - 60 % množství všech aminokyselin. Jedná se o unikátní aminokyselinu, mimo čajovníku byl zatím nalezen pouze v hříbu hnědém. Je to důležitá složka čaje,

odpovědná za aroma, chuť umami a ovlivňuje výsledný efekt kofeinu. Má pozitivní dopad na zdraví a pomáhá při léčbě mozkových poruch. Spolu s kofeinem jsou odpovědní za výsledný stimulační efekt čaje. Jeho přítomnost v čaji je jeden z důvodů proč káva a čaj působí lehce odlišně, přesto že efekt obou dvou produktů je způsoben kofeinem [8, 29].

Z proteinů obsažených v čaji jsou důležité enzymy. Jsou odpovědné za proces fermentace, jedná se převážně o polyfenol oxidázy, peroxidázy a amino oxidázy [6, 8]

1.4.3 Sacharidy

Čajový list obsahuje jednoduché sacharidy, jako produkty štěpení polysacharidů a pektinů. Ty mohou reagovat s volnými aminokyselinami během zpracování čaje a jsou odpovědné za výsledné aroma. Ze složitějších sacharidů jsou v čajovém listu zastoupeny celulóza a lignin [5, 8].

1.4.4 Minerální prvky

Čajovník je bohatý na draslík, vápník a hořčík. V menším množství také mangan, železo, fosfor, sodík a síru. Obsah těchto minerálií je závislý na půdě, na které je čajovník pěstován. Čajovníky hromadí hliník, který je často v komplexu s polyfenoly [8].

1.4.5 Alkaloidy

Mezi nejvýznamnější alkaloidy obsažené v čaji patří kofein, sušený čajový list obsahuje kolem 0,5 – 5% kofeinu. Dalšími alkaloidy jsou teobromin, jako meziprodukt biosyntézy kofeinu, teofylin a další xantiny ve stopovém množství [8].

1.4.6 Vonné látky

Výsledné aroma čaje je způsobeno velkým množstvím látek a je formováno během zpracování. Jsou to glykosidy, aldehydy, alkoholy, estery, produkty štěpení hydroperoxidů mastných kyselin a produkty oxidace β -karotenu [8].

1.4.7 Ostatní složky

Čajovník obsahuje organické kyseliny jako kyselinu šťavelovou, malonovou, citrónovou a adipovou. Z barviv čajového listu je nejvíce zastoupený chlorofyl, který v procesu fermentace je oxidován na feofytin a feoforbidy, a dále karotenoidy, které ovlivňují výslednou chuť čaje. Z vitamínů jsou v čajovém listu obsaženy hlavně vitamíny C, B a E.

Ostatní vitamíny ve stopovém množství. Tuková frakce čajového listu je složena hlavně z triacylglycerolů, terpenoidů, spinasterolů, vosků a saponinů [8].

1.5 Příprava čaje

Čaj je možné připravovat na více způsobů. Dle doporučeného způsobu přípravy se sypaný čaj dávkuje jako jedna lžička čaje na 150 ml vody. Nejdůležitější prvek v přípravě čaje je teplota použité vody a doba extrakce. Nejrozšířenějším postupem je zalévat suché čajové lístky horkou vodou o teplotě mezi 70 a 95 °C a nechat je luhovat po dobu 1 až 10 minut. S vyšší teplotou a dobou luhování dostává čaj silnější, trpčí a svíravější chuť a koncentrace rozpuštěných látek je vyšší [4, 25].

Každý druh čaje má doporučené teploty a dobu luhování. Pro bílé a zelené se používá nižších teplot, je zde žádoucí jemnější chuť. U čajů černých, pro které je často charakteristická trpká a svíravá chuť, se používá vyšších teplot. Čaje oolong stojí mezi nimi [4, 22, 25].

U bílých, zelených a oolong čajů je možné připravovat další nálevy čaje. Čajové lístky, po přípravě prvního nálevu, se znovu zalijí vodou o stejné teplotě a nechají se luhovat po stejnou dobu jako první nálev. Další nálevy mají většinou jemnější chuť a dávají vyniknout určitým chuťovým složkám čaje. U černých čajů se příprava druhého nálevu neprovádí. Extrakce látek z čajového listu černého čaje probíhá rychleji tak přejde většina rozpustných látek do čaje během přípravy prvního nálevu. U zelených čajů se běžně připravují tři nálevy. Není neobvyklé, že z důvodu sensorických vlastností druhého nálevu zeleného čaje, se první nálev vylévá a pije se až nálev druhý [4, 22, 25].

Pro zelené čaje se používá teplota kolem 70 až 80 °C a doba luhování 3 až 5 minut. Bílé čaje se luhují po dobu 2 až 3 minut za teploty 80 – 90 °C. Pro černé čaje se používá voda vroucí, která má obvykle teplotu kolem 95 °C a doba luhování 3 – 5 minut. Polofermentované čaje oolong se luhují za teploty kolem 90 °C po dobu 3 – 5 minut [4, 22, 25].

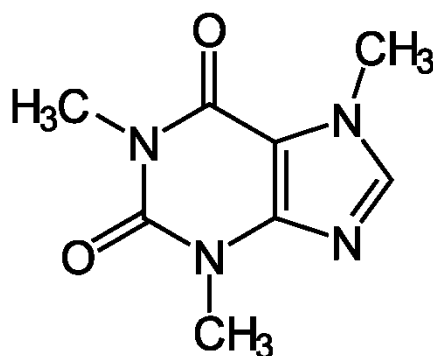
Čaj je možné také připravit za snížené teploty a zvýšení doby extrakce. Na tomto principu stojí příprava ledových čajů. Luhují se za pokojové teploty po dobu 30 až 120 minut nebo za snížených teplot (8 °C) po dobu 8 až 12 hodin. Ledové čaje je ovšem možné připravit i více způsoby. Silnější čaj připravený běžnou přípravou se může nalít na kostky ledu nebo zchladit na nižší teploty smícháním s chladnou vodou. Ovšem u takových způsobu probíhá

extrakce za normálních vysokých teplot a zchlazen je výsledný extrakt, takže se nejedná o ovlivnění extrakce teplotou [4, 21, 22, 25, 26].

2 KOFEIN

Kofein je alkaloid vyskytující se ve více než 60 rostlinách jako sekundární metabolit, mezi přední zástupce patří čaj, káva, kolové ořechy, guarána, kakao a maté. V rostlinách plní především ochrannou funkci. Dnes je často přidáván do nealkoholických nápojů a je to nejvíce užívaný psychoaktivní stimulant [2].

Kofein patří mezi purinové alkaloidy, také nazývané methylxanthiny. Mimo kofeinu zde patří teofylin, teobromin, paraxanthin a jiné. Liší se polohou a počtem methylových skupin na xantinovém skeletu [2].



Obr. 5 Strukturální vzorec kofeinu

(<http://www.sigmaaldrich.com/>)

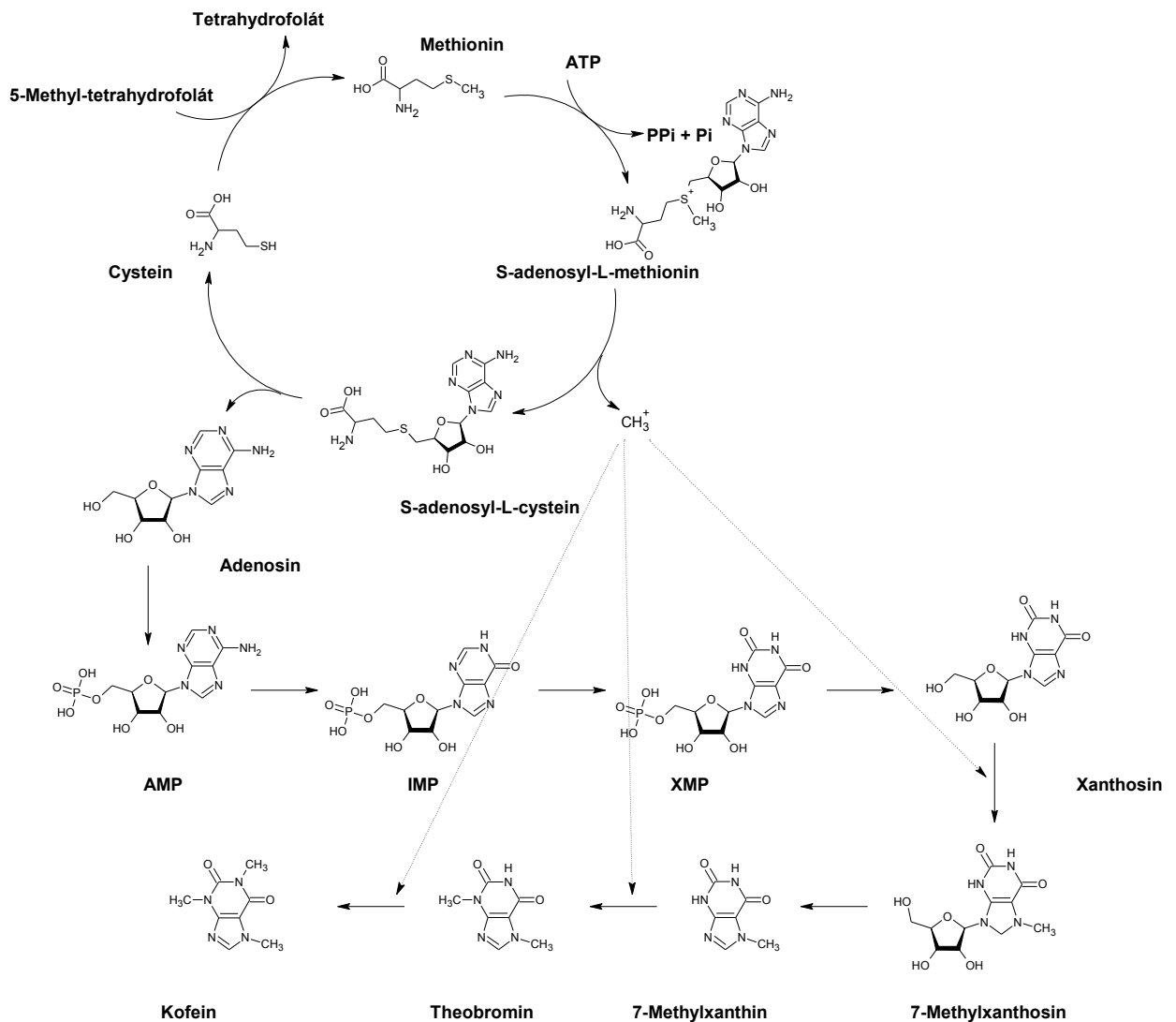
Kofein má systematický název 1,3,7-trimethylxanthin (obr. 5), je tvořen pouze ze základních biogenních prvků C, O, H, N a jeho molární hmotnost je 194,1906 g/mol. Je to bílý krystalický prášek, bez zápachu a hořké chuti. Kofein je dobře rozpustný ve vodě, 1g kofeinu se rozpustí v 46ml vody o teplotě 20 °C [2].

