

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

ANALÝZA THEANINU PLYNOVOU CHROMATOGRAPHIÍ

Bakalářská práce

Autor práce:

Karolína Morcinková

Studijní obor:

Chemie

Forma studia:

Prezenční

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Olomouc 2019

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá netradičním způsobem analýzy theaninu pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Přítomnost této aminokyseliny byla zkoumána v různých druzích čajů a vzorků bylin.

Nezbytnou součástí zpracování vzorků byl proces derivatizace, ke kterému bylo použito činidlo methylchlorformiát. Ke kvantifikaci theaninu ve vybraných vzorcích byly zvoleny dvě metody, metoda vnitřního a vnějšího standardu. Jako vhodnější byla zvolena metoda vnitřního standardu. Zjištěné koncentrace theaninu se v Pu-Erh, zelených a černých čajích pohybovaly od 1,010 do 2,356 mg/g, přičemž nejvíce theaninu obsahovala Matcha. U bylinných čajů nebyla tato aminokyselina detegována, vyjma máty, kde byl theanin obsažen ve velmi malém množství.

SUMMARY

In this study an unconventional analysis of theanine by gas chromatography with mass spectrometry is used. The presence of this amino acid was investigated in different kinds of teas and samples of herbs.

Derivatization was the necessary part of sample preparation with methyl chloroformate as derivatization reagent. The methods of internal and external standard were used for theanine quantification in selected samples. Using the method of internal standard the concentration of theanine in Pu-Erh, green and black teas was from 1,010 to 2,356 mg/g. Matcha tea contained the most theanine. This amino acid wasn't detected in herbal teas except for mint tea which contained very small quantity of theanine.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci na téma **Analýza theaninu plynovou chromatografií** vypracovala samostatně. Využila jsem pouze prameny, které uvádím v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, aby má bakalářská práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne:

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Doc. RNDr. Petru Bartákovi za ochotu, odborný dohled a mnoho užitečných rad, které mi poskytl při psaní mé bakalářské práce.

Poděkování patří také mé rodině za trpělivost a podporu po celou dobu studia.

Tato závěrečná práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA_PrF_2018_027 a IGA_PrF_2019_028).

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Pěstování čaje	9
2.2	Druhy čaje dle způsobu zpracování	9
2.2.1	Zelený čaj	9
2.2.2	Černý čaj	10
2.2.3	Oolong	10
2.2.4	Bílý čaj	11
2.2.5	Pu-Erh	11
2.3	Další druhy čajů	11
2.3.1	Čaj maté	11
2.3.2	Matcha	11
2.4	Chemické látky obsažené v čajích	12
2.4.1	Alkaloidy	12
2.4.2	Polyfenoly	13
2.4.3	Aminokyseliny	15
2.4.4	Minerály a vitamíny	17
2.4.5	Silice	17
2.5	Metody použité při analýze theaninu	18
2.5.1	Plynová chromatografie	18
2.5.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	20
2.5.3	Kapilární elektroforéza	21
2.6	Použití plynové chromatografie při analýze dalších látek obsažených v čaji	22
2.6.1	Alkaloidy	22
2.6.2	Polyfenoly	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
3.1	Přístrojové vybavení a pomůcky	23
3.2	Chemikálie	23
3.2.1	Derivatizační činidla	23

3.2.2	Rozpouštědla.....	24
3.2.3	Standardy.....	24
3.2.4	Analyzované vzorky.....	24
3.2.5	Ostatní chemikálie.....	24
3.3	Pracovní postup.....	25
3.3.1	Příprava vzorků.....	25
3.3.2	Příprava roztoku standardů.....	25
3.4	Experimentální podmínky.....	25
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	26
4.1	Teplota nástřiku	26
4.2	Derivatizační činidlo	27
4.3	Vnitřní standard.....	28
4.4	Vyhodnocení	36
5	ZÁVĚR	40
6	LITERATURA.....	41

1 ÚVOD

Čaj, po celé Asii známý jako jeden z největších čínských pokladů, je hned po vodě druhým nejužívanějším nápojem na světě. Od počátku byl čaj spojován se zdravím a uznáván pro svou schopnost zahánět únavu, stimulovat psychické síly a zvyšovat hladinu energie. Stimulující vliv čaje harmonizuje dva zdánlivě protikladné elementy naší psychiky – bdělost a uvolnění.

Dnes máme na trhu velké množství bylinných čajů, které byly samozřejmě v Číně vždy tradicí, více ovšem v roli léku nežli nápoje. [1]

Teoretická část této bakalářské práce je zaměřena na typické látky obsažené v čajích. Experimentální část je věnována aminokyselině theaninu a její analýze plynovou chromatografií.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Pěstování čaje

Čajovník je stále zelená rostlina s malými bílými květy. Je domovem v Tibetu, Číně a severní Indii. Odrůd čajovníků je pouze několik, zatímco druhů čaje je bezpočet. Rozdíly mezi nimi jsou dány odrůdou rostliny, metodami zpracování, ale i topografií, druhem půdy a podnebím čajových oblastí, z nichž pocházejí.

Místa vhodná k pěstování čajovníku obepínají Zemi v širokém pásmu po obou stranách rovníku. Nejvýhodnější oblasti pro jeho pěstování leží v horských oblastech v nadmořské výšce do 1800 metrů. Velká výška chrání rostlinu před nadměrným slunečním svitem a vytváří vlhkost a teploty, v nichž se listy a výhonky vyvíjejí pomalu a zůstávají měkké. Pěstováním rostlin za těchto podmínek se zvyšuje obsah kofeinu, aminokyselin a silic. [1]

2.2 Druhy čaje dle způsobu zpracování

Ačkoli se pro výrobu zeleného a černého čaje hodí jiné odrůdy čajovníků, pocházejí oba druhy čaje ze stejné rostliny. Rozdíl je ve způsobu zpracování, tedy v procesu nepřesně označovaném jako fermentace. Fermentace znamená kvašení, což je proces, který v čaji ani zdánlivě neprobíhá. Ve skutečnosti se jedná o oxidaci polyfenolů, která vede k chemickým změnám v čajových lístcích a způsobuje jejich tmavnutí. [1,4]

2.2.1 Zelený čaj

Při ruční výrobě zeleného čaje se nechávají listy nejdříve zavadnout. Poté se deenzymují pražením na pánvi, aby se enzymy obsažené v buňkách umrtvily a nedocházelo tak k fermentaci. Následuje sušení na bambusových platech, během něj se listy načechrávají, obracejí a několikrát se při tom ručně svinují. [1]

Při mechanizovaném způsobu zpracování se používají dva postupy, které mají zabránit fermentaci čajových lístků, a sice metoda napařování a metoda pražení. U první metody se na listy krátce působí horkou vodní parou nebo se listy na krátkou dobu ponoří do vroucí vody. Při druhé z uvedených metod se listy praží ve velkém bubnu, který má uvnitř

několik vyhřívacích tyčí. Stálým otáčením bubnu s proudem horkého vzduchu, jehož teplota dosahuje zhruba 90 °C, se listy usuší. [2]

2.2.2 Černý čaj

Černý čaj je zoxidován nejvíce a obsahuje tedy jak okysličené, tak i neokysličené polyfenoly. Oba mají v čaji svou podstatu. Okysličené vytváří aroma a barvu černého čaje, zatímco neokysličené polyfenoly dodávají nápoji charakteristickou trpkost.

Metoda zpracování černého čaje se skládá ze čtyř kroků: zavadnutí, svinování, fermentování a sušení (deenzymace). Listy se rozprostrou na bambusových platech a nechají se uschnout na vzduchu. Tím ztratí asi 30 % vlhkosti a získají potřebnou poddajnost. Poté následuje svinování, jehož cílem je narušit povrch listů a rozbít membrány, aby došlo ke spojení katechinů s enzymem polyfenolázou, který spouští jejich oxidaci. Listy se rozprostrou na chladném místě a fermentace pokračuje několik dalších hodin. Při fermentaci listy absorbují kyslík, který aktivuje enzymy vytvářející silice a působící další chemické změny, jako například oxidaci některých polyfenolů. Původní zelená barva listů se mění na tmavě hnědou. Posledním krokem je sušení, které se provádí na velkých kovových pánvích na prudkém ohni. Tímto procesem se zastavuje činnost enzymů, sterilizují se listy a dochází k ukončení fermentace. Nakonec se listy proséváním rozdělí podle velikosti. [1]

2.2.3 Oolong

Čaje oolong jsou polofermentované, tvoří tedy přechod mezi zelenými a černými čaji. Jejich výroba je dosti náročná. Natrhané čajové lístky se rozprostrou na kusy látky a na rozdíl od ostatních čajů se nechávají zavadnout na přímém slunci. Poté se listy naplní do bubnů, kde se znovu suší a přetřásají, aby se buněčné membrány na povrchu listů rozrušily a mohlo dojít k oxidaci. Horké listy se zabalí do kusů bavlněné látky, balíky se převážou šňůrou a zabalené listy se hnětou a válcují. Poté jsou znovu sušeny ve vyhřívaném bubnu. Výhoda této metody spočívá v tom, že oxidace zasahuje jen okraje čajových lístků, zbytek neporušené buněčné struktury si zachovává přírodní polyfenoly. Oxidace je ukončena ve chvíli, kdy se okraje listů zbarví do černa, ale střed listů zůstává zelený. Po takovémto zpracování jsou listy pevné a svinuté. Nakonec jsou ještě jednou zahřívány, aby se zvýšila jejich trvanlivost. [2,4]

2.2.4 Bílý čaj

Bílý čaj se zhotovuje ze zvláštních „bílých“ čajovníků. Na jaře se sbírají ještě nerozvinuté bílé pupeny čajovníků a mladé stříbřité lístky, které se nesmějí zahřívat, svinovat ani lisovat. Pupeny se nechávají zavadnout a přetřásáním na platech se mírně pomačkají. Tím dojde k narušení buněčné membrány, což vede ke slabé oxidaci, brzy přerušené sušením. [2,4]

2.2.5 Pu-Erh

Tento druh čaje vzniká zvláštním postupem a nejčastěji bývá slisován do cihel, koláčů nebo misek. Nejprve se atypicky široké čajové lístky z jarní sklizně ošetřují párou a kulturami speciálních hub, následně se volně plní nebo lisují do malých forem. Poté se skladují v chladu několik měsíců, let nebo dokonce desetiletí. Při dlouhém skladování získává čaj své osobité a zemité aroma. [2]

2.3 Další druhy čajů

2.3.1 Čaj maté

Čaj maté není čajem v pravém slova smyslu, neboť představuje jiný botanický druh, a to sušené listy stromu *Cesminy paraguayské*. Při sklizni se sekají celé větve a listy jsou „preparovány“ máváním větví nad ohněm, tím listová pokožka praská a list se částečně suší. Posléze se listy drtí a balí. [4]

2.3.2 Matcha

Pod tímto názvem se ukrývá unikátní zelený práškový čaj. Vyrábí se z nejkřehčích čajových lístků, které se při zpracování nesvinují, ale po usušení se z nich speciálním způsobem vypreparují žilky. Zbylé listové útržky se rozemelou na čajový pudr jasně zelené barvy. [4]

2.4 Chemické látky obsažené v čajích

Suché lístky čaje obsahují řadu substancí. Nejdůležitější jsou alkaloidy, polyfenoly a aminokyseliny. Při chemické analýze se kromě sušiny a vody zjistila přítomnost dalších látek jako například minerálů, vitamínů a silic.

