

# Stanovení fotosyntetických barviv v čaji matcha Ramanovou spektroskopií

Bc. Jiří Seget

---

Diplomová práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Jiří Seget  
Osobní číslo: T22618  
Studijní program: N0721A210004 Technologie potravin  
Forma studia: Kombinovaná  
Téma práce: Stanovení fotosyntetických barviv v čaji matcha Ramanovou spektroskopií

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část

Fotosyntetické pigmenty v zeleném čaji.

Metody vhodné pro stanovení listových barviv.

Použití Ramanovy spektroskopie pro stanovení listových barviv.

### II. Praktická část

Stanovení obsahu listových barviv ve vzorcích matcha čajů Ramanovou spektroskopií.

Stanovení obsahu listových barviv jinou laboratorní metodou.

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

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] LIN, Xiaohui a Da-Wen SUN. Recent developments in vibrational spectroscopic techniques for tea quality and safety analyses. *Trends in Food Science & Technology*. 2020, 104, 163-176. doi:10.1016/j.tifs.2020.06.009
- [2] GUPTA, Shilpi, Chung Hao HUANG, Gajendra Pratap SINGH, Bong Soo PARK, Nam-Hai CHUA a Rajeew J. RAM. Portable Raman leaf-clip sensor for rapid detection of plant stress. *Scientific Reports*. 2020, 10(1) ISSN 2045-2322. doi:10.1038/s41598-020-76485-5
- [3] QU, Fang, Nan GONG, Shenghan WANG, Yue GAO, Chenglin SUN, Wenhui FANG a Zhiwei MEN. Effect of pH on fluorescence and absorption of aggregates of chlorophyll a and carotenoids. *Dyes and Pigments*. 2020, 173. ISSN 01437208. doi:10.1016/j.dyepig.2019.107975

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Martina Bučková, Ph.D.**  
Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání diplomové práce: **1. ledna 2024**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

---

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

---

**Ing. Robert Gál, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 10. února 2024

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užit své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zaměřuje na aplikaci Ramanovy spektroskopie k identifikaci a kvantifikaci fotosyntetických pigmentů v čaji Matcha. Ramanova spektroskopie nabízí výhodu rychlé nedestruktivní analýzy, která umožňuje identifikaci molekul na základě jejich charakteristických vibrací. V této studii byla provedena analýza vzorků čaje Matcha pomocí Ramanovy spektroskopie, UV/VIS spektroskopie a metody HPLC za účelem stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů. Z důvodu silné luminiscence chlorofylu došlo k překrytí Ramanova signálu a pořízení spekter Matcha prášku tak nebylo možné. Byla naměřena spektra samostatných karotenoidů a pro  $\beta$ -karoten, astaxanthin a zeaxanthin byly ve spektru vyhodnoceny vybrané píky pro kvantitativní analýzu.

**Klíčová slova:** čaj matcha, chlorofyly, karotenoidy, Ramanova spektroskopie, UV/VIS spektroskopie, HPLC

## **ABSTRACT**

This diploma thesis focuses on the application of Raman spectroscopy for the identification and quantification of photosynthetic pigments in Matcha tea. Raman spectroscopy offers the advantage of rapid non-destructive analysis, which allows for the identification of molecules based on their characteristic vibrations. In this study, Matcha tea samples were analyzed using Raman spectroscopy, UV/VIS spectroscopy, and the HPLC method to determine the content of chlorophylls and carotenoids. Due to the strong luminescence of chlorophyll, the Raman signal was overlaid, and capturing spectra of the sample was not possible. Spectra of individual carotenoids were measured, and selected peaks in the spectrum were evaluated for quantitative analysis for  $\beta$ -carotene, astaxanthin, and zeaxanthin.