2.1 Biosyntéza kofeinu

V čajovém listu probíhá cyklus dodávající purinový skelet k biosyntéze kofeinu a jiných látek odvozených od purinu. Výchozí látkou je ATP dodávající adenosin, který se váže na aminokyselinu methionin za odštěpení dvou fosfátových zbytků. Ze vzniklého S-adenosyl-L-methioninu se pomocí enzymu N-methyltransferáza odštěpí methylová skupina a vzniká

S-adenosyl-L-cystein. Ten se následně hydrolyzuje na adenosin a cystein. Na cystein se váže methylová skupina z 5-methyl-tetrahydrofolátu a znovu vzniká methionin, který může pokračovat v cyklu. Z odštěpeného adenosinu vzniká adenosinmonofosfát navázáním jednoho fosfátového zbytku. Ten se postupně deaminací a dehydrogenací mění na xanthosin a odštěpením ribózy na xanthin, na který se postupně vážou methylové skupiny odštěpené S-adenosyl-L-methioninu na začátku cyklu. Navázáním tří methylových zbytků do polohy 1,3,7 na xantinový skelet vzniká kofein (Obr. 6). Procesu se účastní velké množství enzymů, například adenosin nukleosidáza, adenin deamináza, N-methyltransferáza. Enzymy nutné k biosyntéze se nacházejí v chloroplastech [19, 23].

Vzhledem ke spotřebě methylových skupin ze S-Adenosyl-L-methioninu vznikají 3 moly adenosinu na 1 mol kofeinu. Adenosin nevyužitý k syntéze kofeinu je rostlinou použit na syntézu nukleových kyselin [19, 23].



Obr. 6 Schéma biosyntézy kofeinu (Chie Koshiishi, A new caffeine biosynthetic pathway in tea leaves)

2.2 Faktory ovlivňující obsah kofeinu v čaji

Velký dopad na množství kofeinu v čaji má druh čajovníku. *Camellia assamica* má oproti *Camellia sinensis* větší množství kofeinu. Druh *assamica* má průměrně 4,09% kofeinu z hmotnosti čaje, druh *sinensis* 3,11 %. Je to jeden z důvodů proč černé čaje mají vyšší obsah kofeinu, protože *Camellia assamica* se často používá pro výrobu černých čajů [20].

Způsobu přípravy čaje ovlivňuje množství kofeinu extrahovaného z čajového listu do nálevu. Použití vyšších teplot a delší doby luhování umožňuje extrakci většího množství kofeinu, ale i dalších látek a to má dopad na chuťové vlastnosti výsledného nápoje. Černé

čaje se připravují pomocí vroucí vody, proto obsah kofeinu v připraveném extraktu může být vyšší [22, 25, 26, 27].

I technologické zpracování čajového listu ovlivňuje množství kofeinu. Během zavadnutí čaje, kdy je čaj po utržení rozprostřen na sítích a sušen na slunci či horkém vzduchu, bylo zjištěno zvyšující se množství kofeinu. Během fermentace při výrobě fermentovaných nebo polofermentovaných čajů se hladina kofeinu zase snižuje. Z toho plyne, že nefermentovaný zelený čaj by měl mít větší obsah kofeinu než fermentovaný černý čaj, vyrobený z naprosto stejného čajovníku [20].

Dalšími prvky ovlivňující obsah kofeinu je povrch čajového listu, který je v kontaktu s vodou. Čaje s velkým povrchem, například čaj matcha uvolní do nálevu vyšší množství kofeinu než běžný čaj s velkými listy. S tím souvisí tvar čajového listu. Svinované čaje uvolňují kofein a ostatní látky pomaleji [20].

Některé polyfenoly tvoří komplexy s kofeinem a mohou zpomalovat uvolňování kofeinu do nálevu a potom i biologickou dostupnost kofeinu pro organismus. Je to jeden z důvodů proč kofein z čaje působí na lidský organismus pomaleji než kofein z kávy [28].

3 HPLC

HPLC je kvantitativní i kvalitativní analytická metoda. Je to tedy druh kapalinové chromatografie používané k dělení látek, stanovení obsahu nebo k identifikaci látek. HPLC se skládá z kolony se stacionární fází, detektor a čerpadla, které zajišťuje konstantní průtok mobilní fáze kolonou pod tlakem [3, 16].

Princip chromatografie je adsorpce nebo interakce zkoumané látky s povrchem stacionární fáze. Molekuly látky rozpuštěné v mobilní fázi proudí kolonou a interagují s pevnou stacionární fází, to zpomalí částice interagující s povrchem stacionární fáze a ty budou vytékat z kolony pomaleji oproti molekulám neinteragujícím. Interakce látek se stacionární fází a zpomalení průtoku kolonou je dáno fyzikálně chemickými vlastnostmi jako polaritou, která určuje rozpustnosti ve vodě a v organických rozpouštědlech, pozitivním/negativním nábojem, pH, pKa, a velikostí molekuly. Čas, který částice stráví v koloně, se nazývá retenční čas a je důležitý pro identifikaci látek, respektive k určení píku na chromatogramu představující zkoumanou látku. Retenční čas se zjistí pomocí eluce standartu. Dále pomocí standartu je nutné zhotovit kalibrační křivku, dle které lze určit koncentraci analyzované látky. [16, 17].

Jako mobilní fázi je možno použít několik kombinací vody a organických rozpouštědel, vybraných dle analyzované látky, zaleží zde převážně na polaritě látky. Pokud se složení mobilní fáze nemění, jedná se o izokratickou eluci. Pokud dochází ke změnám mobilní fáze je to eluce gradientová, složky mobilní fáze se míchají v určitém poměru pro získání ideálního roztoku analyzované látky, čímž se zvyšuje účinnost procesu [17, 18].

Chromatografická kolona musí být vyhovující, aby byl proces co nejefektivnější, to znamená, že analyzovaná částice musí mít v koloně dostatečnou příležitost přijít do kontaktu se stacionární fází. Toho je možné docílit použitím kolony s větším objemem, ovšem efektivnější je pokud stacionární fáze je ve formě malých částic, čímž se zvětší povrch pro interakci a zmenší se prostor mezi částicemi stacionární fáze pro mobilní fáze. Tyto faktory zvyšují pravděpodobnost kontaktu stacionární fáze a částic analyzovaného vzorku [3, 17, 18].

Stacionární fázi je nutné vybrat dle povahy analyzované látky. Jako základní matrice se používá například silikagel (SiO_2), Al_2O_3 , aktivní uhlí nebo polymery [16, 17].

Pro identifikaci částic prošlých kolonou HPLC se používá detektor monitorující určité fyzikálně-chemické vlastnosti analyzované látky. Detektor je napojený přímo na kolonu a tak okamžitě a kontinuálně monitoruje proces separace a zapisuje hodnoty (např. absorbance) za čas. Jako detektory se používají UV/VIS měřící změnu absorbance v ultrafialové nebo viditelné oblasti světla, mezi které patří detektor diodové pole (DAD) [17].

HPLC lze rozdělit dle použitých fází na chromatografii s normální fází, obrácenou fází, na iontoměničích, gelovou chromatografií. Každá metoda vyžaduje jiné podmínky a stacionární fázi s jinými vlastnostmi [16, 17, 18].

Chromatografie na normální fází separuje analyzovanou látku na základě polaritě. Proto používá polární stacionární fázi a nepolární mobilní fázi (například hexan). Zkoumaná látka musí mít tedy polární charakter a bude tedy moct interagovat s polární stacionární fází. Čím vyšší bude polarita interagující částice bude síla adsorpce vyšší [16, 18].

RP-HPLC používá obrácené fáze. Využívá nepolární stacionární fázi, polární mobilní fázi. Uplatňují se zde hydrofobní interakce, které jsou důsledkem odpuzivé síly mezi polární mobilní fází, relativně nepolární analyzovanou látkou a nepolární stacionární fází [16, 18].