Při spařování čaje dochází k extrakci účinných chemických látek v závislosti na její délce. První minuty se vylučuje kofein, později tanin. [3]

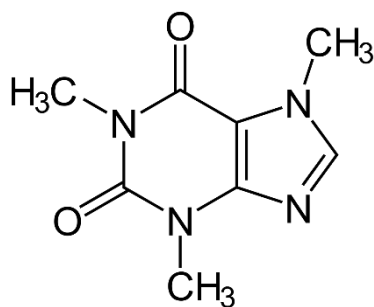
2.4.1 Alkaloidy

Alkaloidy jsou přírodní dusíkaté látky bazického charakteru. Většinou se jedná o bílé krystalické látky nerozpustné ve vodě. U rostlin plní především ochranou funkci, odpuzují býložravce a lákají opylovače. Čajové alkaloidy příznivě ovlivňují činnost centrální nervové soustavy. Mezi alkaloidy přítomné v čajích patří tzv. purinové alkaloidy, a to kofein, theobromin a theofylin. [4]

Kofein

Nejvýznamněji se v čaji uplatňuje thein. Tento xanthinový alkaloid, objevený v čaji v roce 1827, je chemicky identický s alkaloidem kofeinem (Obr. 1) objeveným o osm let dříve v kávě. Kofein je velice ceněný a dobře známý hlavně díky stimulačním účinkům na centrální nervový systém. Dokáže oddálit únavu, zlepšit pozornost a zbystřit myšlení. [6,7]

Zatímco kofein v kávě je přítomen ve volné formě, v čaji je vázán ve formě solí na organické kyseliny. Dalším důvodem odlišného fyziologického působení kofeinu v kávě a čaji na člověka je přítomnost aminokyseliny theaninu, která je pro čaj jedinečná. Díky obsahu katechinů je účinek kofeinu v čaji sice mírnější, leč trvalejší než u kávy. Zelený a částečně oxidovaný čaj nemají nižší obsah kofeinu než čaj černý, jak je často uváděno. Nicméně uvolňují jej pomaleji, takže šálek zeleného čaje či oolongu obsahuje menší množství kofeinu. Jeden šálek černého čaje obsahuje stejné množství kofeinu jako jeden a půl šálku oolongu či tři šálky zeleného čaje. [7,15]

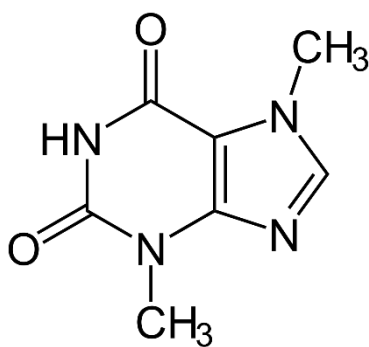


Obr. 1 Strukturní vzorec kofeinu

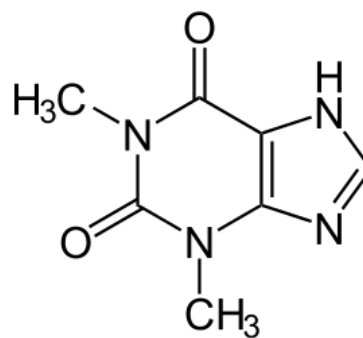
Theobromin a theofylin

Theobromin (Obr. 2) (3,7-dimethylxanthin) patří mezi xanthinové alkaloidy a navzdory svému jménu neobsahuje žádný brom. Tento hořký alkaloid je obsažen zejména v kakau. V čaji se vyskytuje v mnohem menším množství než kofein a nemá prakticky žádný stimulační účinek na centrální nervovou soustavu. [16]

Theofylin (Obr. 3) (1,3-dimethylxanthin) je přírodní alkaloidní derivát xanthinu izolovaný z čajovníku čínského a kávovníku. Na rozdíl od theobrominu má diuretické účinky a také stimulační účinky na srdeční a centrální nervový systém. [17]



Obr. 2 Strukturní vzorec theobrominu



Obr. 3 Strukturní vzorec theofylinu

2.4.2 Polyfenoly

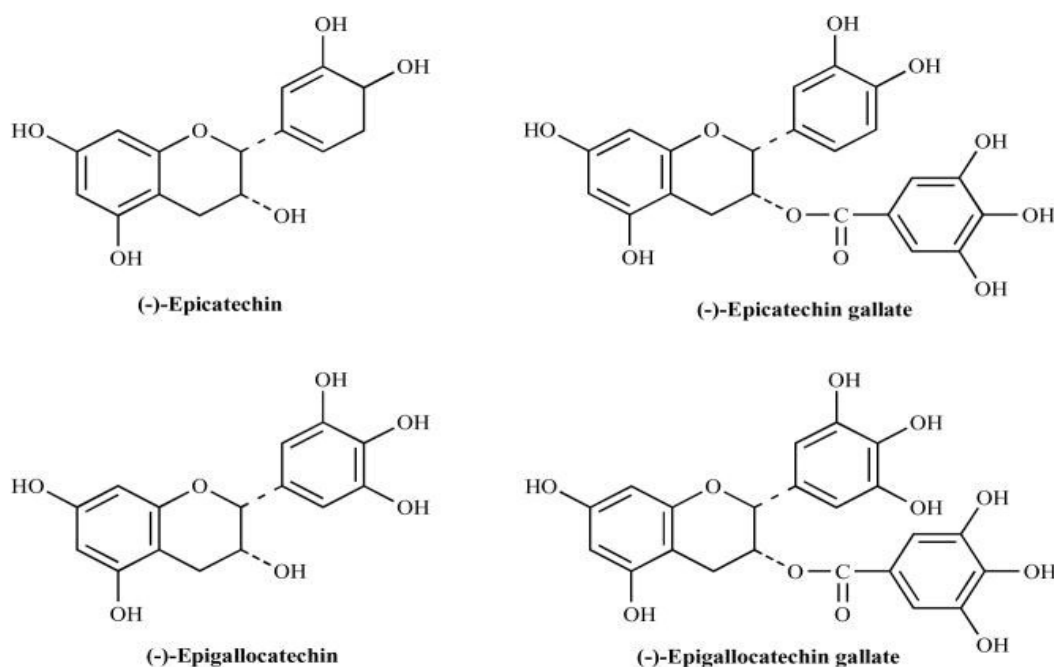
Polyfenoly jsou obrovskou skupinou látek vyskytující se v rostlinách. Jsou to přírodní nebo syntetické aromáty substituované jednou či více hydroxylovými skupinami.

Dle vlastností je můžeme dělit na chuťové látky (taniny), barviva (flavonoidy, xanthony), přírodní antioxidanty (flavonoidy), vonné látky (některé benzochinony, kumariny). [15,21]

Katechiny

Nejdůležitější flavonoidy obsažené v čajích jsou katechiny, zejména epikatechin (EC), epigallokatechin (EGC), epikatechin galát (ECG) a epigallokatechin galát (EGCG) (Obr. 4). [5]

Mají mnoho zdraví prospěšných účinků, působí jako antioxidanty a proti zánětům. Katechiny, obsažené zejména v zeleném čaji, blokují působení některých karcinogenů a snižují jejich obsah v krvi až o 90 %. Obsah katechinů v zeleném čaji je až trojnásobně vyšší než v černém čaji kvůli fermentaci. Nejrozšířenějším katechinem je EGCG, který tvoří až 65 % z celkového množství katechinů přítomných v čaji. Tyto látky jsou hlavními nositeli chuti a barvy nápoje. [4,6,23]



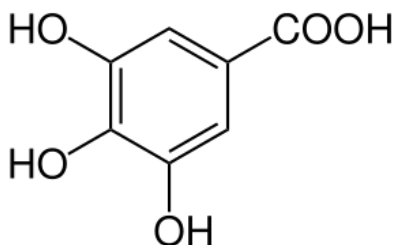
Obr. 4 Struktury katechinů obsažených v čaji

Třísloviny (taniny)

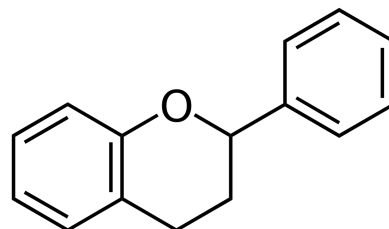
Třísloviny jsou rostlinné polyfenoly vyznačující se trpkou chutí. Působí především jako ochrana před býložravci, ale také jako pesticidy či regulátory růstu rostlin. [12]

Z chemického hlediska se dělí do dvou hlavních skupin hydrolyzovatelné a kondenzované. Hydrolyzovatelné třísloviny se skládají ze sacharidu spojeného esterovou vazbou s fenolickou kyselinou, zejména kyselinou gallovou (Obr. 5) a jejími deriváty. Větší

skupinu tvoří kondenzované taniny, které neobsahují ani sacharidovou složku, ani fenolické kyseliny. Jsou odvozeny od základního skeletu flavanu (Obr. 6), který je substituován alkoholickými skupinami v poloze 3 (3-flavanol) nebo 3 a 4 (3,4-flavandiol). Spojením těchto monomerů vznikají kondenzované trísloviny. [11,14]



Obr. 5 Struktura kyseliny gallové



Obr. 6 Struktura flavanu

2.4.3 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou karboxylové kyseliny substituované vesměs jednou primární aminoskupinou, méně často sekundární aminoskupinou vázanou v cyklu. Na stavbě bílkovin se podílí jen 20 základních aminokyselin, které se označují jako kódované. V biologických materiálech je naprostá většina aminokyselin vázaná v bílkovinách, jen malý podíl je ve volné formě. [11]

Theanin

Kromě již zmíněného kofeinu obsahuje čaj i další biologicky aktivní látky s povzbuzujícím účinkem jako například theanin (Obr. 7). L-theanin je derivátem L-glutaminu (L- γ -glutamylethylamid nebo N⁵-ethyl-L-glutamin). Je to bezbarvá, lehce sladká a ve vodě rozpustná sloučenina s molekulovou hmotností 174,2 g/mol. Teplota tání této látky je 214–215 °C a je řazena mezi neesenciální aminokyseliny. Poprvé byl nalezen na počátku devadesátých let v čajových lístcích (*Camellia sinensis*). Dalším přírodním zdrojem theaninu je hřib *Xerocomus basius*, který se v přírodě vyskytuje vzácně. Průměrný obsah theaninu v čerstvých čajových lístcích tvoří 1,2–6,2 mg/g, obsah této aminokyseliny v usušených listech je 1–2,5 % z celkové hmotnosti. [22,34]

Theanin je chirální sloučenina, vyskytuje se tedy ve formě dvou enantiomerů. V čaji je přítomen převážně L-theanin, D-isomer se v tomto nápoji vyskytuje jen ve velmi malém

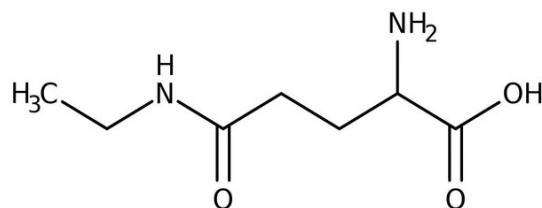
množství. Ukázalo se, že mezi těmito enantiomery jsou značné rozdíly. D-theanin je ihned vylučován močí, zatímco L-theanin je nejdříve metabolizován na ethylamin a kyselinu glutamovou a poté je vyloučen ven z těla. Dále bylo zjištěno, že L-theanin je lépe absorbován v těle a pokud jsou oba enantiomery podávány současně, působí jako antagonisté. Z těchto rozdílů je patrné, že enantiomery této aminokyseliny nejsou bioekvivalentní. Jelikož jsou potravinové doplňky obvykle směsí enantiomerů, může být jejich působení rozdílné v závislosti na jejich enantiomerním složení. [7,20,22,34]

Dlouho se o této aminokyselině nic nevědělo, před pár lety se objevily vědecké studie prokazující jeho pozitivní vliv na emoční stav, kvalitu spánku, kardiovaskulární choroby, rakovinu a obezitu. Dále L-theanin zvyšuje produkci dopaminu a serotoninu v mozku, čímž vyvolává relaxační účinky. Bylo také zjištěno, že L-theanin působí proti stimulačnímu účinku kofeinu. Kombinace L-isomeru této aminokyseliny s kofeinem zvyšuje schopnost soustředit se. [7,9]

Izolace theaninu z čaje a dalších zdrojů je velmi komplikovaná a drahá. Především kvůli jeho příznivým účinkům bylo provedeno mnoho pokusů týkajících se jeho biochemické a chemické syntézy. Například v publikované práci Tachiki a kolektiv [35] byl theanin syntetizován z glutamátu a ethylaminu v přítomnosti pekařských kvasnic jako zdroje ATP a bakteriální glutamin syntetázy. Kvůli nízké reaktivitě glutamin syntetázy s ethylaminem nebyl výtěžek reakce uspokojivý.

L-theanin nejenže zvyšuje chuť a kvalitu čaje, ale také hraje významnou fyziologickou roli v čajovníku. Tato látka je syntetizována z kyseliny glutamové a ethylaminu pomocí theanin syntetázy v kořenech čajovníku, odkud je transportován do nově rostoucích lístků, kde slouží jako zdroj dusíku. Po vystavení slunečnímu záření se L-theanin hydrolyzuje na své prekurzory a uvolňuje glutamin a ethylamin, které dále slouží jako prekurzory syntézy katechinu. V těle se L-theanin neshromažďuje, ale je metabolizován v krvi, játrech a mozku. Do 24 hodin je kompletně eliminován z těla močí. [24, 34]

V experimentech na opicích bylo zjištěno, že L-theanin tlumí abstinenční příznaky opiátů. V další zkoušce na myších byly zjištěny jeho anxiolytické účinky. Výsledkem těchto experimentů bylo zjištění, že tato aminokyselina je vhodná pro zmírnění abstinenčních příznaků u lidí a je také vhodná pro léčbu poruch souvisejících s úzkostí. [8]



Obr. 7 Strukturní vzorec theaninu

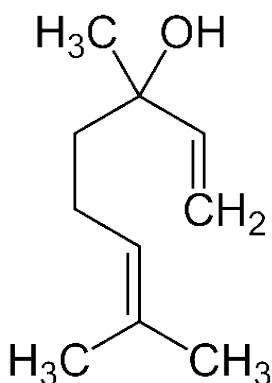
2.4.4 Minerály a vitamíny

Čaje obsahují také širokou škálu významných minerálů, jako například draslík, hliník, hořčík, vápník, zinek, železo, fosfor, sodík, fluor a mangan. Dále v tomto nápoji nalezneme vitamíny. Nejvýše na seznamu je vitamín C, jehož obsah v zeleném čaji je desetkrát vyšší než v čaji černém. Z dalších vitamínů se v čaji nachází vitamín D, K a B₂. [4,10]

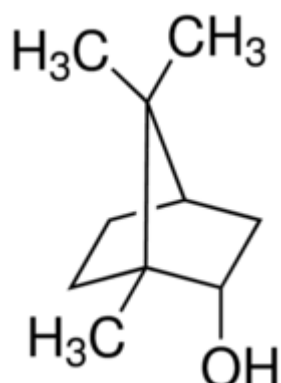
2.4.5 Silice

Silice neboli éterické oleje jsou složité směsi vonných těkavých látek obsažených v přírodních rostlinných materiálech. Většina silic obsahuje značný podíl terpenových (monoterpenových a seskviterpenových) uhlovodíků. Tyto terpenové uhlovodíky jsou často příčinou zhoršení kvality silic, protože na vzduchu snadno oxidují nebo podléhají polymeraci. Pro vonný a chuťový charakter silic nemají terpenové uhlovodíky zásadní význam, hlavní nositelé chuti a vůně jsou kyslíkaté látky (alkoholy, aldehydy, ketony, estery, atd).