**Keywords:** Matcha tea, chlorophylls, carotenoids, Raman spectroscopy, UV/VIS spectroscopy, HPLC

Rád bych poděkoval vedoucí mé diplomové práce Mgr. Martině Bučkové, Ph.D. za odborné rady, cenné informace, připomínky a velkou trpělivost při zpracování této práce. Dále bych poděkoval Ing. Lence Fojtíkové za pomoc při měření na HPLC. Dále bych rád poděkoval Ing. Michaele Mikuličové, Ph.D. za pomoc při měření Ramanových spekter a v neposlední řadě bych poděkoval paní Renatě Zelinové za pomoc při práci v laboratoři.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně a že veškeré materiály, které jsem při vypracování práce využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Dále prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ÚVOD</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>1 PĚSTOVÁNÍ A PŘÍPRAVA MATCHA ČAJE</b> .....   | <b>11</b> |
| 1.2 MATCHA VE 21. STOLETÍ .....   | 11        |
| <b>2 TECHNOLOGIE ZÍSKÁVÁNÍ ČAJE MATCHA</b> .....  | <b>12</b> |
| 2.1 PROCES SKLIZNĚ ČAJE MATCHA.....   | 13        |
| <b>3 SLOŽENÍ ČAJE MATCHA</b> .....  | <b>14</b> |
| 3.1 FOTOSYNTETICKÁ BARVIVA .....  | 14        |
| 3.1.1 Chlorofyl .....   | 14        |
| 3.1.2 Karotenoidy .....   | 15        |
| 3.1.3 Ovlivnění množství fotosyntetických barviv v lístcích čajovníku.....              | 18        |
| 3.1.4 Stabilita fotosyntetických barviv v připraveném nápoji .....                      | 19        |
| 3.2 ZDRAVOTNÍ ÚČINKY ČAJE MATCHA NA LIDSKÝ ORGANISMUS .....                             | 20        |
| 3.2.1 Obsah katechinů .....   | 20        |
| 3.2.2 Obsah kofeinu .....   | 20        |
| 3.2.3 Obsah fenolových kyselin .....  | 21        |
| 3.2.4 Obsah vitamínu C.....   | 21        |
| 3.2.5 Obsah chlorofylu .....  | 21        |
| 3.2.6 Obsah theaninu .....  | 21        |
| 3.2.7 Zdravotní účinky karotenoidů .....  | 22        |
| <b>4 METODY POUŽÍVANÉ PRO STANOVENÍ BARVIV</b> .....                                    | <b>24</b> |
| 4.1 STANOVENÍ FOTOSYNTETICKÝCH PIGMENTŮ POMOCÍ UV/VIS<br>SPEKTROSKOPIE.....             | 24        |
| 4.2 STANOVENÍ FOTOSYNTETICKÝCH PIGMENTŮ POMOCÍ HPLC.....                                | 25        |
| <b>5 POUŽITÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE PRO STANOVENÍ<br/>FOTOSYNTETICKÝCH BARVIV</b> ..... | <b>27</b> |
| 5.1 VYUŽITÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE PRO STANOVENÍ FOTOSYNTETICKÝCH<br>PIGMENTŮ.....      | 28        |
| 5.2 VYUŽITÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE PRO STANOVENÍ KAROTENOIDŮ .....                      | 29        |
| 5.3 VÝHODY A NEVÝHODY RAMANOVY SPEKTROSKOPIE.....                                       | 31        |
| <b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....  | <b>32</b> |
| <b>6 CÍL PRÁCE</b> .....  | <b>33</b> |
| <b>7 MATERIÁL A METODY</b> .....  | <b>34</b> |
| 7.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE .....  | 34        |
| 7.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....   | 34        |
| 7.4 STANOVENÍ OBSAHU POPELA VE VZORCÍCH MATCHA ČAJŮ.....                                | 36        |
| 7.5 STANOVENÍ OBSAHU SUŠINY VE VZORCÍCH MATCHA ČAJŮ .....                               | 36        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 7.6      | MĚŘENÍ SPEKTER METODOU RAMANOVY SPEKTROSKOPIE .....                                      | 37        |
| 7.7      | STANOVENÍ CHLOROFYLŮ A KAROTENOIDŮ POMOCÍ METODY UV/VIS<br>SPEKTROSKOPIE .....           | 39        |
| 7.8      | STANOVENÍ OBSAHU KAROTENOIDŮ V MATCHA ČAJÍCH METODOU HPLC .....                          | 40        |
| <b>8</b> | <b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>  | <b>42</b> |
| 8.1      | VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU POPELA A SUŠINY VE VZORCÍCH MATCHA<br>ČAJŮ .....               | 42        |
| 8.2      | VÝSLEDKY STANOVENÍ FOTOSYNTETICKÝCH BARVIV POMOCÍ METODY<br>RAMANOVY SPEKTROSKOPIE ..... | 43        |
| 8.2.1    | Měření práškových vzorků matcha čaje .....   | 43        |
| 8.2.2    | Měření Ramanových spekter standardů karotenoidů .....                                    | 43        |
| 8.2.1    | Měření Ramanových spekter vybraných standardů .....                                      | 45        |
| 8.3      | VÝSLEDKY STANOVENÍ CHLOROFYLŮ SPEKTROFOTOMETRICKY .....                                  | 51        |
| 8.4      | VÝSLEDKY STANOVENÍ KAROTENOIDŮ POMOCÍ METODY HPLC .....                                  | 52        |
| <b>9</b> | <b>ZÁVĚR .....</b>   | <b>54</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>   | <b>56</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>  | <b>63</b> |
|          | <b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>  | <b>64</b> |
|          | <b>SEZNAM TABULEK .....</b>  | <b>65</b> |
|          | <b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>   | <b>66</b> |