Iontová chromatografie funguje na principu přitažlivosti mezi ionty. Využívá se tedy pro látky s nábojem. Stacionární fáze má navázané funkční skupiny, které mohou uvolňovat opačně nabitý iont, například kyseliny či zásady [16, 17, 18].

Gelová chromatografie separuje molekuly látky na základě jejich velikosti. Stacionární fáze je pórovitý materiál, například síťovaný polymer nebo silikagel. Nedochozí zde k žádné interakci mezi fázemi, retardace analyzované látky je způsobena průchodem póry stacionární fáze. SEC se využívá i k určení terciární a kvartérní struktury proteinů [16, 18].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo stanovení obsahu kofeinu v extraktech čajů pravých pomocí chromatografické metody HPLC/UV.

Hlavním cílem práce bylo zjistit obsah kofeinu v extraktech čajů (černých, zelených, bílých a oolong) připravených doporučeným způsobem přípravy, a také po přípravě dalších nálevů u čajů, které umožňují takovouto přípravu.

Dílčím cílem práce bylo zjistit vliv teploty a doby extrakce na obsah kofeinu v připraveném extraktu (běžné a ledové čaje) a obsah kofeinu v čaji po skladování za různých podmínek.

5 MATERIÁL

5.1 Vzorke čajů

K analýze bylo použito 22 vzorků čajů pravých a pro porovnání 2 vzorky bylinného čaje maté.

Pro stanovení kofeinu byly vybrány vzorky ze 4 skupin čajů. Byli vybráni zástupci reprezentující určité znaky jednotlivých skupin čajů dle země původu, podmínek pěstování či způsobu zpracování.

Tab. 1. Černé čaje

Druh	Původ	Charakteristika	Vzorek
Černé čaje	Indie	Darjeeling Jungpana FTGFOP1 H SPL first flush	C1
		Darjeeling Giddapahar FTGFOP1 CH Spl. Inbetween	C2
		Darjeeling Oaks SFTGFOP1 CH Second Flush	C3
	Nepál	Golden Nepal FTGFOP1 First Flush	C4
	Ceylon	Ceylon OP Nuwara Eliya	C5
		Ceylon Ruhuna Golden Garden OP1	C6
	Čína	Gunpowder Black "Černý Gunpowder"	C7
		Shu Pu-Erh	C8

Byly vybrány indické čaje Darjeeling z první (C1), prostřední (C2) a druhé sklizně (C3). První sklizeň čaje pěstovaného v Nepálu (C4) ve vysoké nadmořské výšce. Dva zástupci čajů ze Srí Lanky z ostrova Ceylon z nejvýše (C5) a nejnižší (C6) položené části ostrova. Vzorky čínských čajů jsou Gunpowder Black (C7) což je vzorek Z3 prošlý fermentací a je charakteristicky svinován do malých kuliček. Posledním vybraným černým čajem je černý čaj ze skupiny Pu-erh (C8).

Tab. 2. Zelené čaje

Druh	Původ	Charakteristika	Vzorek
Zelené čaje	Indie	Darjeeling Green Selim Hill SFTGFOP1 Second Flush	Z1
	Čína	China Sencha	Z2
		Gunpowder - Temple of Heaven	Z3
		Yunnan green	Z4
	Ceylon	Ceylon sencha	Z5
	Korea	Daejak	Z6
	Japonsko	Sencha Satsuma	Z7
		Matcha Hisui	Z8

Indickým zástupcem zelených čajů je Darjeeling Green (Z1) jako nefermentovaná forma černých čajů typu Darjeeling (C1, C2, C3). Z čínských zástupců jsou zde China Sencha (Z2) jako obdoba běžného japonského čaje, Gunpowder (Z3) svinovaný čaj a taiwanský čaj Yunnan (Z4). Zástupce Z5 je sencha z čajovníku pěstovaných na ostrově Ceylon. Korejský čaj Daejak (Z6), který je zpracováván metodou spojující čínské a japonské čaje. Z japonských čajů je zastoupena Sencha Satsuma (Z7) a Matcha Hisui (Z8), která se od všech ostatních čajů odlišuje (kap. 1.2.1).

Tab. 3. Oolong čaje

Druh	Původ	Charakteristika	Vzorek
Oolong čaje	Čína	Ti Kuan Yin - "Železná bohyně milosrdenství"	O1
	Ceylon	Ceylon Waldemar Oolong	O2
	Thajsko	Thailand Red Oolong Royal Pearl	O3

Zástupci čajů typu oolong pochází z Číny, Srí Lanky a Thajska. Čínský zástupce (C1) je svinovaný, velkolistý a velmi jemně fermentovaný čaj. Ceylon Waldemar Oolong (O2) je silně fermentovaný, nesvinovaný čaj. Vzorek O3 pochází z Thajska, kde pěstování

čajovníků zatím nemá dlouhou historii a vychází z taiwanského zpracování čaje. Čaj je více fermentovaný a svinovaný do malých kuliček.

Tab. 4. Bílé čaje

Druh	Původ	Charakteristika	Vzorek
Bílé čaje	Čína	Pai Mu Tan "Bílá pivoňka"	B1
		White Downy	B2
		White Pu-Erh King	B3

Většina bílých čajů všeobecně pochází z Číny, proto všechny tři vzorky byly vybrány z této země. Pai Mu Tan (B1) je běžný čínský bílý čaj s nerovnými a nestejnými listy. White Downy (B2) z provincie Yunnan. Vzorek White Pu-Erh King (B3) je obdoba klasického čaje Pu-erh, ovšem je fermentován pouze pomocí mikroorganismů a nedochází zde k oxidaci enzymy.

Tab. 5 Maté

Druh	Původ	Charakteristika	Vzorek
Mate	Brazílie	Mate Green	M1
		Mate Roasted	M2

Vzorky M1 a M2 nepatří k čajům pravým, ale pochází z dřeviny Cesmína paraguayská. Z listů tohoto stromu je připravován povzbuzující nápoj označovaný maté. Maté bývá často s čaji pravými zaměňováno. Bylo vybráno pro zjištění množství kofeinu i v nápoji maté a porovnání s hodnotami čajů pravých. Vzorek M1 je maté v neupravené podobě, vzorek M2 je navíc upražen.

5.2 Použité chemikálie

Acetátový pufr o pH 5,5

Metanol p.a. (Lachner, s.r.o., ČR)

Demineralizovaná voda

Kofein (Sigma – Aldrich, China)

5.3 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy Voyager PRO VP214C (Ohaus corporation, Pine Brook USA)

Laboratorní sklo

Filtrační papír

Lednice (Liebherr comfort, Rakousko)

Vlhkoměr (HTH 04. Hüttermann, ČR)

Teploměr

Mikrofiltry (LNY 1345-100, LABICOM, ČR)

Aparatura pro HPLC-DAD (Dionex Ultimate 3000 System, USA)

- autosampler Dionex Ultimate 3000 WPS-3000 SL a WPS-3000 RS
- pumpa Dionex Ultimate 3000 SD
- kolona Supelco Ascentis C 18 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm)
- detektor Dionex Diode Array Detector, DAD-3000 RS
- vyhodnocovací program Chromeleon 7 (verze 7.2.1.5537)

6 METODIKA PRÁCE

6.1 Příprava extraktu čaje

Extrakt čajů pravých byl připraven navážením 1g vzorku čaje na analytických vahách s přesností na 4 desetinná čísla. Navážený vzorek byl zalit 100 ml demineralizované vody. Teplota vody použité k extrakci se lišila dle druhu čaje či přípravy.

Pro přípravu čaje běžnou cestou byla teplota demineralizované vody dle příslušného čaje a doba extrakce 3 minuty. Teplota vody pro přípravu extraktů zelených čajů byla 80 °C, pro přípravu bílých a oolong čajů 90 °C a pro černé čaje byla použita voda vroucí o teplotě 95 °C. Poté byl extrakt zchlazen na laboratorní teplotu a extrakt byl zfiltrován přes papírový filtr. Při přípravě druhého a třetího nálevu byl opětovně vzorek čaje po filtraci znovu podroben extrakci za stejných podmínek.

Pro přípravu ledového čaje byl čaj extrahován demineralizovanou vodou o laboratorní teplotě nezávisle na typu čaje. Extrakce probíhala po dobu 30 minut. U zelených čajů se po filtraci připravoval i druhý nálev stejným způsobem. Příprava ledových čajů proběhla pro čaje černé a zelené.

Takto připravené extrakty byly naředěny v poměru 1:1. Takovým způsobem byl vytvořen extrakt a připraven k analýze na HPLC.

6.2 Skladování vzorků

Vybrané vzorky čajů černých (Darjeeling Jungpana FTGFOP1 H SPL first flush, Ceylon OP Nuwara Eliya), zelených (Gunpowder - Temple of Heaven, Sencha Satsuma), bílých (White Pu-Erh King), oolong (Thailand Red Oolong Royal Pearl) a maté (Mate Green) byly uskladněny po dobu 1 a 3 měsíců. Vzorky byly uskladněny v lednici v hermeticky uzavřeném obalu. Teplota v lednici byla 5 – 8 °C a relativní vlhkost 62 % - 64 %. Druhá část vzorků byla uskladněna za přístupu vzduchu, bez přístupu světla za laboratorní teploty. Ze vzorků byl připraven extrakt po prvním a třetím měsíci. Extrakt byl připraven běžným způsobem dle postupu popsaného v kapitole 6.1.