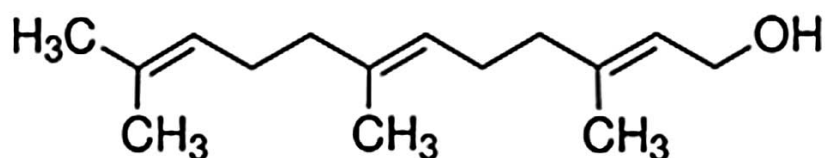
Charakteristickými složkami různých silic jsou acyklické monoterpenové alkoholy. Z běžných alifatických alkoholů je nejvýznamnější linalool (3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol). Významnou aromatickou složkou silice šalvěje je bicyklický monoterpenový alkohol borneol (1,7,7-trimethyl-bicyklo[2.2.1]heptan-2-ol). Složkou aromatu čaje je seskviterpenový alkohol farnesol ((2E,6E)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-ol). [38]



Obr. 8 Strukturní vzorec linaloolu



Obr. 9 Strukturní vzorec borneolu



Obr. 10 Strukturní vzorec farnesolu

2.5 Metody použité při analýze theaninu

2.5.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je metoda určená k separaci a identifikaci plynů, kapalin i pevných látek. Jednotlivé složky se dělí mezi dvě fáze, fázi pohyblivou – mobilní a fázi nepohyblivou – stacionární.

Zpracování některých vzorků pro analýzu plynovou chromatografií vyžaduje proces zvaný derivatizace. Například vysokomolekulární látky s funkčními skupinami -OH, -NH₂, -COOH nelze analyzovat přímo, protože jsou vlivem těchto skupin značně polární a málo těkavé. Obvykle tak dochází k jejich adsorpci v koloně a tím k chvostování píků. Přípravou vhodných derivátů lze tyto potíže odstranit. Hlavním cílem derivatizace v plynové chromatografii je zvýšení těkavosti, zlepšení účinnosti separace, zvýšení tepelné stability látek a citlivosti detekce. Tento proces může umožnit separaci látek, které se jako volné nedají vůbec oddělit.

Deriváty jsou obvykle připraveny odděleně od chromatografického systému. Méně běžným způsobem je příprava derivátů přímo v dávkovacím prostoru nebo v chromatografické koloně dávkováním vzorku a derivatizačního činidla za sebou v rychlém časovém sledu, nebo současným dávkováním. Takovou přípravu derivátů lze použít jen v případě, kdy derivatizační reakce probíhá dostatečně rychle. [30]

Při derivatizaci je aktivní vodík, který je součástí polární skupiny, nahrazen alkylovou, silylovou nebo acylovou skupinou. Z hlediska reakcí, které probíhají při tvorbě derivátů, můžeme tento proces rozdělit na silylaci, alkylaci/esterifikaci a acylaci. Silylace slouží ke tvorbě vysoce těkavých a tepelně stabilních derivátů. Nejčastější reakce jsou trimethylsilylační, při kterých je aktivní vodík nahrazen trimethylsilylovou skupinou. Při alkylaci dochází k záměně aktivního vodíku za alifatickou nebo alifaticko – aromatickou skupinu. Deriváty jsou stabilnější a méně polární než původní látky. Mezi často používaná alkylační činidla patří alkylbromidy a alkyljodidy. Esterifikací se rozumí kondenzační reakce karboxylové skupiny s hydroxylovou skupinou alkoholu nebo fenolu za tvorby esteru. Kvůli nejvyšší těkavosti ze všech esterů a vysokým výtěžkům mají největší význam methylestery. Deriváty charakteristické nižší polaritou, vysokou těkavostí a stabilitou vznikají acylací. Při této reakci je vodík na polární skupině vyměněn za skupinu acylovou.

U látek obsahujících dvě a více polárních funkčních skupin (např. aminokyseliny) dochází k jejich vzájemné interakci, ty vedou ke tvorbě vodíkových vazeb, kvůli kterým jsou tyto látky netěkavé. Aminokyseliny jako silně polární látky nelze analyzovat plynovou chromatografií přímo, ale musí se nejdříve převést na vhodný těkavější derivát. Nejběžnějšími činidly při derivatizaci aminokyselin jsou chlorformiáty a N,O-bis-(trimethylsilyl)acetamid (BSA). [31]

V práci [28] se Y. Sakamoto a kolektiv zabývají stanovením komponent ve vzorku zeleného čaje pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Derivatizace byla provedena s použitím dvou derivatizačních činidel N-methyl-N-trimethylsilyl trifluoroacetamidu a roztoku methoxyaminu. Touto metodou bylo detegováno 71 složek. Jednou z látek, která byla touto cestou identifikována v nemalém množství byl i theanin.

2.5.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC je separační metoda, kde je směs látek obsažených ve vzorku rozdělena na jednotlivé složky průchodem kolonou. Separace látek je uskutečněna na základě rozdílné distribuce dělených složek mezi dvě fáze, mobilní a stacionární.

Nejčastěji se příprava vzorků čaje pro analýzu theaninu pomocí HPLC provádí následovně. Čajové lístky se nejdříve rozdrtí na jemné částičky a poté jsou extrahovány v destilované vodě či methanolu. Jednotlivé postupy se liší zejména v době extrakce, druhu a teplotě extrakčního činidla.

Separace některých sloučenin pomocí HPLC vyžaduje již zmíněný proces derivatizace především kvůli detekci. Ten se může provádět buď před kolonou, nebo za ni. Pomocí derivatizačních činidel se mění chemické a fyzikální vlastnosti analytu. Pro derivatizaci před kolonou se používá dansylchlorid, 9-fluorenyl-methyloxycarbonyl chlorid, o-ftalaldehyd (OPA) a fenylisothiokyanát. Nejčastěji používaným činidlem pro derivatizaci za kolonou je ninhydrin.

V práci publikované Y. Zhu a kolektiv [18] byla prováděna analýza aminokyselin v různých vzorcích čaje Pu-Erh pomocí HPLC a za použití předkolonové derivatizace. Byl použit systém Shimadzu HPLC vybavený UV detektorem. Mobilní fáze byla složena z rozpouštědla A, které obsahovalo 0,1M octan sodný a acetonitril v poměru 97:3 a rozpouštědla B složeného z acetonitrilu a vody v poměru 4:1. Čajové lístky byly extrahovány v destilované vodě při 80 °C po dobu třiceti minut. Jako derivatizační činidlo byl v tomto postupu použit fenylisothiokyanát. Bylo prokázáno, že theanin je přítomen ve všech vzorcích. Z tohoto experimentu vyplývá, že použití zmíněné metody je vhodné pro rychlé a spolehlivé stanovení aminokyselin v čajích.

V další publikované práci R. Horanni a U.H. Engelhardt [26] byla prováděna analýza devatenácti aminokyselin (mezi nimi byl i theanin) v 86 vzorcích čaje pomocí HPLC. Detekce byla prováděna pomocí detektoru s diodovým polem. Opět byla jako extrakční činidlo použita destilovaná voda, tentokrát byly čajové lístky zality vroucí vodou a nechaly se vařit na magnetickém míchadle po dobu 10 minut. I v tomto postupu byl využit proces derivatizace před kolonou a to pomocí 9-fluorenyl-methyloxycarbonyl chloridu (FMOC-Cl). Mobilní fáze A obsahovala 0,1M roztok octanu sodného obsahujícího 0,05% triethylamin a mobilní fáze B byla složena z acetonitrilu a vody v poměru 8:2. Přítomnost theaninu byla prokázána ve všech vzorcích a jeho retenční čas činil zhruba 22 minut.

Práce S. Cheng a kolektiv [27] popisuje použití HPLC při analýze aminokyselin v čaji za použití methanolu jako extrakčního činidla. Znovu byla použita předkolonová derivatizace, tentokrát pomocí o-ftalaldehydu. Detekce byla provedena detektorem s diodovým polem.

2.5.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza patří mezi separační metody založené na elektromigraci v kapiláře. Poskytuje mnoho výhod, především vysoké rozlišení, rychlost analýzy, citlivost a vyžaduje pouze malé množství vzorku. Vysoce účinná je kapilární elektroforéza s LIF (laserem indukovaná fluorescence), bohužel tato metoda vyžaduje použití velmi drahých laserových zdrojů. Jako alternativní zdroje se používají LED diody, které ale nejsou zdrojem monochromatického záření, takže je obtížné zaměřit světlo na malou kapilární kolonu. Pro takovéto případy byl navržen zaostřovací systém složený z plastové čočky a objektivu, který umožňuje efektivní zaměřování světla na malé kapiláry. Stejně jako ve dvou výše uvedených metodách, i zde je v některých postupech použita derivatizace. [19]

Tato metoda je často používána při stanovení aminokyselin. Příprava vzorků pro analýzu theaninu v čajových lístcích zahrnuje jejich extrakci v destilované vodě. Postup přípravy se v publikovaných pracích [19, 25, 29] liší jen teplotou vody a dobou extrakce.

V práci publikované M.M. Hsieh a S.M. Chen [19] byl theanin a další aminokyseliny obsažené v čaji analyzovány kapilární elektroforézou za použití LED diody jako zdroje záření. Čajové lístky byly zality destilovanou vodou o teplotě 25, 50, 75 a 100 °C a extrahovány po dobu jedné minuty. Použitým derivatizačním činidlem byl naftalen-2,3-dikarboxaldehyd. Výsledky prokázaly, že koncentrace uvolněných aminokyselin se zvyšovala s rostoucí teplotou. Smyslem této práce bylo vyvinout jednoduchou, rychlou a citlivou metodu pro analýzu aminokyseliny v čajových lístcích a nápoji. Navrhovaná metoda poskytuje mnoho výhod, jednak je díky použití LED diody jako zdroje poměrně levná, rozlišení a rychlost analýzy lze optimalizovat změnou délky kapiláry.

V další práci H. Horie, T. Mukai a K. Kohata [25] byla analýza theaninu v čaji opět prováděna kapilární elektroforézou. K detekci byl použit UV detektor. Čajové lístky byly extrahovány vroucí destilovanou vodou po dobu pěti minut. Na rozdíl od výše uvedené publikované práce zde neproběhl proces derivatizace. Bylo zjištěno, že ve všech zkoumaných vzorcích čaje byl přítomen theanin. Ve vzorku čaje vyšší kvality Gyokuro bylo theaninu a kofeinu mnohem více než v ostatních vzorcích.

Stanovení theaninu, kofeinu a katechinů v čajových lístcích metodou kapilární elektroforézy je popsáno v práci Ch.N. Chen a kolektiv [29]. Tentokrát probíhala extrakce vroucí destilovanou vodou deset minut. Detekce byla provedena detektorem s diodovým polem. Stejně jako v předchozím postupu, ani zde neproběhla derivatizace.

2.6 Použití plynové chromatografie při analýze dalších látek obsažených v čaji

2.6.1 Alkaloidy

V roce 2018 T. Amini a P. Hashemi [32] analyzovali kofein v čaji metodou homogenní mikroextrakce kapalina-kapalina (HLLME) v kombinaci s plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií. Suché čajové lístky byly suspendovány ve směsi vody a ethanolu. K suspenzi byl přidán dichlormethan jako extrakční činidlo a následně byla směs centrifugována. Nakonec byl 1 µl organické fáze obsahující kofein injektován do GC–MS pro analýzu.

V publikované práci [33] je popsána analýza kofeinu a dalších methylxanthinových derivátů obsažených ve vzorcích čaje, kávy, alkoholických a nealkoholických nápojů metodou tenkovrstevné chromatografie s plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií. Vzorek čajových lístků byl nejdříve rozdrcen na prášek, poté byl smísen s kyselinou sírovou a amoniakem a následně byl extrahován dichlormethanem. Při analýze vzorku plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem bylo použito helium jako nosný plyn. Jako mobilní fáze pro analýzu na tenké vrstvě byly použity dva typy směsí, a to aceton:toluen:chloroform v poměru 40:30:30 a voda:methanol v poměru 7:50. Silikagelová TLC destička byla potažena fluorescenčním indikátorem. Nakonec byla TLC destička vysušena a skvrny jednotlivých složek byly analyzovány pod UV lampou. Tato metoda se prokázala jako vhodná pro kvantitativní a kvalitativní stanovení methylxanthinových derivátů v různých druzích nápojů.