## ÚVOD

Fotosyntetická barviva hrají zásadní roli v životních procesech rostlin a jsou zásadní pro specifické vlastnosti matcha čaje, oblíbeného práškového zeleného čaje z Japonska. Tyto látky nejenže ovlivňují jeho charakteristickou barvu, chuť a vůni, ale také přispívají k zdravotním přínosům jeho konzumace. Matcha je známá pro svou intenzivní zelenou barvu, která je důsledkem vysokého obsahu chlorofylu a dalších bioaktivních látek.

Tradiční metody hodnocení kvality matcha čaje obvykle zahrnují kombinaci senzorického hodnocení a chemické analýzy. Tyto metody mohou být však časově náročné a obvykle vyžadují přípravu vzorků před vlastním stanovením. To představuje výzvu pro výrobce a kontrolory kvality, kteří hledají rychlejší a efektivnější způsoby hodnocení.

V této souvislosti nabízí Ramanova spektroskopie moderní, neinvazivní a citlivou alternativu. Tato analytická technika využívá rozptyl monochromatického světla k získání spektra, které odhaluje molekulární složení a strukturu zkoumaného vzorku. V posledních letech se Ramanova spektroskopie stává stále více populární ve vědeckých kruzích, zejména v oblastech potravinářství a agrochemie, díky své schopnosti poskytovat detailní informace o molekulárních složkách s minimální přípravou vzorku.

Tato diplomová práce se zaměřuje na možnost využití Ramanovy spektroskopie pro analýzu a kvantifikaci fotosyntetických barviv, jako jsou chlorofyl a karotenoidy, v čaji matcha. Hlavním cílem je posoudit, jak může tato metoda přispět k rychlejšímu a přesnějšímu stanovení kvality čaje, což je klíčové pro jeho výrobu a komerční hodnocení.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 PĚSTOVÁNÍ A PŘÍPRAVA MATCHA ČAJE

## 1.1 Historie zeleného čaje matcha

Matcha má svůj původ z čajového keře *Camellia sinensis* – čajovník čínský. Jsou známy dvě odrůdy: var. *Sinensis* a var. *Assamica*. Matcha jsou ty nejkvalitnější lístky japonského zeleného čaje, které jsou rozemleté na prášek. Nejdříve se listy suší a poté melou na kamenných mlýnech, které se otáčejí při malých otáčkách. Díky tomuto zvlášť šetrnému zpracování si matcha zachovává všechny účinné látky typické pro zelený čaj, jako jsou vitamíny, antioxidanty, minerální látky a vláknina. Má jasnou svěží chuť i vůni. Kolébkou matchy je Čína, kořeny sahají do 8. století. Nicméně za mistry matchy jsou považováni Japonci, jelikož byla dovezena japonským mnichem Mjóanem Eisaiem. Po svém příjezdu do Japonska v roce 1191 se rozhodl zahájit kampaň na zviditelnění matchy společně se zen-buddhismem, byl totiž zastáncem toho, že pití čaje matchy je velmi důležitý aspekt pro meditaci. Později, roku 1211 byla vydána kniha, kterou pojmenoval Kissa Jódžóki (Pití čaje pro zdraví). Základní myšlenka celé knihy byla sepsána na prvním řádku: „Čaj je nejlepší léčebný prostředek, který dokáže život člověka naplnit.“ [1], [2], [3].