6.3 Stanovení kofeinu metodou HPLC/UV

Analýza extraktů probíhala na chromatografické koloně Supelco Ascentis C 18 (150 mm x 4,6 mm; 2,7 μm). Mobilní fáze pro toto stanovení byla směs acetátového pufru a metanolu v objemovém poměru 70 : 30. Nástřik do kolony byl o objemu 20 μl , rychlost průtoku byla 0,75 ml/min, teplota 30 °C. Eluce byla izokratická a doba analýzy byla 15 minut. Detekce proběhla pomocí UV detektoru při vlnové délce 280 nm. Každý extrakt i standardy kofeinu byly stanoveny třikrát a určena směrodatná odchylka.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Analyzovány byly čtyři druhy pravých čajů (22 vzorků), černé, zelené, oolong a bílé čaje a na porovnání bylinný čaj z rostliny cesmína paraguayská. U vzorků byl stanoven obsah kofeinu v extraktu čaje po běžné přípravě, po přípravě jako ledový čaj a po 1. a 3. měsíci skladování.

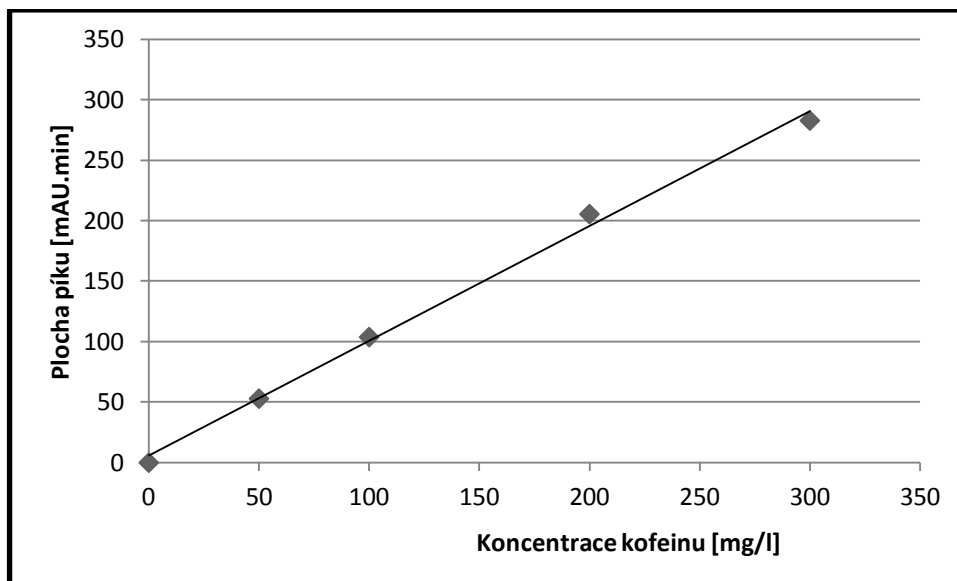
7.1 Kalibrační křivka kofeinu

Pro stanovení množství kofeinu byla sestavena kalibrační křivka kofeinu. Standard kofeinu byl naředěn na odpovídající koncentraci (300 mg/ml, 200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/l) a podroben analýze na HPLC/UV (Tab 6). Z analýzy byl zjištěn retenční čas kofeinu a z hodnot ploch píků a známých koncentrací byla sestavena kalibrační křivka (Obr. 7). Pomocí lineární regrese byla získána rovnice přímky charakterizující závislost plochy píku a koncentrace kofeinu.

Rovnicí kalibrační křivky byla přepočítána plocha píku na koncentraci kofeinu v analyzovaném vzorku a přepočtem zjištěno množství kofeinu v mg/g vzorku.

*Tab. 6 Hodnoty kalibrační křivky
kofeinu*

Koncentrace kofeinu [mg/l]	Plocha píku [mAU.min]
0	0
50	52,96
100	103,86
200	205,57
300	282,96



Obr. 7 Kalibrační křivka kofeinu

Rovnice regrese kalibrační křivky:

Kde y plocha píku (mAU.min), x koncentrace kofeinu (mg/l)

Korelační koeficient kalibrační křivky

7.2 Stanovení kofeinu v extraktech čaje při běžné přípravě

7.2.1 Černé čaje

U černých čajů se běžně připravuje jen první nálev. Kvůli použité vyšší teplotě přípravy přejde většina rozpustných látek do extrakčního činidla během přípravy prvního nálevu. Analyzováno bylo 8 vzorků černých čajů.

Výsledky obsahu kofeinu v černých čajích s uvedením směrodatné odchylky (s) jsou uvedeny v tab. 7.

Tab. 7. Výsledky obsahu kofeinu v černém čaji

1. Nálev	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Obsah kofeinu [mg/g]	27,99	23,18	21,46	22,98	25,84	20,27	22,77	26,21
s	0,11	0,63	0,01	0,45	0,01	0,28	0,03	0,05

Mezi černými čaji měl nejvyšší obsah kofeinu v prvním nálevu čaj C1 z první sklizně čaje Darjeeling. Čaje C2 a C3, které pochází ze stejné zahrady, ale jsou to čaje z prostřední (C2) a druhé (C3) sklizně, měly obsah kofeinu nižší o 17 % (C2), případně o 23 % (C3). Druhý nejvyšší obsah kofeinu měl pomocí mikroorganismů fermentovaný čaj Shu Pu-erh (C8). Čaj C4 měl nižší obsah kofeinu o 18 % oproti C1, i když pocházejí z první sklizně a nesou označení stejné kvality (FTGFOP1), ale liší se zemí původu. Čaje ze Srí Lanky z ostrova Ceylon (C5, C6) se od sebe liší převážně nadmořskou výškou. C6 pěstovaný v nižších polohách měl o 22 % méně kofeinu než C5 pěstovaný v nejvyšších místech ostrova. Získané data se shodují s daty výzkumu Chin a kol. [30].

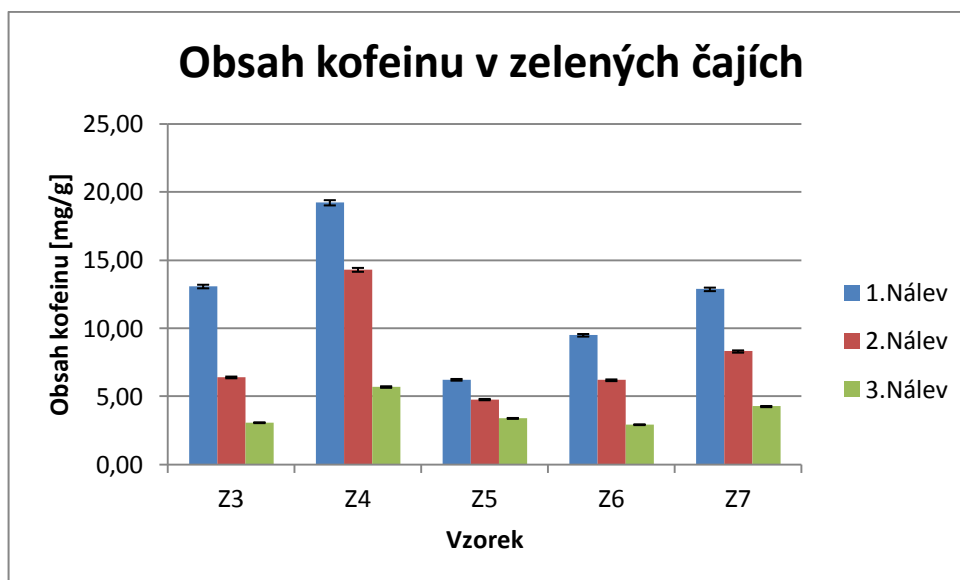
7.2.2 Zelené čaje

Analyzováno bylo 8 vzorků zelených čajů. Ze zelených čajů je možné připravit až 3 nálevy, u 5 vzorků proběhla analýza druhého i třetího nálevu.

Výsledky obsahu kofeinu v prvním nálevu zelených čajů s uvedením směrodatné odchylky (s) jsou v Tabulce 8. Porovnání obsahu kofeinu v 5 zelených čajích v prvním, druhém a třetím nálevu jsou znázorněny na Obr 8.

Tab. 8. Výsledky obsahu kofeinu
v zelených čajích

1. Nálev	Obsah kofeinu [mg/g]	s
Z1	16,40	0,24
Z2	13,42	0,04
Z8	26,55	0,01



Obr. 8 Porovnání obsahu kofeinu v zelených čajích

Nejvyšší množství kofeinu v prvním nálevu měl čaj Matcha Hisui (Z8). Vzhledem k práškové konzistenci, kterou čaj Z8 má, byla patrně i plocha, na které mohla probíhat extrakce vyšší a tak byla extrakce účinnější. Nejnižší množství kofeinu v prvním nálevu měl čaj Ceylon Sencha (Z5).