2.6.2 Polyfenoly

V publikované práci P.D. Collier a R. Mallows [36] byly katechiny stanoveny plynovou rozdělovací chromatografií s plameno-ionizačním detektorem. Čajové lístky byly

extrahovány ethylacetátem a poté byla provedena derivatizace za použití N,O-bis-(trimethylsilyl) acetamidu.

V práci [37] je popisováno využití dvou extrakčních metod, mikroextrakce pevnou fází (SPME) a simultánní destilační extrakce (SDE), ve spojení s plynovou chromatografií ke stanovení těkavých látek obsažených v čaji Pu-Erh. Výsledkem této studie byla identifikace 79 těkavých sloučenin ve vzorku, které zahrnovaly dusíkaté sloučeniny, aldehydy, estery, polyfenoly, atd. Ukázalo se, že mikroextrakce na pevné fázi je vhodnější pro vysoce těkavé sloučeniny jako například nízkomolekulární alkoholy, polyfenoly, aldehydy a ketony. Látky s nízkou těkavostí jako vysokomolekulární alkoholy, estery a kyseliny byly extrahovány metodou SDE, která je pro ně výhodnější kvůli delší době extrakce a vyšší použité teplotě.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

- Plynový chromatograf – Agilent 7890A (Agilent, Santa Clara, USA)
- Hmotnostní spektrometr – Agilent 5975C Inert (Agilent, Santa Clara, USA)
- Autosampler – Agilent G4513A (Agilent, Santa Clara, USA)
- Kolona – (30 m × 0,25 mm × 0,1 μm, ZB5-HT, Phenomenex, Torrance, USA)
- Nosný plyn – Helium, 5.5 (Siad, Bergamo, Itálie)
- Analytické váhy – Mettler Toledo XSE205 (Mettler Toledo, Columbus, USA)
- Ultrazvuková lázeň – Elmasonic S40H (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Německo)
- Automatické mikropipety
- Vibrační kulový mlýnek – Pulverisette 23 (Fritsch, Idar-Oberstein, Německo)
- Laboratorní sklo, eppendorfký, silanizované vialky, plastové špičky, víčka, krimpovací kleště

3.2 Chemikálie

3.2.1 Derivatizační činidla

- Methylchlorformiát, p.a., Sigma – Aldrich, Praha, ČR

- Ethylchlorformiát, p.a., Sigma – Aldrich, Praha, ČR

3.2.2 Rozpouštědla

- Methanol, p.a., Penta, ČR
- Pyridin, p.a., Penta, ČR
- Chloroform, p.a., Penta, ČR

3.2.3 Standardy

- Ibuprofen, p.a., Sigma – Aldrich, Praha, ČR
- Theanin, p.a., Sigma – Aldrich, Praha, ČR
- Flufenamová kyselina, p.a., Sigma – Aldrich, Praha, ČR

3.2.4 Analyzované vzorky

Vzorky použité při analýze byly zakoupeny v maloobchodní síti.

- Šalvěj
- Cejlonský čaj
- Rooibos Natur Lord Nelson
- Pu-Erh
- Green tea Pickwick
- Máta
- Lapacho
- Vilcacora
- Nature's Promise bio zelený čaj

3.2.5 Ostatní chemikálie

- 0,2M hydroxid draselný v methanolu
- 1M roztok hydrogenuhličitanu sodného a uhličitanu sodného
- Destilovaná voda

3.3 Pracovní postup

3.3.1 Příprava vzorků

Všechny analyzované vzorky byly zpracovány následujícím způsobem. Vzorek čaje, popř. byliny byl pomocí vibračního kulového mlýnku rozemlet na jemný prášek. Do eppendorfky bylo naváženo 100 mg tohoto prášku, k němu bylo přidáno 200 μ l methanolu, 400 μ l destilované vody a 200 μ l vnitřního standardu – ibuprofenu v methanolu o koncentraci 1 mg/ml. Vzorek byl umístěn na 10 minut do ultrazvukové lázně, poté následovala centrifugace, která trvala 5 minut. Automatickou mikropipetou bylo odebráno 200 μ l vzorku do eppendorfky. K tomuto roztoku bylo přidáno 10 μ l 0,2M hydroxidu draselného v methanolu, 20 μ l methylchlorformiátu, 40 μ l pyridinu a 400 μ l 1M roztoku hydrogenuhličitanu sodného a uhličitanu sodného. Po pěti minutách následovala extrakce chloroformem o objemu 600 μ l. Poté byl vzorek v eppendorfce centrifugován, spodní chloroformová fáze byla odebrána do silanizovaných vialek a připravený vzorek byl analyzován GC-MS.

3.3.2 Příprava roztoku standardů

Ke 200 μ l roztoku theaninu v methanolu o koncentraci 1 mg/ml bylo přidáno 200 μ l roztoku vnitřního standardu ibuprofenu v methanolu o koncentraci 1 mg/ml a 400 μ l destilované vody. Tento roztok byl ponechán v ultrazvuku po dobu 10 minut, poté z něj bylo odebráno 200 μ l do nové eppendorfky. Dále k němu bylo přidáno 10 μ l 0,2M hydroxidu draselného v methanolu, 20 μ l methylchlorformiátu, 40 μ l pyridinu a 400 μ l 1M roztoku hydrogenuhličitanu sodného s uhličitanem sodným. Po zhruba pěti minutách byl roztok extrahován 600 μ l chloroformu. Následovala pěti minutová centrifugace, poté byla odebrána spodní fáze do silanizovaných vialek a vzorek byl připraven pro analýzu GC-MS.

3.4 Experimentální podmínky

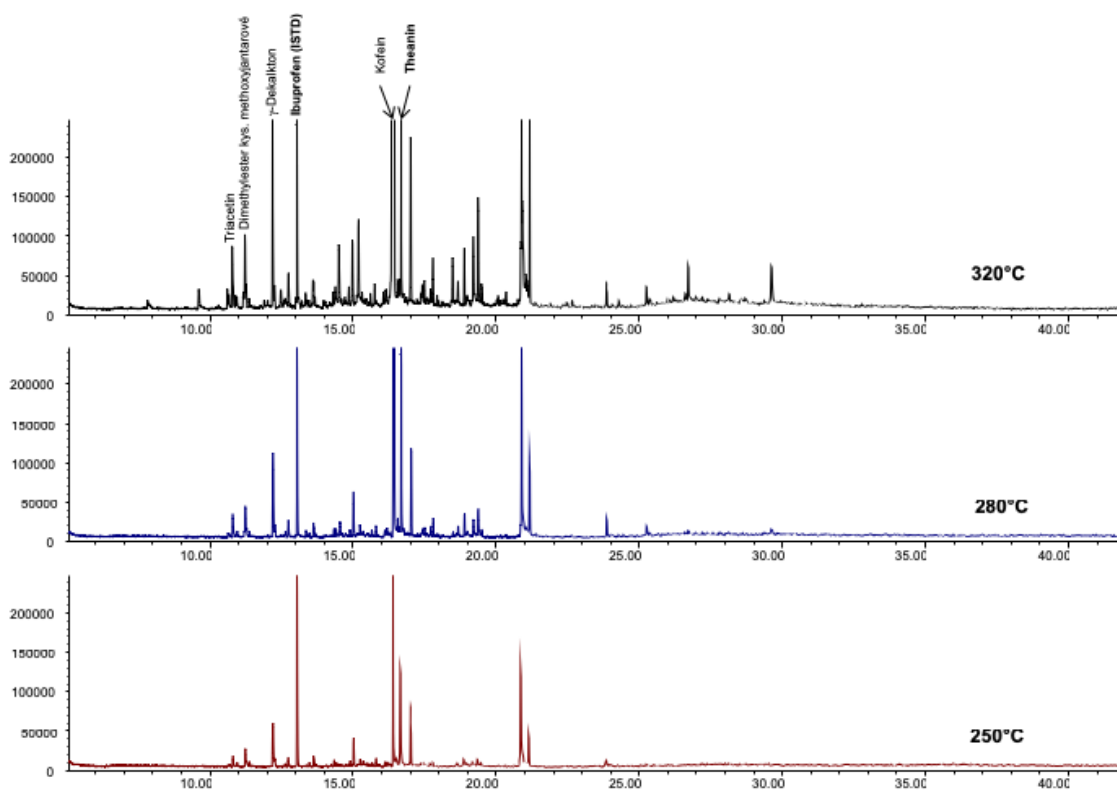
Analýzy byly provedeny na plynovém chromatogramu s hmotnostním spektrometrem. Do přístroje byl dávkován 1 μ l vzorku. Za vhodnou teplotu nástřiku byla zvolena teplota 280 °C. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokovou rychlostí 0,9 ml/min. Detekce probíhala při záznamu celkového iontového proudu (TIC) v rozsahu

29–520 m/z. Pro kvantitativní stanovení theaninu byl využit iontový chromatogram rekonstruovaný pro ion 112 m/z. Kvantifikace byla provedena metodou vnitřního standardu s využitím tabulkového procesoru Excel.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Teplota nástřiku

Pro analýzu extraktů čaje plynovou chromatografií byly testovány tři různé teploty nástřiku: 250, 280 a 320 °C. Za nejvyšší teploty nástřiku byly výtěžky největší, ale v důsledku velké degradace vznikalo mnoho produktů. Teplota 250 °C byla nedostačující, neboť nedocházelo ke kvantitativnímu odpaření analytu. Jako kompromis byla zvolena teplota 280 °C, při níž byl analyt převeden do plynné fáze v dostatečném výtěžku a nedocházelo k příliš velké degradaci. Obr. 11 zobrazuje chromatogramy reálného vzorku, který byl analyzován při výše uvedených teplotách nástřiku.



Obr. 11 Chromatogramy reálného vzorku při teplotách nástřiku 250, 280 a 320 °C

4.2 Derivatizační činidlo

Již dříve bylo zmíněno, že nezbytnou součástí zpracování reálných vzorků byl proces derivatizace. V rámci experimentální práce byly testovány reakce methylchlorformiátu a ethylchlorformiátu v prostředí methanolu, přičemž se předpokládal vznik příslušného methylderivátu (methylesteru N-(methoxykarbonyl) theaninu) respektive ethylderivátu (ethylesteru N-(ethoxykarbonyl) theaninu) podle použitého činidla, bez vlivu rozpouštědla.

Obr. 12, 15 a 18 ukazují, že reakce theaninu s methylchlorformiátem v přítomnosti methanolu vede skutečně ke tvorbě jednoho produktu, methylesteru N-(methoxykarbonyl) theaninu (246 m/z). Při reakci theaninu s ethylchlorformiátem v přítomnosti methanolu ovšem nedošlo ke tvorbě jednoho produktu, jak by se očekávalo, ale vznikly dva produkty, v jejichž hmotnostních spektrech byly pozorovány molekulární ionty 260 m/z a 274 m/z. Vzhledem k podmínkám vzniku obou derivátů, jejich hmotnostním spektrům a detegovaným molekulárním iontům lze předpokládat, že oba deriváty obsahují ethoxykarbonylovou skupinu vázanou na aminoskupině, ale hlavní produkt (260 m/z) je na karboxylové skupině esterifikován methylovou skupinou z methanolu, zatímco vedlejší produkt (274 m/z) má na karboxylové skupině navázán ethyl z použitého derivatizačního činidla. Methylester N-(ethoxykarbonyl) theaninu byl detegován jako převládající produkt. Pokud se reakce theaninu s ethylchlorformiátem provede v prostředí ethanolu, vzniká jako jediný produkt ethylester N-(ethoxykarbonyl) theaninu (274 m/z, Obr. 15).

Obr. 13 demonstruje reakce ibuprofenu s methylchlorformiátem a methanolem za vzniku očekávaného methylderivátu (220 m/z). Při reakci ibuprofenu s ethylchlorformiátem a methanolem došlo ke vzniku dvou produktů. U hlavního produktu (220 m/z) byl na karboxylové skupině navázán methyl z alkoholu, zatímco vedlejší produkt (234 m/z) obsahoval na karboxylové skupině ethyl z derivatizačního činidla. Reakce ibuprofenu s ethylchlorformiátem a ethanolom vedla ke tvorbě očekávaného ethylderivátu (234 m/z).