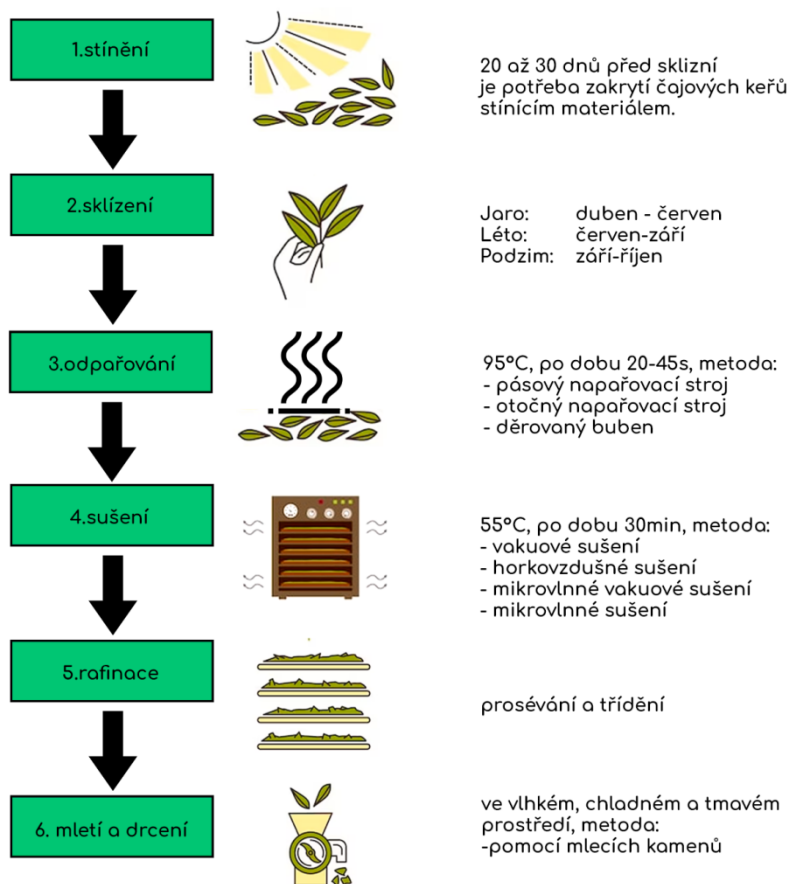
## 1.2 Matcha ve 21. století

Matcha čaj se stal ve 21. století velmi populárním a oblíbeným nápojem. Díky své charakteristické barvě a chuti je přísadou do různých nápojů a pokrmů. Hlavní chuťová složka čaje matcha přirovnávána k chuti umami, která je popisována jako lahodná, pikantní a neodolatelná. Další nezpochybnitelný význam spočívá v obsahu kofeinu, který ovlivňuje nervovou soustavu a tím napomáhá např. k udržení pozornosti a oddálení únavy. Tato vlastnost je jedním z důvodů, proč je matcha často preferovanou alternativou kávy. Navíc obsahuje i L-theanin, který pomáhá uklidnit mysl a podporuje relaxaci, aniž by způsoboval ospalost. Neméně důležitý význam čaje matcha spočívá v obsahu antioxidantů, které pomáhají chránit před volnými radikály a mohou pomoci snížit riziko vzniku některých chronických onemocnění. V současné době je matcha čaj snadno dostupný ve specializovaných čajovnách, obchodech se zdravou výživou a také na internetu. Je vítaným nápojem pro mnoho lidí, kteří hledají zdravější alternativu kávy a rádi objevují nové trendy v oblasti výživy [1], [4].

## 2 TECHNOLOGIE ZÍSKÁVÁNÍ ČAJE MATCHA

Výroba čaje matcha spočívá ve složitém a technologicky specifickém procesu, který je odlišný od běžného procesu získávání zeleného a černého čaje. Podstatou celého procesu je metoda zastínění typu Tana, která se používá do současnosti. Jedná se o použití obrovských ocelových konstrukcí postavených tak, aby zakryly celou plochu pole. Systém klecí vede podél okraje pole a skrz vrcholky keřů. Přes klece jsou nataženy sítě takovým stylem, aby mezi střechou a vršky keřů byl zachován prostor pro rostoucí keře. Sítě umožní propustnost 10 % světla, současně je ale prostupnost deště a vlhkosti [1], [4], [5].