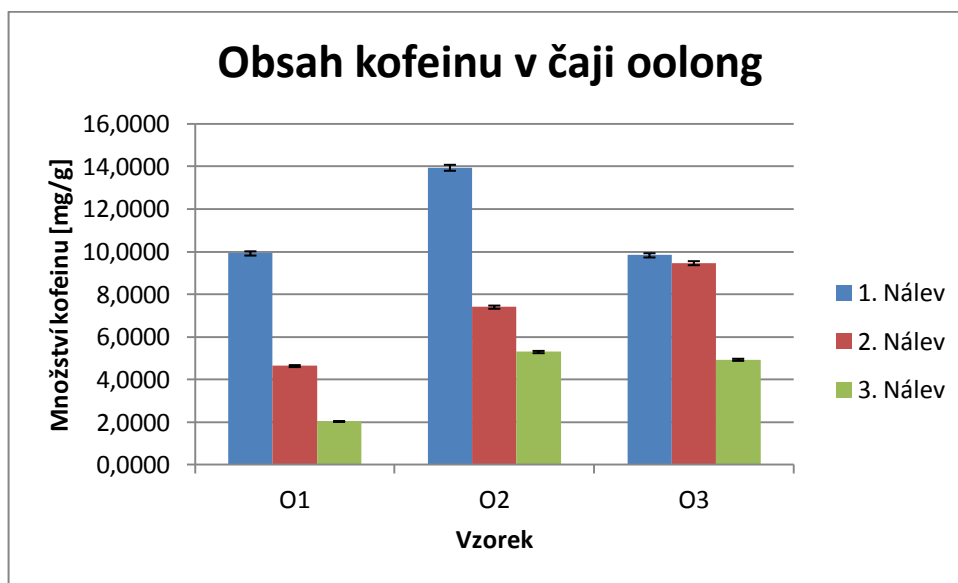
Z čínských čajů měl nejvyšší obsah kofeinu Yunnan Green (Z4). Čaj Z3, který je svinovaný do drobných kuliček, měl jen mírně nižší obsah kofeinu než čaj Z2, který je ve formě dlouhých plochých listů. Ze tří čajů typu Sencha (Z2, Z5, Z7) lišící se zemí původu má nejvíce kofeinu v prvním nálevu čínská Sencha (Z2). Sencha s ceylonským původem (Z5) měla nejnižší obsah kofeinu a to i v dalších nálevech oproti japonskému čaji (Z7).

Hodnoty kofeinu postupně s dalšími nálevy klesaly. Z prvního nálevu na druhý byly obsahy nižší průměrně o 34 %. U čaje Z3 až o 51 %, i když u čaje Ceylon Sencha byl pokles jen o 23 % kofeinu vůči prvnímu nálevu. Pokles u třetího nálevu byl průměrně o 48 % kofeinu druhého nálevu a o 66 % prvního nálevu. Největší pokles u třetího nálevu byl zaznamenán u čaje Yunnan Green (Z4), kde byl pokles o 61 % kofeinu druhého nálevu.

Po součtu obsahů kofeinu všech tří nálevů měl nejvyšší obsah kofeinu ze zelených čajů vzorek Yunnan Green (Z4) a to 39,23 mg/g, nejnižší Ceylon Sencha (Z5) 14,41 mg/g.

7.2.3 Oolong čaje

Z čajů oolong je možné připravit 3 až 5 nálevů. Ze vzorků čajů oolong byly připraveny nálevy tři. Porovnání obsahu kofeinu všech tří nálevů čajů oolong je znázorněno na Obr 9.



Obr. 9 Porovnání obsahu kofeinu v čaji oolong

Průměrný obsah kofeinu v prvních nálevech čaje oolong (11,24 mg/g) se pohyboval podobně jako u čajů zelených (12,18 mg/g). Nejvíce kofeinu v prvním nálevu obsahoval čaj O2, který je ve formě dlouhých nesvinutých listů. Vzorky O1 a O3, které jsou svinuté v podobě kuliček, měly v prvním nálevu množství kofeinu velmi podobné. Ale vzorek O3 má, po porovnání celkového kofeinu ve všech nálevech, obsah kofeinu vyšší než O1.

Pokles kofeinu z prvního nálevu na druhý byl průměrně o 35 %, to se shoduje s daty získaných z analýzy zelených čajů (pokles průměrně o 34 %). Pouze u vzorku O3 byl obsah kofeinu v druhém nálevu nižší o 4 % než v prvním nálevu. Ve třetím nálevu byl pokles o 44 % kofeinu oproti druhému nálevu a 64 % oproti prvnímu. To se také shoduje s daty získanými z analýzy zelených čajů.

7.2.4 Bílé čaje

U bílých čajů byla provedena analýza u tří vzorků. Analyzován byl nálev první, i když z bílých čajů je možné připravit až tři nálevy.

Výsledky obsahu kofeinu čajů bílých s uvedením směrodatné odchylky (s) jsou znázorněny v Tabulce 9.

Tab. 9. Výsledky obsahu kofeinu v bílých čajích

1. Nálev	Obsah kofeinu [mg/g]	s
B1	15,07	0,04
B2	24,48	0,02
B3	13,86	0,07

Nejvyšší množství kofeinu měl vzorek B2 a to na úrovni hodnot kofeinu v prvním nálevu černého čaje. Vzorek B1 a B2 obsahují kofein v podobné míře jako zelené čínské čaje. Vzorek B3 je fermentovaný pomocí mikroorganismů podobně jako vzorek C8, přesto vzorek B3 měl nejnižší obsah kofeinu z bílých čajů a C8 druhou nejvyšší hodnotu mezi černými čaji. Na základě našich výsledků tedy nelze jednoznačně konstatovat, zdali fermentace pomocí mikroorganismů ovlivňuje obsah kofeinu v bílém čaji.

7.2.5 Maté

Analyzovány byly i dva vzorky cesmíny paraguayské, připravován byl první nálev. Výsledky obsahu kofeinu v nápoji maté s uvedením směrodatné odchylky (s) jsou znázorněny v tabulce 10.

Tab. 10 Výsledky obsahu kofeinu v rostlině cesmína paraguayská

1. Nálev	Obsah kofeinu [mg/g]	s
M1	12,35	0,02
M2	4,08	0,04

Obsah kofeinu ve vzorku M1 dosahoval podobných hodnot jako průměrný obsah kofeinu v prvním nálevu zeleného čaje. Vzorek M2, který prošel pražením, obsahoval jen malé množství kofeinu. Ve srovnání s nepraženou formou (M1) obsahoval vzorek M2 pouze 33 % kofeinu čaje M1.

7.3 Stanovení kofeinu při přípravě ledového čaje

Vzorky černých a zelených čajů byly analyzovány i jako extrakty připravené ve formě ledového čaje dle kapitoly 1.5.

7.3.1 Černé čaje – ledový čaj

Všech 8 vzorků černého čaje bylo připraveno i jako ledový čaj.

Výsledky obsahu kofeinu černých ledových čajů s uvedením směrodatné odchylky (s) jsou znázorněny v Tabulce 11.

Tab. 11 Výsledky obsahu kofeinu v černých ledových čajích

Ledový čaj	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Obsah kofeinu [mg/g]	8,94	5,84	12,33	8,46	5,25	6,48	5,66	13,15
s	0,04	0,01	0,85	0,03	0,19	0,04	0,02	0,01

První nálev černých ledových čajů obsahoval méně kofeinu než první nálev připravený běžnou cestou. Průměrně extrakty obsahovaly pouze 35 % kofeinu, který byl v prvním nálevu při běžné přípravě. Přesto, že při běžné přípravě obsahoval nejvíce kofeinu vzorek C1, při přípravě ledového čaje to byl vzorek C8. Při srovnání pořadí vzorků dle obsahu kofeinu při běžné přípravě a přípravě ledového čaje pořadí ne zcela odpovídá. Dle Castiglioni a také Jeu-Ming [22, 27] se množství kofeinu po delší době extrakce čaje (až 2 hodiny) vyrovná hodnotám při přípravě za použití vyšší teploty.

7.3.2 Zelené čaje – ledový čaj

Vzorky zeleného čaje byly také připraveny jako ledový čaj. Přípravovány byly dva nálevy, mimo vzorku Z8, kde není vhodná příprava druhého nálevu.

Výsledky obsahu kofeinu s uvedením směrodatné odchylky (s) jsou znázorněny v Tabulce 12.

Tab. 12 Výsledky obsahu kofeinu v zelených ledových čajích

Ledový čaj 1. nálev	Obsah kofeinu [mg/g]	s	Ledový čaj 2. nálev	Obsah kofeinu [mg/g]	s
Z1	10,94	0,04	Z1	7,23	0,04
Z2	10,00	0,03	Z2	4,32	0,03
Z3	9,40	0,01	Z3	5,56	0,01
Z4	12,03	0,00	Z4	4,59	0,22
Z5	6,76	0,02	Z5	3,83	0,02
Z6	8,25	0,00	Z6	4,14	0,01
Z7	10,94	0,09	Z7	5,95	0,02
Z8	27,38	0,03			

Nejvyšší množství kofeinu v prvním nálevu obsahoval vzorek Z8 a nejnižší Z6, stejně jako u prvního nálevu přípravy běžnou cestou. Kofein v prvním nálevu zelených čajů dosahoval průměrně 81 % kofeinu prvního nálevu připraveného běžnou přípravou. Vzorek Z8 dosahoval hodnoty ještě o 3 % vyšší a Z5 o 8 % vyšší než v prvním nálevu připraveném běžnou přípravou.

U druhého nálevu byl pokles průměrně o 46 %. Nejvyšší množství kofeinu ze zelených ledových čajů měl vzorek Z1 a nejnižší Z5.