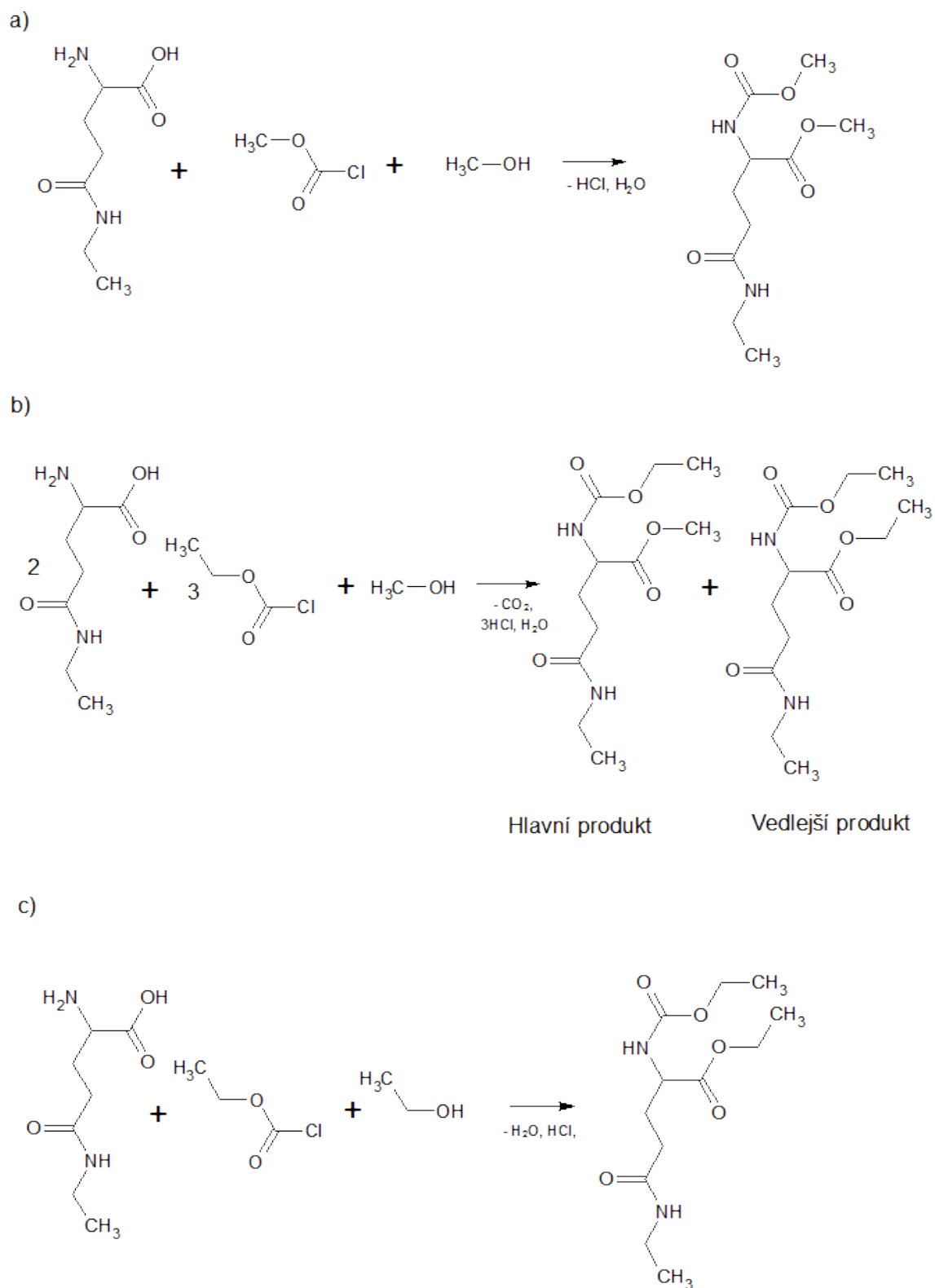
Reakce kyseliny flufenamové s uvedenými derivatizačními činidly a rozpouštědly vedly ke tvorbě mnoha produktů (Obr. 14). Tato kyselina obsahuje kromě karboxylové skupiny ještě aminoskupinu, která se také může účastnit substitučních reakcí, ale vlivem sterického bránění a mezomerní stabilizace neprobíhá substituce na aminoskupině kvantitativně jako v případě theaninu. Reakcí kyseliny flufenamové s methylchlorformiátem a methanolem došlo k navázání methylu na karboxylovou skupinu a vznikl produkt s molekulárním iontem 295 m/z, eventuálně mohlo dojít i ke tvorbě methoxyderivátu na aminoskupině za vzniku produktu s 353 m/z. Reakce karboxylové skupiny kyseliny

flufenamové s ethylchlorformiátem a methanolem poskytla dva produkty, hlavní produkt (295 m/z) měl methyl z alkoholu navázán na karboxylové skupině, zatímco vedlejší produkt (309 m/z) obsahoval na karboxylové skupině ethyl pocházející z derivatizačního činidla. Pokud se reakce účastní i aminoskupina, dojde k navázání ethylesteru (367 m/z) na aminoskupinu hlavního produktu. Produktem reakce kyseliny flufenamové s ethylchlorformiátem a ethanolem při reakci pouze karboxylové skupiny, byl ethylester (309 m/z). Reakce aminoskupiny umožnila tvorbu dalšího produktu, kdy došlo k navázání ethylesteru z derivatizačního činidla (381 m/z) na aminoskupinu. Původ produktu s retenčním časem 18 min a předpokládaným molekulárním iontem 353 m/z při reakci s ethylchlorformiátem zatím nebyl uspokojivě vysvětlen a je předmětem dalšího výzkumu.

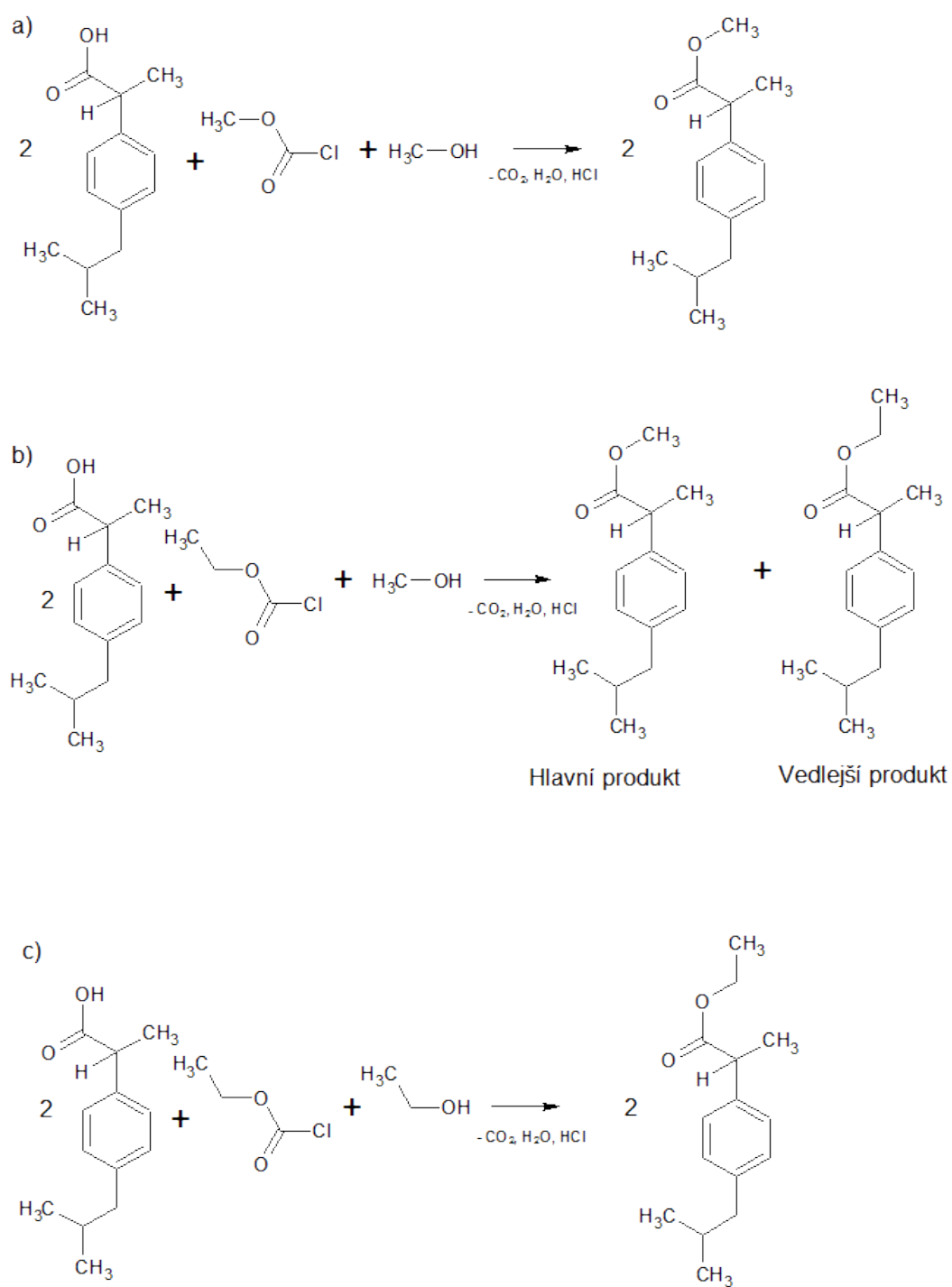
Těmito experimenty jsme zjistili, že volba přítomného alkoholu hraje velkou roli při tvorbě produktů. Reakce všech tří standardů s ethylchlorformiátem a methanolem vedla ke tvorbě hlavního a vedlejšího produktu. Ve všech případech byl na karboxylové skupině u hlavního produktu navázán methyl z alkoholu, zatímco u vedlejšího produktu došlo k navázání ethylu z ethylchlorformiátu na karboxylovou skupinu. Toto zjištění je důležitým výsledkem bakalářské práce, z něhož vyplývá, že pro praktické využití alkylchlorformiátů pro derivatizaci (v našem případě theaninu, kyseliny flufenamové a ibuprofenu) je vhodné používat jako rozpouštědlo alkohol, jehož uhlovodíkový řetězec odpovídá řetězci použitého činidla.

4.3 Vnitřní standard

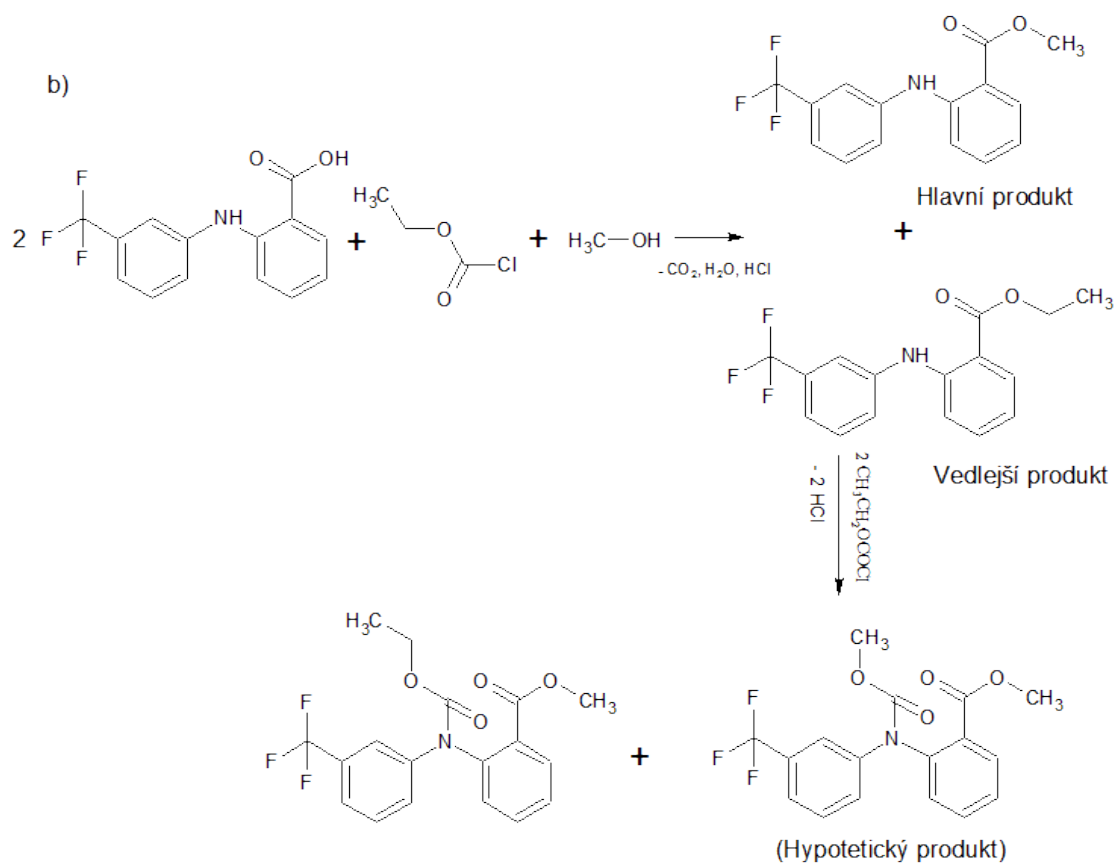
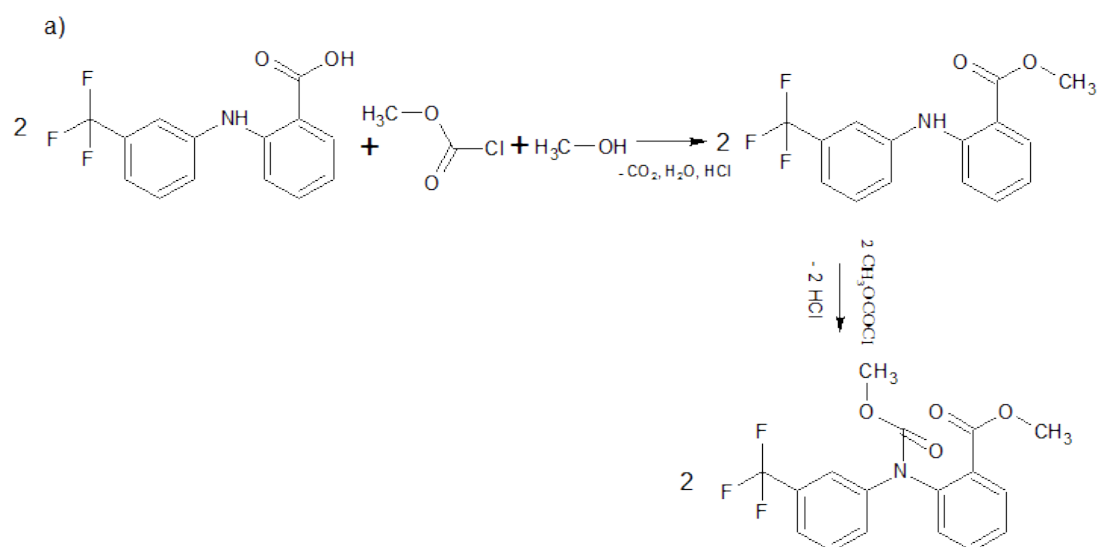
Použitým vnitřním standardem byl ibuprofen, nicméně byly provedeny i reakce s kyselinou flufenamovou. Ta pro tento postup byla nevyhovující, neboť tvořila mnoho různých produktů v důsledku možné reaktivity aminoskupiny (Obr. 14).