6 kroků používaných k výrobě čaje matcha, je schematicky znázorněno na obrázku č. 1



**Obrázek č. 1: Proces výroby matcha čaje [6]**

Varianta *Camellia sinensis* se v Japonsku pěstuje v teplotním rozpětí mezi 11,5–18 °C, kdy úhrn srážek je 1500–2000 mm po celý rok. Vysoce kvalitní čajové lístky se často sklízají ve vyšších nadmořských výškách, přibližně 2200–3000 m. n. m. Sklon svahu je 0,5–10 stupňů a dále je potřeba přímého slunečního světla po dobu nejméně 5 hodin nebo 11 hodin nepřímého slunečního světla [5], [6].

Metoda džikagise je naopak používána u drobných rolníků a pěstitelů. Jedná se o ekonomicky úspornější typ, jelikož se přes čajovníky natáhne velká plocha látky a dojde k zastínění. Účinek džikagise je podobný, nicméně nenabízí takové možnosti jako metoda tana [1].

## 2.1 Proces sklizně čaje matcha

Během sklizně se mladé čajové výhonky se třemi listy trhají buď ručně, nebo stroje.



Obrázek č. 2: Sklizeň čaje matcha [13]

Ručně trhané čajové lístky se obvykle používají k výrobě čaje nejvyšší kvality. Poté následuje napařování a sušení čajových lístků, které snižuje asi o 50 % celkovou vlhkost. Sušené čajové lístky se nazývají: „Aracha“, což znamená surový čaj. Mezi způsoby sušení řadíme: vakuové sušení, které je mimo jiné považováno za nejúčinnější metodu, dále zde patří mikrovlnné sušení a sušení horkým vzduchem. Dále jsou čajové lístky prosety a zbaveny nečistot, nažloutlých listů a nežádoucích částí a poté následuje třídění podle fyzického vzhledu, jako je barva, tvar a velikost čajových listů. Typ Tencha se pak vyrábí po procesu třídění. Čajové lístky vyšší jakosti jsou tříděny a rozemlety na prášek s částicemi o velikosti kolem 5 až 10  $\mu\text{m}$  pro výrobu matcha [7], [8].

V roce 1738 Soen Nagatani vynalezl metodu zpracování zeleného čaje s názvem Uji, která se stále používá pro zastavení fermentace, zachování zelené barvy a odstranění travnaté chuti čajových lístků díky napařovacímu procesu [6].

### 3 SLOŽENÍ ČAJE MATCHA

Mezi základní složky čaje matcha patří nepochybně: fotosyntetická barviva, konkrétně chlorofyl typ a, chlorofyl typ b a dále karotenoidy, mezi které patří: lutein, zeaxanthin, cantaxanthin, trans- $\beta$ -Apo-8'-carotenal,  $\beta$ -karoten a lykopen. Dalšími složkami čaje matcha jsou: antioxidanty včetně katechinů a zejména epigalokatechin galátu (EGCG), který je známý pro své protizánětlivé a protirakovinné vlastnosti. Dalšími složkami jsou aminokyseliny jako je L-theanin, který přispívá k uklidňujícímu účinku matcha čaje a zároveň zlepšuje koncentraci a pozornost., vitamíny a minerální látky včetně vitaminů C, E a B-komplexu, stejně jako zinku a chromu. Dále obsahuje kofein. Obsah kofeinu v čaji matcha se může značně lišit v závislosti na kvalitě čaje a způsobu jeho přípravy. Obecně se uvádí, že jedna porce matcha (která obvykle obsahuje asi 2 gramy prášku) může obsahovat mezi 19 až 44 mg.g<sup>-1</sup> kofeinu. Tato hodnota je výrazně vyšší ve srovnání s většinou ostatních druhů čaje, což je dáno tím, že se při pití matcha konzumuje celý list čaje ve formě jemného prášku, a ne jen jeho extrakt [9].