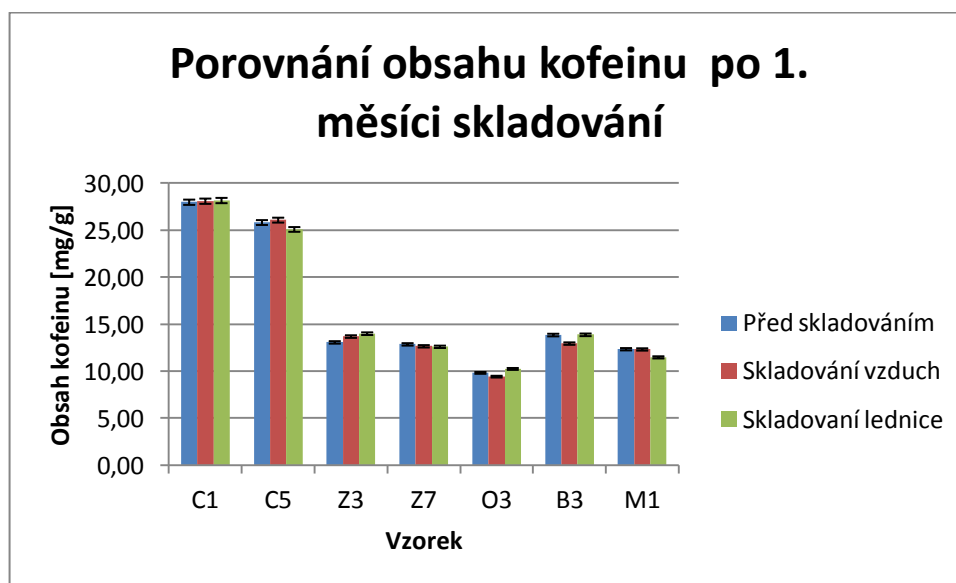
Přestože u běžné přípravy obsahovaly černé čaje kofeinu více, za použití stejných podmínek obsahovaly extrakty zelených čajů větší množství kofeinu. Průměrné množství kofeinu v prvním nálevu ledového čaje u zelených čajů (11,71 mg/g) bylo vyšší než průměrný obsah u ledových čajů černých (8,26 mg/g).

7.4 Stanovení kofeinu v čaji po 1. a 3. měsíci skladování

7.4.1 Obsah kofeinu v čaji po 1. měsíci skladování

Skladováno bylo 8 vybraných vzorků čajů, konkrétně dva čaje černé (Darjeeling Jungpana FTGFOP1 H SPL first flush, Ceylon OP Nuwara Eliya), dva zelené čaje (Gunpowder – Temple of Heaven, Sencha Satsuma), jeden vzorek čaje oolong (Thailand Red Oolong Royal Pearl), jeden vzorek bílého čaje (White Pu-Erh King) a jeden vzorek bylinného čaje maté (Mate Green) a to za přístupu vzduchu a v lednici bez přístupu vzduchu.

Po měsíci skladování byla provedena analýza. Běžnou přípravou byl připraven první nálev. Výsledky obsahu kofeinu po skladování 1. měsíc na vzduchu a v lednici bez přístupu vzduchu jsou znázorněny na Obr. 10 s porovnáním s prvním nálevem před skladováním.



Obr. 10 Porovnání obsahu kofeinu po 1. měsíci skladování

Obsah kofeinu po prvním měsíci skladování na vzduchu se oproti hodnotám získaným z analýzy prvních nálevů vzorků významně nelišil. Oproti původním hodnotám před skladováním byl zde průměrně pokles o 0,9 %. Nejvyšší pokles obsahu kofeinu byl u vzorku White Pu-Erh King (B3) o 6,6 %, a u vzorku Gunpowder - Temple of Heaven (Z3) nárůst o 4,8% oproti obsahu kofeinu před skladováním.

Obsah kofeinu po měsíci skladování v lednici bez přístupu vzduchu se od původních hodnot lišil ještě méně. Byl pozorován nárůst oproti původnímu obsahu kofeinu průměrně

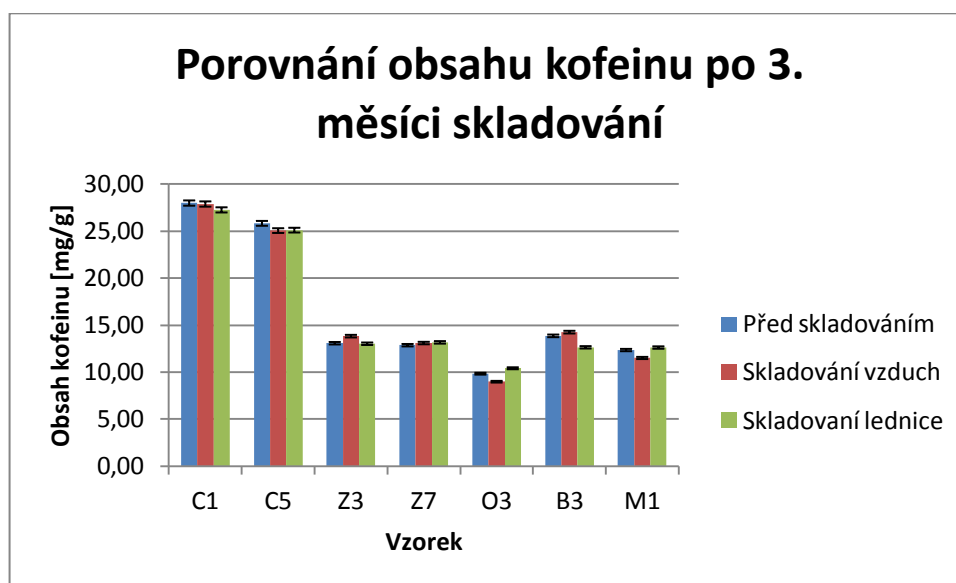
o 0,04 %. U vzorku Mate Green (M1) obsah poklesl o 7,0 % a vzorku Z3 byl nárůst o 7,1 %.

Obsah kofeinu po skladování byl podobný obsahu kofeinu před skladováním. Nebyl zaznamenán žádný zásadní vliv skladování na obsah kofeinu po prvním měsíci.

7.4.2 Obsah kofeinu v čaji po 3. měsíci skladování

Vzorky čajů se nechaly za stejných skladovacích podmínek dále skladovat a po třech měsících skladování proběhla opět analýza. Připravován byl první nálev.

Porovnání obsahu kofeinu po 3. měsíci skladování s prvním nálevem čajů před skladováním je znázorněno na Obr. 11.



Obr. 11 Porovnání obsahu kofeinu po 3. měsíci skladování

Obsah kofeinu po třetím měsíci skladování na vzduchu se lišil více než po měsíci prvním. Zde byl průměrně viditelný pokles o 1,2 %. Největší rozdíl byl zaznamenán u vzorku bílého čaje White Pu-Erh King (B3) a to pokles o 8,7 %. U vzorku Gunpowder - Temple of Heaven (Z3) byl zaznamenán nárůst o 5,8 %.

Hodnoty obsahu kofeinu vzorků skladovaných v lednici bez přístupu vzduchu se více blížily původním hodnotám, to se shoduje s daty získanými z analýzy obsahu kofeinu po

prvním měsíci. Průměrně zde nastal pokles o 0,6 % obsahu kofeinu. Vzorek B3 měl nižší obsah kofeinu oproti hodnotě před skladováním až o 8,8 %.

Po třetím měsíci skladování byly hodnoty pořád blízké původním hodnotám, i když rozdíl u skladování na vzduchu byl vyšší než po měsíci prvním.

Naše výsledky naznačují, že skladování neovlivňuje obsah kofeinu. Nebyla ale nalezena jiná práce zaměřující se na změny obsahu kofeinu v čaji po skladování.

ZÁVĚR

Kofein, alkaloid obsažený ve více než 60 rostlinách, je nejvíce užívaným stimulantem. Je to významná složka čaje a pro povzbudivé účinky kofeinu mnohdy i důvod jeho konzumace.

Analýza kofeinu pomocí HPLC/UV provedená u extraktů při běžné přípravě čaje ukázala, že nejvíce kofeinu v prvním nálevu obsahují čaje černé, kdy se obsah pohyboval v rozmezí 20,27 mg/g - 27,99 mg/g a zelený čaj typu matcha (26,55 mg/g), který obsahoval téměř tolik kofeinu jako černé čaje.

Nefermentované (bílé, zelené) a polofermentované (oolong) čaje obsahovaly v prvním nálevu kofeinu méně než čaje fermentované (černé). Obsah kofeinu v prvním nálevu zelených čajů, mimo čaje typu matcha, se pohyboval v rozmezí 6,23 mg/g – 16,40 mg/g, a čaje oolong 9,84 mg/g – 13,95 mg/g. Obsah kofeinu v bílých čajích, které obsahovaly z nefermentovaných a polofermentovaných čajů kofeinu nejvíce, se pohyboval mezi hodnotami 13,87 mg/g – 24,48 mg/g. Přestože nefermentované a polofermentované čaje měly v prvním nálevu nižší obsah kofeinu než čaje fermentované, umožňují přípravu dalších nálevů. Další nálevy čajů obsahovaly kofeinu méně než nálev první, průměrný pokles u druhého nálevu byl o 35 % a u nálevu třetího o 64 % oproti nálevu prvnímu. Součet obsahů kofeinu všech tří nálevů u zelených čajů byl v rozmezí 14,41 mg/g – 39,23 mg/g a u oolong čajů 16,62 mg/g – 26,66 mg/g. Tyto hodnoty dosahovaly obsahy kofeinu černých čajů, a u některých vzorků zelené čaje (Z4) je i převyšovaly.