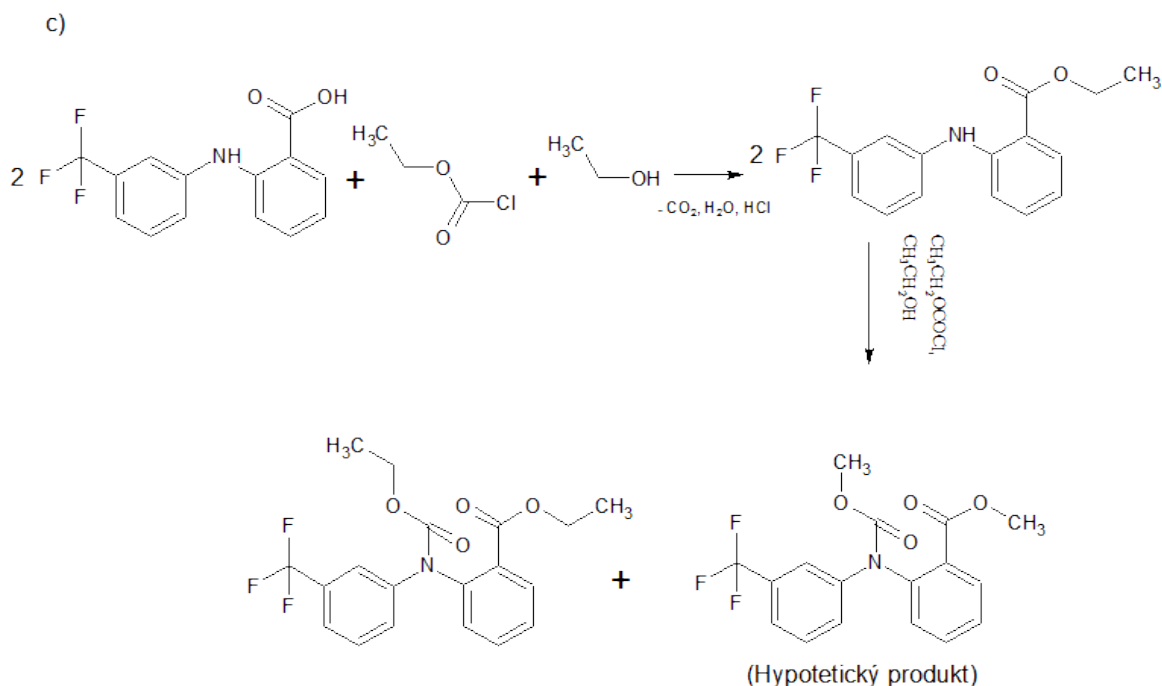


Obr. 12 Reakce theaninu s a) methylchlorformiátem, b) ethylchlorformiátem v přítomnosti methanolu, c) ethylchlorformiátem a ethanolem

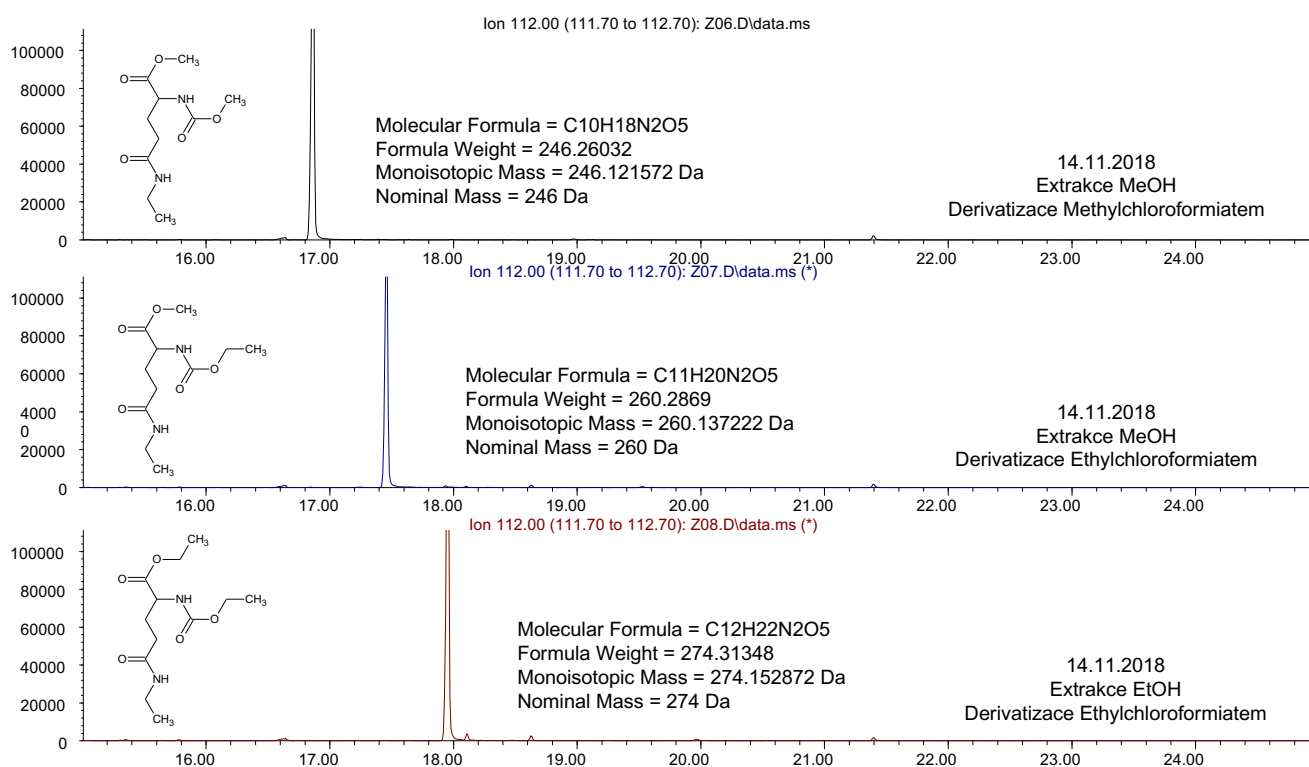


Obr. 13 Reakce ibuprofenu s a) methylchlorformiátem, b) ethylchlorformiátem v přítomnosti methanolu, c) ethylchlorformiátem a ethanolem



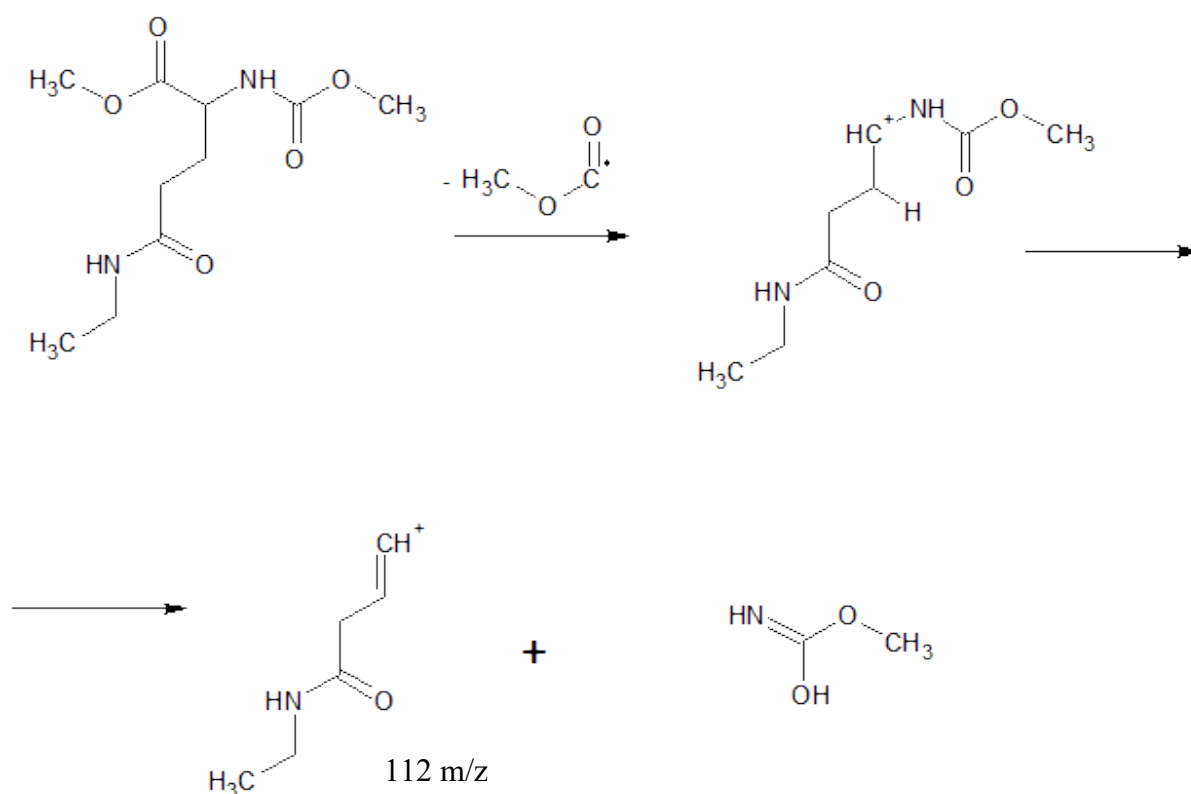


Obr. 14 Reakce kyseliny flufenamové s a) methylchlorformiátem, b) ethylchlorformiátem v přítomnosti methanolu, c) ethylchlorformiátem a ethanolu

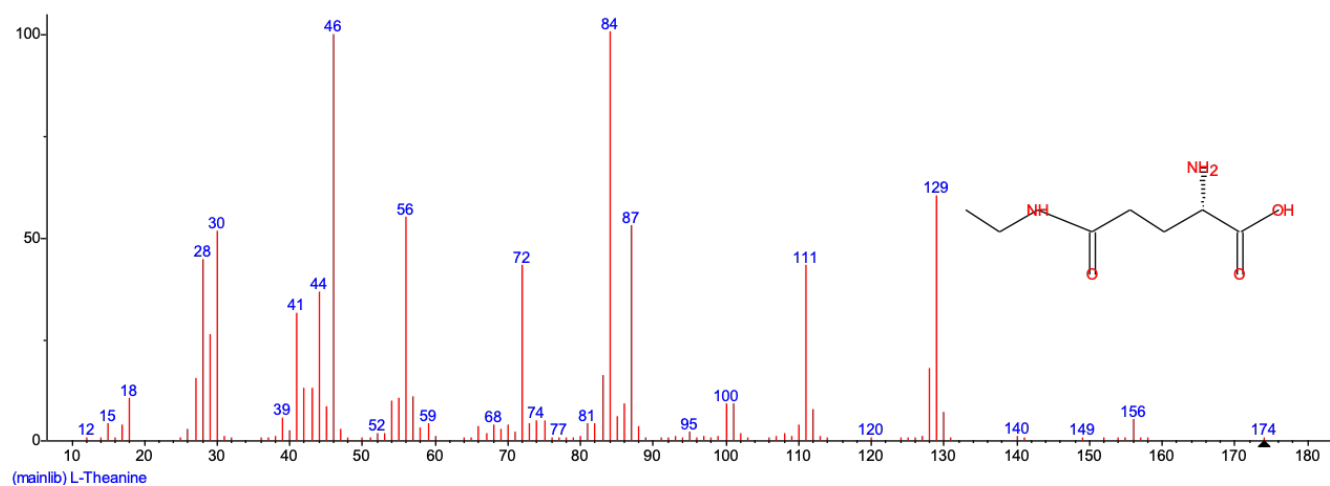


Obr. 15 Chromatogram iontu 112 m/z (theanin v černém čaji) za použití uvedených derivatizačních činidel a rozpouštědel