Obrázek č. 3: Matcha čaj[13]

#### 3.1 Fotosyntetická barviva

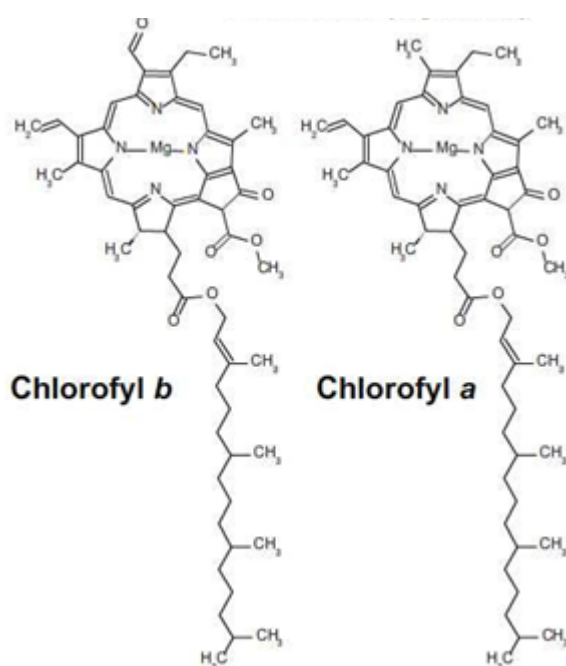
##### 3.1.1 Chlorofyl

Chlorofyl je přírodní zelené barvivo, které se hojně vyskytuje v přírodě. Je přítomen v chloroplastech většiny rostlinných druhů. Chlorofyl zastává centrální pozici v procesu fotosyntézy. Chlorofylová struktura má několik forem, avšak v zelených rostlinách jsou přítomny převážně jen dva typy – chlorofyl a a chlorofyl b [10].

Chlorofyl a, mající zelenožlutý odstín, je primárním pigmentem zapojeným do fotosyntézy, přeměňujícím světelnou energii na energii chemickou. Absorbuje hlavně

modré a červené světlo a reflektuje zelené světlo, což je vlnová délka viditelná lidským okem jako zelená barva. Absorpce světla touto molekulou zajišťuje energii nezbytnou pro průběh fotosyntézy. Chlorofyl b, který má modrozelený odstín, funguje jako doplňkový pigment ve fotosyntetickém procesu. Tento pigment je běžný ve vyšších rostlinách a zelených řasách. Chlorofyl b pracuje společně s chlorofylem a v přenosu světelné energie [7], [8].

Vzorce obou základních typů chlorofylů, jsou uvedeny na obrázku číslo 4. Jedná se o protoporphyrinové cykly, jejichž centrálním atomem je  $Mg^{2+}$ . Chlorofyl b se od chlorofylu a liší pouze substitucí metylové skupiny za skupinu aldehydovou na 3. atomu uhlíku.



Obrázek č. 4: Vzorce chlorofylů a, b [49]

### 3.1.2 Karotenoidy

Karotenoidy jsou pigmenty nacházející se v přírodě, které se projevují v odstínech červené, oranžové a žluté. Tyto pigmenty slouží jako sekundární fotosyntetické pigmenty – absorbují světlo v částech viditelného spektra, které nejsou využívány chlorofylem. Karotenoidy se dělí do dvou hlavní tříd, které se liší na základě toho, jestli obsahují nebo neobsahují ve své chemické struktuře kyslík [10], [11], [12].

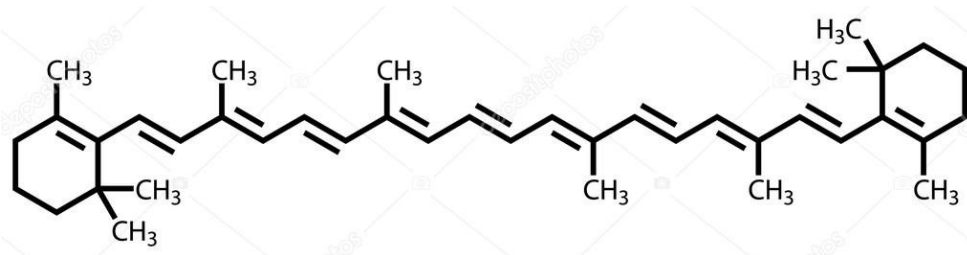
- **Karoteny** – jsou červené a kyslík ve své molekule neobsahují a řadíme zde například  $\beta$ -karoten a lykopen. Karoteny jsou specifickou podskupinou karotenoidů. V rámci karotenů existují různé formy, jako jsou  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  karoten,

přičemž  $\beta$ -karoten je považován za nejvýznamnější z hlediska výživy. Některé karoteny v lidském těle slouží jako prekurzory vitamínu A, což znamená, že se v těle mění na vitamín A. Karoteny a jiné karotenoidy mají antioxidační vlastnosti, čímž pomáhají zabránit oxidačním procesům v buňkách, které mohou vést k různým onemocněním a procesům stárnutí. Karotenoid lykopen, který nemá aktivitu vitamínu A, je spojován s prevencí rakoviny prostaty [13].