Obsah kofeinu u extraktů, které byly připraveny, jako ledový čaj byl podobný u čajů černých i zelených. Rozmezí obsahu kofeinu černých čajů bylo 5,25 mg/g – 13,15 mg/g, u zelených čajů 6,76 mg/g – 12,03 mg/g, mimo čaj matcha (Z8), u kterého byl obsah kofeinu v ledovém čaji 27,38 mg/g. To je hodnota o 3 % vyšší než v extraktu připraveném za použití vyšších teplot. V porovnání s průměrným obsahem kofeinu za použití vyšších teplot obsahovaly ledové čaje průměrně o 42 % kofeinu méně. Tyto data naznačují možnost přípravy dalšího nálevu. U vzorků zelených ledových čajů byl připraven i druhý nálev. Obsah kofeinu ve druhém nálevu ledového zeleného čaje byl o 46 % nižší než v prvním nálevu ledového čaje a hodnoty obsahu kofeinu byly v intervalu 3,38 mg/g – 7,23 mg/g. Lze tedy konstatovat, že za použití stejných podmínek extrakce měli extrakty připravené z černých a zelených čajů podobný obsah kofeinu. Jeden z důvodů vyššího

obsahu kofeinu v černých čajích při běžné přípravě je způsoben vyšší teplotou extrakce než u čajů zelených.

Stanovení obsahu kofeinu po 1. a 3. měsíci skladování neprokázalo žádné zásadní změny. V porovnání s obsahem kofeinu před skladování se hodnoty po skladování lišily v rozmezí 107,1 % až 91,2 % obsahu kofeinu před skladování. Obsah kofeinu vzorků uchovávaných na vzduchu se průměrně lišil více než obsah kofeinu vzorků uchovávaných bez přístupu vzduchu v porovnání s hodnotami před skladování. Po třetím měsíci skladování byl zde průměrně vyšší pokles všech hodnot oproti měsíci prvnímu i vůči obsahu kofeinu před skladování. I zde byl rozptyl hodnot obsahu kofeinu vyšší u vzorků uchovaných na vzduchu než u vzorků uchovávaných bez přístupu vzduchu.

Po porovnání všech získaných dat lze konstatovat, že černé čaje při běžné přípravě mají nejvyšší obsah kofeinu pravděpodobně z důvodu použití vyšší teploty vody. Bílé čaje mají po černých čajích nejvyšší obsah kofeinu. Při přípravě dalších nálevů by konečný součet obsahů kofeinu mohl být ještě vyšší než u čajů fermentovaných (černých). Podobný, ale mírně nižší obsah kofeinu jako u čajů bílých obsahují čaje zelené. Výjimkou je čaj Matcha (Z8), který patrně kvůli odlišné konzistenci má vyšší obsah kofeinu v prvním nálevu než je tomu u ostatních nefermentovaných čajů, ale u čajů tohoto typu není vhodná příprava dalších nálevů. Čaje oolong mají průměrně nižší obsah kofeinu než čaje zelené, ale hodnoty si jsou stále velmi blízké. Bylinný čaj z listů Cesmíny paraguayské (M1) obsahuje kofein jako průměrný zelený čaj, ale u maté není doporučena příprava dalších nálevů. Pražená forma maté (M2) má nejmenší obsah kofeinu ze všech zkoumaných vzorků.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Velíšek, Jan. *Chemie potravin 2*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 8090239145
- [2] Preedy, Victor R. *Caffeine: chemistry, analysis, functions and effects*. Cambridge: RSC Publishing, 2012. ISBN 978-1-
- [3] Douša, Michal. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. Brno: ÚKZÚZ, 2002. ISBN 80-865-4809-0
- [4] Pettigrewová, Jane. *Čaj - průvodce pro znalce*. Praha: Slovart, 2002. ISBN 80-7209-212
- [5] Y. H. HUI. *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*, CRC Press, Stanfield, 2004. ISBN: 978-0-203-91355-0
- [6] Chi-Tang Ho. *Tea and Tea Products: Chemistry and Health-Promoting Properties*. CRC Press, 2008. ISBN-10: 0849380820
- [7] Victor R. Preedy. *Tea in Health and Disease Prevention*. Academic Press, 2012. ISBN: 978-0-12-384937-3
- [8] Matthew E Harbowy. *Tea chemistry*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1997. DOI: 10.1080/07352689709701956
- [9] Wachendorfová viola. *Čaj - vše o historii čaje*. Slovart 2008. ISBN: 978-80-7209-922-1,
- [10] *Statistika spotřeby potravin českého statistického úřadu*, dostupné na <https://www.czso.cz/documents/10180/32782524/2701391601.pdf/ceb2a48c-c8b3-4383-b684-f12ff8bcd1fe?version=1.0>
- [11] Bertil B. Fredholm, *Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use*. *Pharmacological Reviews* March 1999, 51 (1) 83-133;
- [12] Vyhláška: 330/1997 Sb. Dostupné na stránce: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-330>
- [13] Sabu M Chacko. *Beneficial effects of green tea: A literature review*. *Chinese Medicine*, 2010, 5:13. DOI: 10.1186/1749-8546-5-13
- [14] Y. Hilal and U. Engelhardt. *Characterisation of white tea – Comparison to green and black tea*. Braunschweig University, Department of Food Chemistry, Braunschweig, Germany, 2007. DOI 10.1007/s00003-007-0250-3

- [15] Iqbal Hossain. Black tea manufacturing. LAP Lambert Academic Publishing. 2015. ISBN-13: 978-3-659-79558-9
- [16] Malviya R, Bansal V. High performance liquid chromatography: a short review, Department of pharmaceutical technology, Meerut Institute of Engineering and Technology, Meerut, India, 2010. ISSN 0975 – 8542
- [17] Ian M Bird. High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. Department of Biochemistry, University of Edinburgh. 1989
- [18] Leo M.L. Nollet. Food analysis by HPLC. CRC Press. 2012. ISBN 9781439830840
- [19] Chie Koshiishi. A new caffeine biosynthetic pathway in tea leaves: utilisation of adenosine released from the S-adenosyl-L-methionine cycle. Department of Molecular Biology and Biochemistry, Ochanomizu University, Tokyo, Japan. 2001.
- [20] Conrad Astill. Factors Affecting the Caffeine and Polyphenol Contents of Black and Green Tea Infusions. United Kingdom. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 5340-5347.
- [21] Gary Warner Sanderson. Patent: Cold water extractable tea leaf and process, 1977, US 4051264 A.
- [22] Sara Castiglioni. Influence of steeping conditions (time, temperature, and particle size) on antioxidant properties and sensory. Conference Paper, 2015.
- [23] Hiroshi Ashihara, Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering, *Phytochemistry* 69 (2008) 841–856, 2008
- [24] S.P.J. Namal Senanayake Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review, *Journal of Functional Foods* Volume 5 2013,
- [25] Sara H.A. Alipour, Temperature and Time of Steeping Affect the Antioxidant Properties of White, Green, and Black Tea Infusions, *Journal of Food Science* 2015, DOI: 10.1111
- [26] Michael D. McAlpine, Influence of Steep Time on Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Black, Green, Rooibos, and Herbal Teas, Canada 2016, DOI:10.3390

- [27] Jeu-Ming P, Effects of Temperature and Water Steeping duration on antioxidant activity and caffeine content of tea, MC-Transaction on Biotechnology 2015, Vol. 7, No. 1, e3
- [28] Nobuyuki Hayashu, Tomomi UJIHARA & Katsunori KOHATA (2004) Binding energy of tea catechin/caffeine complexes in water Evaluated by Titration Experiments with ¹HNMR, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 68:12, 2512-2518, DOI: 10.1271
- [29] Quan Vuong, L-Theanine: Properties, synthesis and isolation from tea, Journal of the science of food and agriculture, 2011, DOI: 10.1002
- [30] Jenna M. Chin, Caffeine Content of Brewed Teas, Journal of Analytical Toxicology, Vol. 32, 2008.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPLC	Vysokotlaká kapalinová chromatografie
DAD	Detektor diodového pole
UV	Ultrafialová oblast spektra
UV/VIS	Detektor v ultrafialovém-viditelném spektru (180 – 800 nm)
ATP	Adenosintrifosfát
CTC	Crushing, tearing, curling

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 Camellia sinensis (http://www.plantsrescue.com)</i>	12
<i>Obr. 2 Druhy čaje (http://www.octaviatea.com/)</i>	14
<i>Obr. 3 Zelený čaj matcha (http://www.mightyleaf.com/)</i>	15
<i>Obr. 4 Vzorec katechinů přítomných v čaji (Matthew E. Harbowy, Tea chemistry)</i>	21
<i>Obr. 5 Strukturní vzorec kofeinu (http://www.sigmaaldrich.com/)</i>	25
<i>Obr. 6 Schéma biosyntézy kofeinu (Chie Koshiishi, A new caffeine biosynthetic pathway in tea leaves)</i>	27
<i>Obr. 7 Kalibrační křivka kofeinu</i>	40
<i>Obr. 8 Porovnání obsahu kofeinu v zelených čajích</i>	42
<i>Obr. 9 Porovnání obsahu kofeinu v čaji oolong</i>	43
<i>Obr. 10 Porovnání obsahu kofeinu po 1. měsíci skladování</i>	47
<i>Obr. 11 Porovnání obsahu kofeinu po 3. měsíci skladování</i>	48