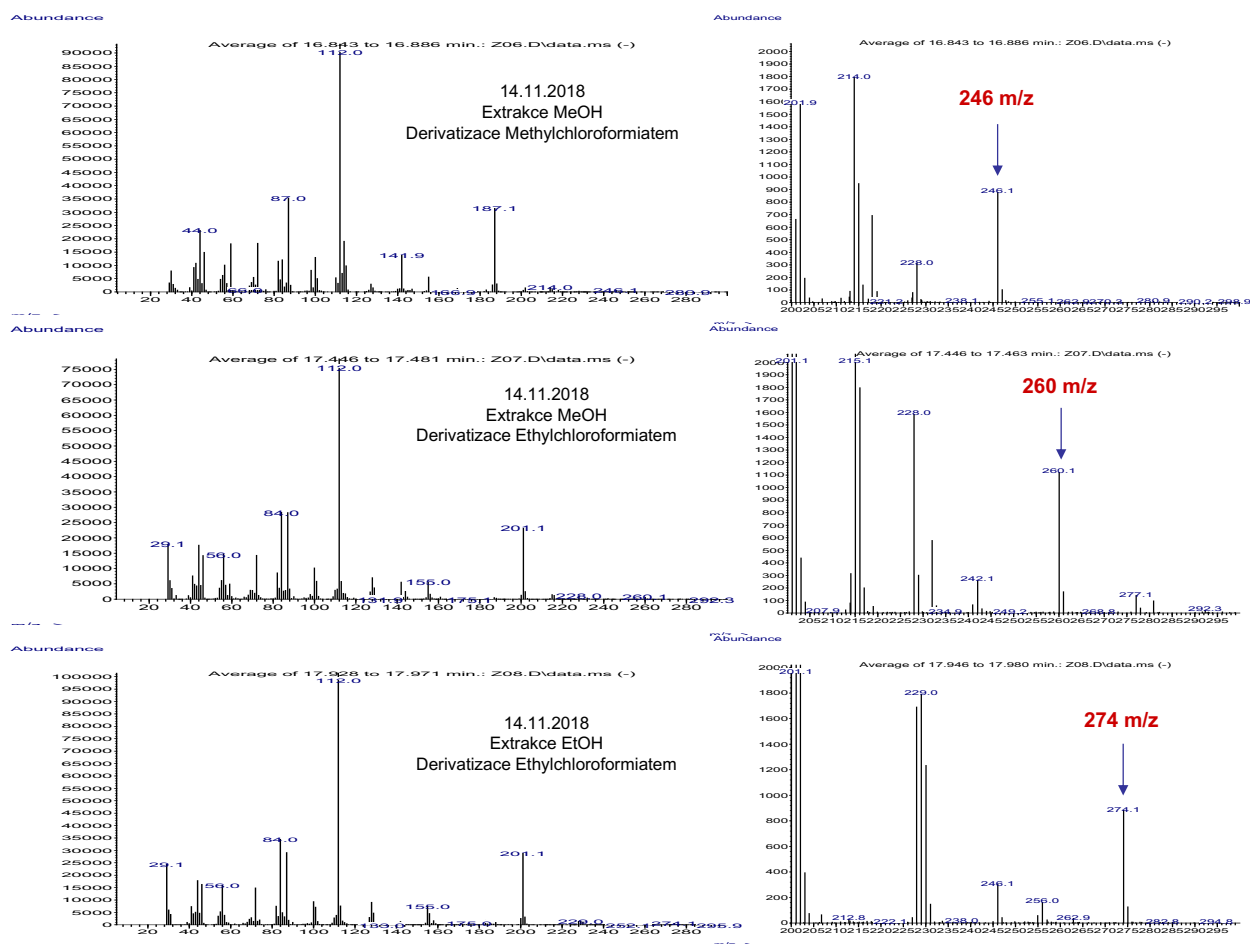
Obr. 15 ukazuje, že všechny vzniklé deriváty theaninu dávají společný dominantní ion 112 m/z. Z toho vyplývá, že substituenty nemají vliv na hodnotu m/z dominantního iontu a musí se tedy při fragmentaci odštěpit. Možný mechanismus takové fragmentace by mohl vycházet z odštěpení esterifikované karboxylové skupiny a následně z McLaffertyho přesmyku. Celý mechanismus reakce je naznačen na Obr. 16. Tímto mechanismem vznikne z alkylesterů a alkylesterů alkoxykarbonyl derivátů theaninu fragmentový ion s hodnotou 112 m/z. Na Obr. 17 je hmotnostní spektrum samotného theaninu, ve kterém se ion s hodnotou 112 m/z nevyskytuje, což je v souladu s výše nevrženým mechanismem.



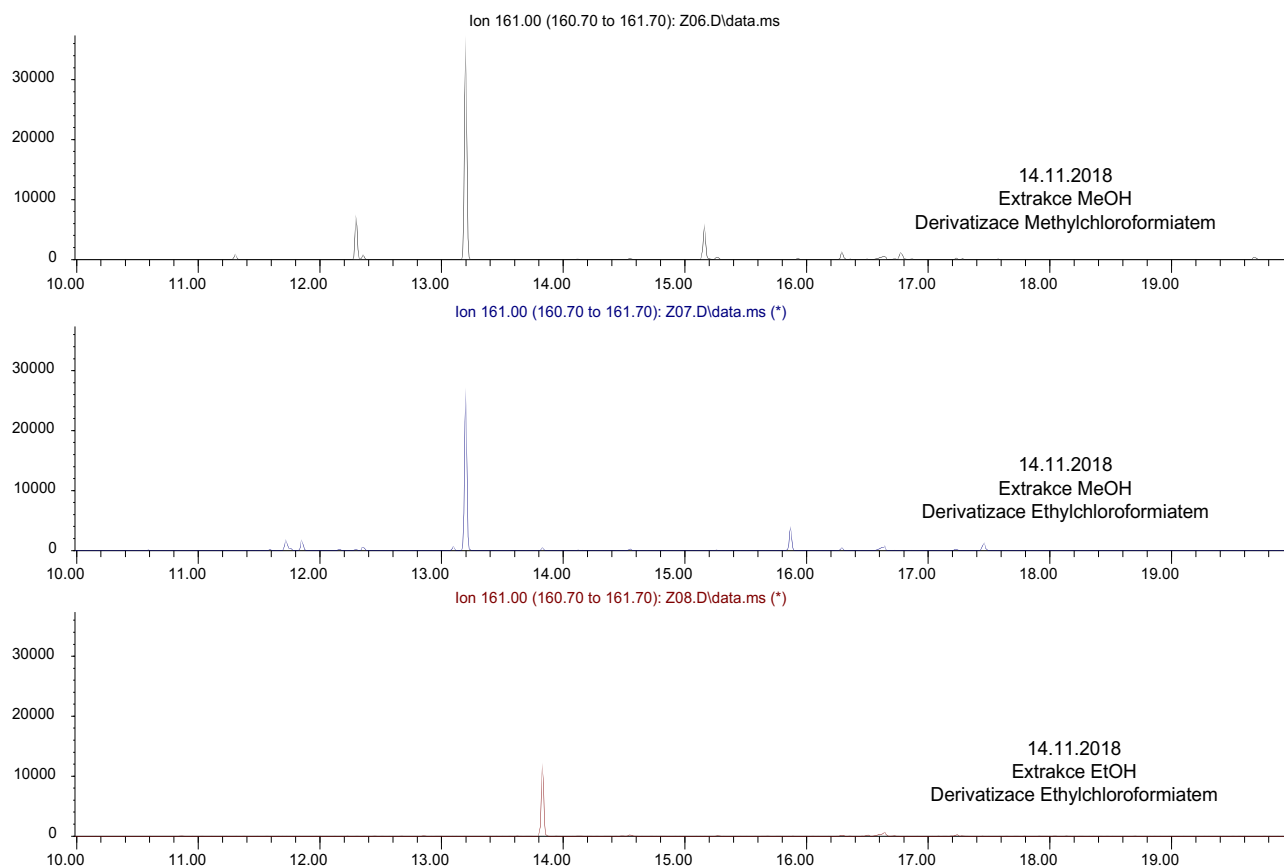
Obr. 16 Mechanismus fragmentace methylesteru N-(methoxykarbonyl) theaninu



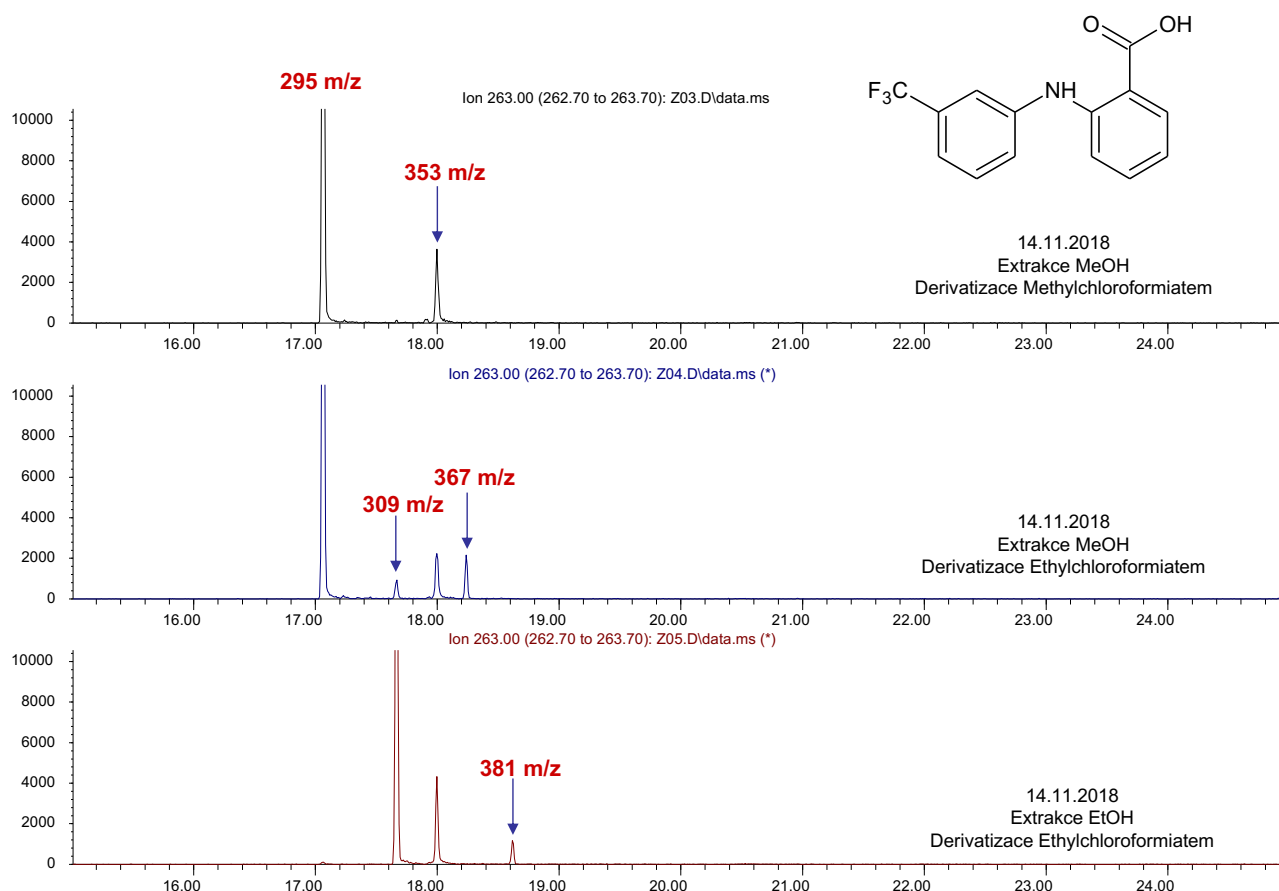
Obr. 17 Hmotnostní spektrum samotného theaninu



Obr. 18 Hmotnostní spektra theaninu při použití zmíněných rozpouštědel a derivatizačních činidel



Obr. 19 Chromatogram iontu 161 m/z (ibuprofen v černém čaji) za použití uvedených derivatizačních činidel a rozpouštědel



Obr. 20 Chromatogram kyseliny flufenamové (263 m/z) při použití uvedených derivatizačních činidel a rozpouštědel

4.4 Vyhodnocení

Kvantitativní vyhodnocení v plynové chromatografii se provádí pomocí plochy píku, která vyjadřuje množství analytu ve vzorku. Pro správné a přesné stanovení množství analytu ve vzorku je nezbytné určit plochu píku co nejpřesněji. Při vyhodnocení výsledků se nabízelo několik metod. Nejběžnějšími analytickými metodami kvantitativní analýzy jsou metoda vnitřního standardu, vnějšího standardu a standardního přídatku.