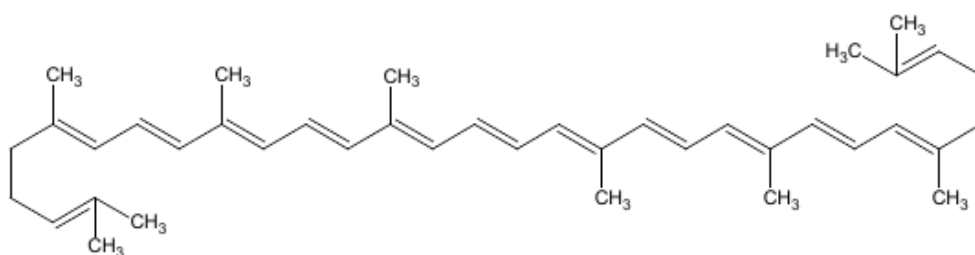
- **Xantofyly** – jsou naopak žluté a ve své molekule obsahují kyslík. Mezi významné zástupce patří lutein, zeaxanthin a kantaxanthin. Karotenoid lutein neslouží jako prekurzor vitamínu A, z toho vyplývá, že se v těle nepřeměňuje na látky s aktivitou vitamínu A. Lutein je známý pro svou schopnost bránit degeneraci makuly, což je důležité pro prevenci vzniku očních zákalů ve stáří. Xantofyly jsou pigmenty nacházející se u mikroorganismů, rostlin i živočichů. Tyto sloučeniny způsobují zabarvení svých nositelů do odstínů sahajících od žluté až po červenofialové. Tato barva je výsledkem přítomnosti rozsáhlého systému konjugovaných dvojných vazeb, obsahujícího 11 nebo více takových vazeb. Patří sem různé formy jako alkoholy, aldehydy, ketony a karboxylové kyseliny. Xantofyly lze nalézt ve všech rostlinách s chlorofylem a v mnoha druzích fotosyntetizujících bakterií. Tyto pigmenty hrají klíčovou roli jako doplňující fotosyntetická barviva, přičemž jsou zvláště hojně zastoupeny v komplexech, které se podílejí na sběru světla. Charakteristické podzimní zbarvení listů je způsobeno právě přítomností xantofylů [13].



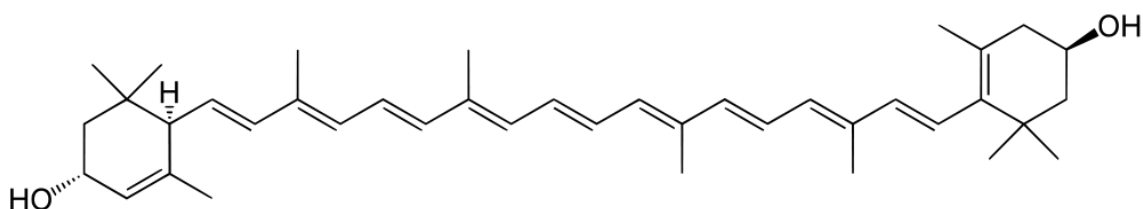
Chemické struktury vybraných karotenoidů jsou zobrazeny na obrázcích č. 5, 6, 7 a 8.