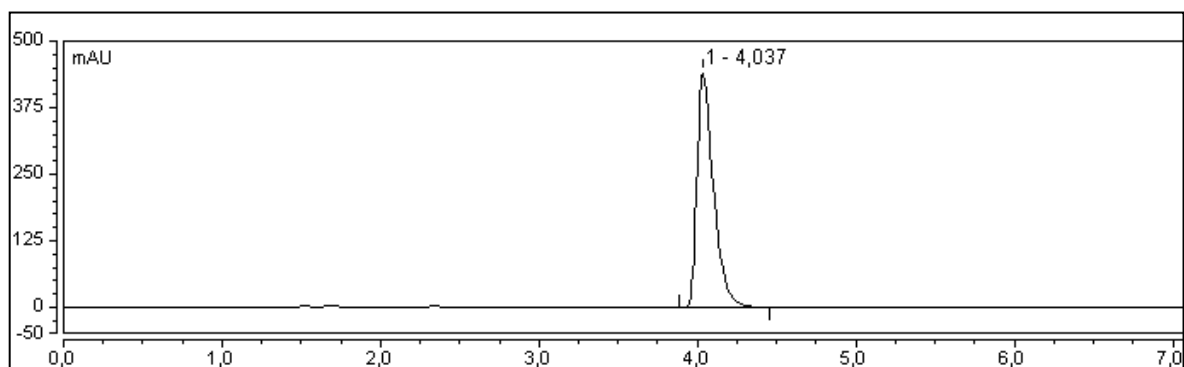
SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Černé čaje</i>	33
<i>Tab. 2. Zelené čaje</i>	34
<i>Tab. 3. Oolong čaje</i>	34
<i>Tab. 4. Bílé čaje</i>	35
<i>Tab. 5. Maté</i>	35
<i>Tab. 6. Hodnoty kalibrační křivky kofeinu</i>	39
<i>Tab. 7. Výsledky obsahu kofeinu v černém čaji</i>	41
<i>Tab. 8. Výsledky obsahu kofeinu v zelených čajích</i>	41
<i>Tab. 9. Výsledky obsahu kofeinu v bílých čajích</i>	44
<i>Tab. 10. Výsledky obsahu kofeinu v rostlině cesmína paraguayská</i>	44
<i>Tab. 11. Výsledky obsahu kofeinu v černých ledových čajích</i>	45
<i>Tab. 12. Výsledky obsahu kofeinu v zelených ledových čajích</i>	46

SEZNAM PŘÍLOH

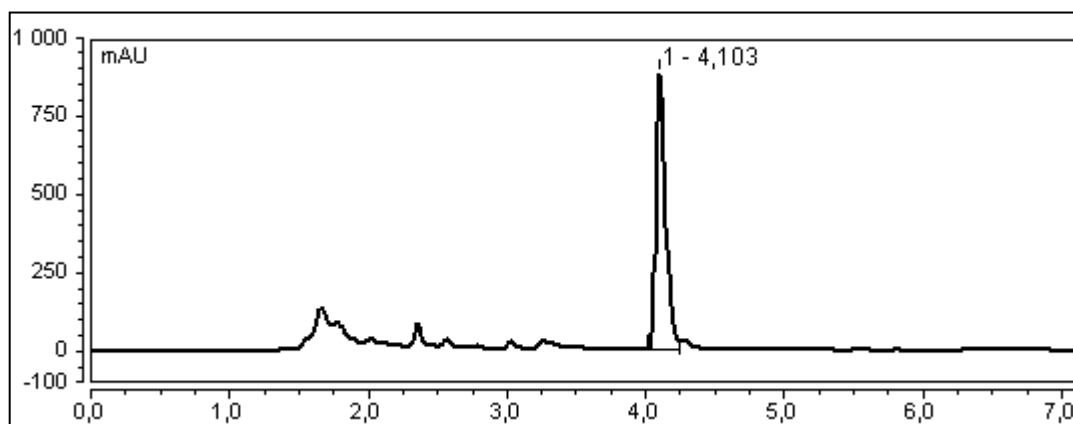
- P I Chromatogram standardu kofeinu (50 $\mu\text{g/ml}$).
- P II Chromatogram extraktu vzorku O2 (první a druhý nálev).
- P III Chromatogram extraktu vzorku C6 (první nálev a ledový čaj)

PŘÍLOHA P I

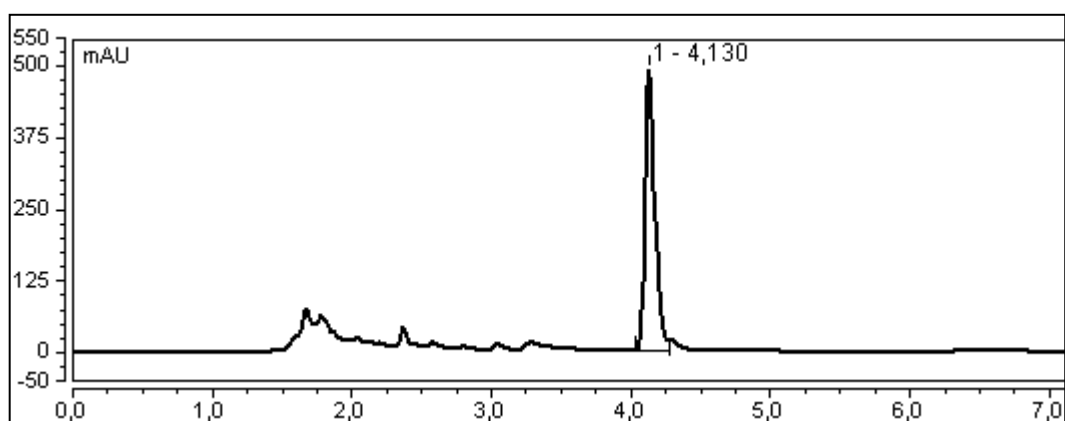


Chromatogram standardu kofeinu 50 $\mu\text{g/ml}$

PŘÍLOHA P II

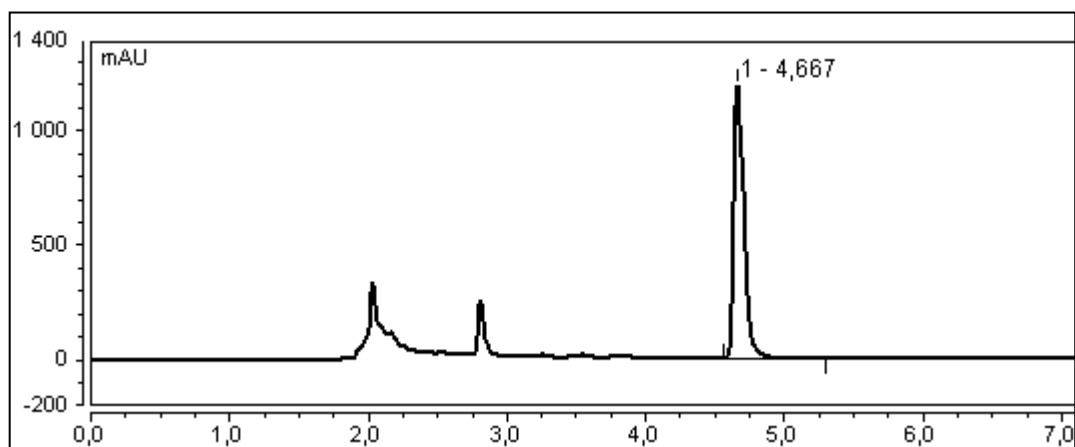


Chromatogram extraktu vzorku O2 (první nálev)

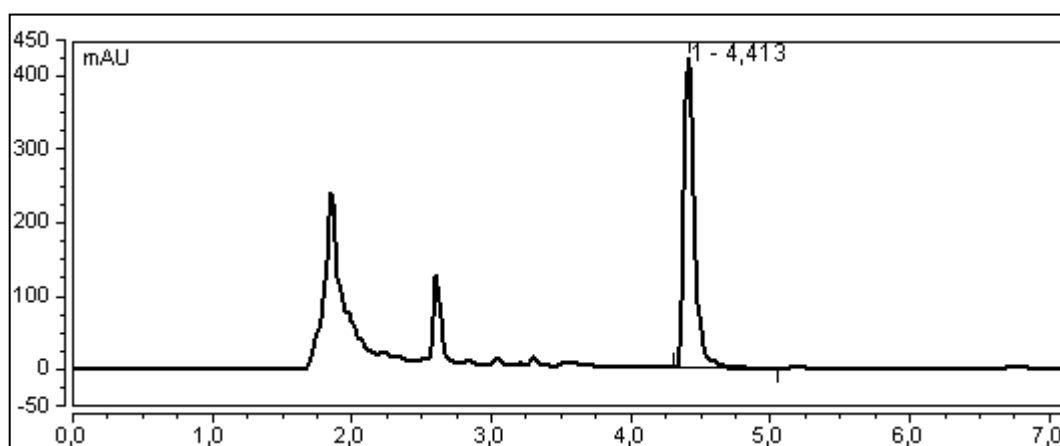


Chromatogram extraktu vzorku O2 (druhý nálev)

PŘÍLOHA P III



Chromatogram extraktu vzorku C6 (první nálev)



Chromatogram extraktu vzorku C6 (ledový čaj)