Metoda standardního přídatku je založena na provedení dvou analýz. První je analýza samotného vzorku a poté se analyzuje vzorek, ke kterému bylo přidáno známé množství stejné látky, kterou stanovujeme. Tato metoda je velmi spolehlivá, neboť standard přidáváme přímo ke vzorku, a tudíž analyt i standard reagují za totožných podmínek.

Výhodou metody vnitřního standardu je provedení pouze jedné analýzy. Ke vzorku přidáváme známé množství vnitřního standardu o dané koncentraci. Je vhodné přidat vnitřní standard na začátku pracovního postupu, aby analyt i vnitřní standard měly při zpracování vzorků stejné podmínky. Nevýhodou je nutnost volby vhodného vnitřního standardu, který musí splňovat určité požadavky. Vnitřní standard je látka, která není obsažena ve vzorku, nesmí reagovat se složkami vzorku, musí se eluovat v blízkosti stanovované složky a má podobnou strukturu jako analyt. Tato metoda vyžaduje výpočet odezvového faktoru, který je roven podílu plochy píku vnitřního standardu a plochy píku stanovované látky v roztoku standardů o stejné koncentraci.

Metoda vnějšího standardu je jednou z nejjednodušších metod kvantitativní analýzy. Mohou se provést pouze dva nástríky, a to nástrík samotného vzorku a roztoku standardu o známé koncentraci. Vyhodnocení množství analytu ve vzorku se provádí pomocí jednoduché trojčlenky. Další možností je změření více kalibračních roztoků standardu o známé koncentraci a vytvoření kalibrační křivky. Množství analytu je poté získáno pomocí rovnice kalibrační křivky. Tato metoda není vhodná pro vzorky, kde hraje roli matrice vzorku, protože standard nepřidáváme ke vzorku a nereaguje za identických podmínek jako analyt. Další nevýhodou metody je, že při extrakci vzorku (čajových lístků) methanolem nevíme kolik analytu přešlo do alkoholu.

Pro stanovení množství theaninu v reálných vzorcích byly vybrány dvě metody, metoda vnějšího a vnitřního standardu. Plochy píků theaninu a ibuprofenu v naměřených chromatogramech byly zintegrovány a hodnoty byly zpracovány v tabulkovém procesoru Microsoft Excel.

Koncentrace theaninu metodou vnějšího standardu byla vypočítána podle vzorce:

$$c(i) = \frac{A(i) \cdot c(s)}{A(s)}$$

kde $c(i)$ je stanovovaná koncentrace theaninu ve vzorku, $A(i)$ je plocha signálu theaninu ve vzorku, $A(s)$ je plocha standardu získaná proměřením standardu o známé koncentraci $c(s)$.

U metody vnitřního standardu bylo potřeba zjistit odezvový faktor. Ten byl vypočítán jako poměr ploch píků theaninu a ibuprofenu v připravených roztocích standardů. Množství theaninu ve vzorku touto metodou bylo vypočítáno podle rovnice:

$$c(i) = \frac{A(i)}{A(is)} \cdot c(is) \cdot f$$

kde $c(i)$ je stanovovaná koncentrace theaninu, $A(i)$ je plocha signálu theaninu, $A(is)$ je plocha signálu vnitřního standardu, $c(is)$ je známá koncentrace vnitřního standardu a f je odezvový faktor.

Odezvový faktor byl vypočítán podle vzorce:

$$f = \frac{A(is)}{A(s)}$$

kde $A(is)$ je plocha pík vnitřního standardu a $A(s)$ vyjadřuje plochu píku theaninu v roztoku standardů.

Tab. I: Hodnoty ploch pík standardů, odezvého faktoru a směrodatné odchylky

Plocha theaninu	Plocha ibuprofenu	Poměr ploch ibuprofenu a theaninu	Odezvový faktor	Směrodatná odchylka
1 037 732	2 791 668	2,690	2,523	0,150
736 258	1 922 779	2,612		
888 433	2 232 073	2,512		
694 637	1 921 900	2,767		
487 707	1 223 570	2,509		
501 515	1 343 024	2,678		
829 933	1 936 633	2,334		
848 277	1 830 888	2,158		
581 387	1 420 235	2,443		

Tab. II: Název vzorku, hodnoty koncentrací theaninu vypočtené metodou vnějšího a vnitřního standardu a směrodatné odchylky

Název	Metoda vnějšího standardu		Metoda vnitřního standardu	
	Koncentrace [mg/g]	Směrodatná odchylka [mg/g]	Koncentrace [mg/g]	Směrodatná odchylka [mg/g]
Zen Chai Teekanne	0,495	0,0267	1,767	0,077
Matcha	0,875	0,1122	2,356	0,214
Šalvěj	ND	ND	ND	ND
Cejlon	0,441	0,097	1,295	0,271
Rooibos Natur Lord Nelson	ND	ND	ND	ND
Pu-Erh	0,776	0,147	1,010	0,305
Green Tea Pickwick	1,051	0,122	1,540	0,094
Máta	0,005	0,004	0,005	0,004
Lapacho	ND	ND	ND	ND
Vilcacora	ND	ND	ND	ND
Nature's promise bio zelený čaj	0,978	0,080	1,832	0,244
Assam	1,065	0,078	1,777	0,173
Opuncia Teekanne	1,132	0,042	1,094	0,080

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo navrhnout postup vhodný ke stanovení aminokyseliny theaninu v různých vzorcích čajů a bylin pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Jelikož jsou aminokyseliny látky obtížně stanovitelné plynovou chromatografií, musely být převedeny na těkavější deriváty pomocí derivatizace. Experimenty provedené se standardy, methylchlorformiátem/ethylchlorformiátem a methanolem/ethanolem vedly k důležitému závěru, že se alkohol také účastní derivatizační reakce. Proto je vhodné zvolit derivatizační činidlo a alkohol tak, aby uhlovodíkový řetězec použitého alkoholu odpovídal délce řetězce derivatizačního činidla.

Z analyzovaných vzorků obsahovala Matcha, Assam a Opuncia Teekanne nejvíce theaninu, zatímco šalvěj, lapacho, vilcacora a rooibos tuto aminokyselinu vůbec neobsahovaly. V mátě byl překvapivě theanin obsažen, ale pouze v malém množství.

6 LITERATURA

- [1] K. Chow, I. Kramerová, Všechny čaje Číny, DharmaGaia, Praha 2002.
- [2] V. von Wachendorfová, Čaj, Slovart, Praha 2007.
- [3] J. H. Kocman, Čajové minimum, Sursum, Tišnov 2000.
- [4] S., Z. a M. Thomovi, Příběh čaje, Argo, Praha 2002.
- [5] M.M.M. Bindes, V.L. Cardoso, M.H.M. Reis, D.C. Boffito, Maximisation of the polyphenols extraction yield from green tea leaves and sequential clarification, J. Food Eng. 241 (2019) 97-104.
- [6] A. Mutuku, J. Wanyoko, F. Wachira, S. Kamunya, R. Chalo, S. Kimutai, K. Moseti, S. Karori, Influence of Geographical Regions on Catechin and Caffeine Levels in Tea (*Camellia sinensis*), American Journal of Plant Science (2016) 562-571.
- [7] <http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=print&sid=853>, staženo dne 8.10. 2018.
- [8] L.E. Wise, I.D. Premaratne, T.F. Gamage, A.H. Lichtman, L.D. Hughes, L.S. Harris, M.D. Aceto, L-theanine attenuates abstinence signs in morphine-dependent rhesus monkeys and elicits anxiolytic-like activity in mice. Pharmacology, Biochemistry and Behaviour 103 (2012) 245-252.
- [9] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Theanine#section=Therapeutic-Uses>, staženo dne 23. 11. 2018.
- [10] V. Dolby, O zeleném čaji, Pragma, Praha 2002.
- [11] P. Kalač, Organická chemie přírodních látek a kontaminantů, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta, 2001.
- [12] M. Malacarne, G. Antonioli, D. Bertoldi, T. Nardin, R. Larcher, Botanical origin characterisation of tannins using infrared spectroscopy, Food Chem. 267 (2018) 204-209.
- [13] R.A. Frazier, E.R. Deaville, R.J. Green, E. Stringano, I. Willoughby, J. Plant, I. Mueller-Harvey, Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins, J. Pharmaceut Biomed 51 (2010) 490-495.
- [14] <https://www.britannica.com/science/tannin>, staženo 15. 12. 2018.
- [15] M.E. Harbowy, D.A. Balentine, Tea Chemistry, Critical Reviews Plant Science, 16(5) (1997) 415-480.
- [16] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/theobromine#section=Top>, staženo 8. 1. 2019.
- [17] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2153#section=Top>, staženo 5. 1. 2019

- [18] Y. Zhu, Y. Luo, P. Wang, M. Zhao, L. Li, X. Hu, F. Chen, Simultaneous determination of free amino acids in Pu-erh tea and their changes during fermentation, *Food Chem.* 194 (2016) 643-649.
- [19] M.M. Hsieh, S.M. Chen, Determination of amino acids in tea leaves and beverages using capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence detection, *Talanta* 73 (2007) 326-331.
- [20] T. Šlechtová, K. Kalíková, E. Tesařová, Stanovení enantiomerů theaninu pomocí HPLC, porovnání metod detekce, *Chem. Listy* 107 (2013) 228-232.
- [21] I. Machálková, Srovnání metod stanovení veškerých polyfenolů, diplomová práce, Mendelova univerzita, Lednice 2010.
- [22] R. Adhikary, V. Mandal, L-theanine: A potential multifaceted natural bioactive amide as health supplement, *Asian Pac J Trop Biomed* 7(9) 42(2017) 842-848.
- [23] E. Mancini, Ch. Begliner, J. Drewe, D. Zanchi, U.E. Lang, S. Borgwardt, Green tea effects on cognition, mood and human brain function: A systematic review, *Phytomedicine* 34 (2017) 26-37.
- [24] E. Sharma, R. Joshi, A. Gulati, L-Theanine: An astounding sui generis integrant in tea, *Food Chem.* 242 (2018) 601-610.
- [25] H. Horie, T. Mukai, K. Kohata, Simultaneous determination of qualitatively important components in green tea infusions using capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 758 (1997) 332-335.
- [26] R. Horanni, U.H. Engelhardt, Determination of amino acids in white, green, black, oolong, pu-erh teas and tea products, *J. Food Compos. A*. 31 (2013) 94-100.
- [27] S. Cheng, X. Fu, Y. Liao, X. Xu, L. Zeng, J. Tang, J. Li, J. Lai, Z. Yang, Differential accumulation of specialized metabolite L-theanine in green and albino-induced yellow tea (*Camellia sinensis*) leaves, *Food Chem.* 276 (2019) 93-100.
- [28] Y. Sakamoto, K. Nakagawa, S. Kawana, N. Lingga, H. L. Lai Chin, H. Miyagawa, Profiling of Japanese Green Tea Metabolites by GC-MS, GC/MS Technical Report No. 1 (2010).
- [29] Ch.N. Chen, Ch.M. Liang, J.R. Lai, Y.J. Tsai, J.S. Tsay, J.K. Lin, Capillary Electrophoretic Determination of Theanine, Caffeine, and Catechins in Fresh Tea Leaves and Oolong Tea and Their Effects on Rat Neurosphere Adhesion and Migration, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2013) 7495-7503.
- [30] E. Smolková, L. Feltl, V. Pacáková, Plynová chromatografie III., Kvalitativní a kvantitativní analýza, Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1979.

- [31] P. Nováková, Derivatizace v plynové chromatografii, diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2011.
- [32] T. Amini, P. Hashemi, Preconcentration and GC-MS determination of caffeine in tea and coffee using homogeneous liquid-liquid microextraction based on solvents volume ratio alternation, *J. Chromatogr. B* 1 092 (2018) 252-257.
- [33] D.N. Badea, C. Levai, Separation and Detection of Caffeine, Theophylline and Theobromine from Coffee Varieties, Carbonated Soft Drinks and Alcoholic Beverages, *Rev.Chim-Bucharest* 68 No. 11 (2017) 2704-2707.
- [34] Ch.T. Ho, J.K. Lin, F. Shahidi, Tea and Tea Products Chemistry and Health-Promoting Properties, CRC Press Taylor & Francis Group, 2008.
- [35] T. Tachiki, H. Suzuki, S. Wakisaka, T. Yano, Production of gamma-glutamylmethanamide and gamma-glutamylethylamide by coupling of baker's yeast preparations and bacterial glutamine synthetase, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 32 (1986) 545-48.
- [36] P. D. Collier, R. Malloes, The estimation of flavanols in tea by gas chromatography of their trimethylsilyl derivatives, *J. Chromatogr. A* 57, (1971), 29-45.
- [37] L. Du, J. Li, W. Li, Y. Li, T. Li, D. Xiao, Characterization of volatile compounds of pu-erh tea using solid-phase microextraction and simultaneous distillation-extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry, *Food Res. Int.* 57 (2014) 61-70.
- [38] J. Velíšek, *Chemie potravin 2*, OSSIS, Tábor 2002.