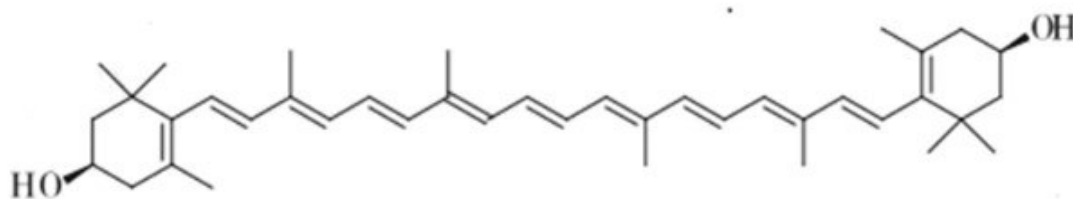
Obrázek č. 5: Vzorec  $\beta$ -karotenu [50]



Obrázek č. 6: Vzorec lykopenu [51]



Obrázek č. 7: Vzorec luteinu [52]



Obrázek č. 8: Vzorec zeaxanthinu [53]

### 3.1.3 Ovlivnění množství fotosyntetických barviv v listcích čajovníku

Různé aspekty mohou ovlivnit obsah chlorofylu v listech čajovníku (*Camellia sinensis*), což ovlivňuje kvalitu čaje:

1. **Expozice světlu:** Jelikož chlorofyl je zásadní pro fotosyntézu, jeho tvorba je úzce spojena s množstvím dostupného světla. Ve slunečním světle dochází k vyšší produkci chlorofylu. U rostlin určených pro výrobu matcha čaje, které jsou často před sklizní zastíňovány, je toto zvýšení ještě výraznější, což vede k bohatší zelené barvě listů.
2. **Věk a část rostliny:** Mladší listy čajovníku mají tendenci obsahovat více chlorofylu než starší listy. To je důležité při sklizni, kdy se preferují mladší listy kvůli jejich vyšší kvalitě a chuti.
3. **Půda a výživa:** Zdravotní stav rostliny a množství chlorofylu jsou ovlivněny kvalitou půdy a dostupností živin, především dusíku, který je nezbytný pro tvorbu chlorofylu.
4. **Klimatické podmínky:** Obecně platí, že rostliny produkují více chlorofylu za mírných klimatických podmínek, s adekvátní vlhkostí. Naopak extrémní teploty nebo sucho mohou produkci chlorofylu snižovat.
5. **Metody zpracování listů:** Po sklizni jsou listy čajovníku rychle zpracovány, aby se zabránilo oxidaci. Tradiční metody zpracování, včetně paření listů, pomáhají zachovat chlorofyl a zabránit jeho rozkladu.
6. **Skladování a balení:** Exponování matcha prášku vzduchu, světlu nebo vysokým teplotám může vést k degradaci chlorofylu. Proto je důležité správné skladování a balení v ochranné atmosféře nebo ve tmě, aby se uchovala kvalita a barva prášku.
7. **Stresové podmínky:** Stresové faktory, jako napadení škůdci a nemoci, mohou negativně ovlivnit schopnost rostliny vytvářet chlorofyl [10], [12].

Producenti čaje mohou tyto faktory regulovat, aby dosáhli požadovaného množství chlorofylu v listech, což má důležitý dopad na celkovou kvalitu a vlastnosti hotového čaje. Všechny tyto faktory společně ovlivňují množství chlorofylu v prášku matcha a jsou klíčové pro jeho kvalitu, včetně barvy, chuti a zdravotních přínosů.

### 3.1.4 Stabilita fotosyntetických barviv v připraveném nápoji

Stabilita fotosyntetických barviv, zejména chlorofylu a karotenoidů, v připraveném nápoji matcha může být ovlivněna několika faktory: světlo a teplota, pH, skladování, přítomnost kyslíku a antioxidantů.

1. **Světlo a teplota:** Vystavování matcha nápoje světlu a vysokým teplotám může způsobit degradaci fotosyntetických barviv. Chlorofyl je obzvláště náchylný k rozkladu při vystavení světlu a teplotě, což může vést k zeslabení intenzivní zelené barvy. Proto je doporučeno připravovat matcha čaj s vodou o teplotě okolo 80°C, nikoli s vroucí vodou.
2. **pH:** Stabilita chlorofylu může být ovlivněna hodnotou pH nápoje. V kyselém prostředí dochází k rozkladu chlorofylu, což může vést ke změně barvy. Matcha má obvykle mírně alkalické pH, což pomáhá udržet stabilitu chlorofylu. Doporučením pro přípravu matcha nápoje je voda s neutrálním pH=7.
3. **Skladování:** Jakmile je matcha prášek smíchán s vodou, je důležité nápoj spotřebovat relativně rychle. Dlouhodobé skladování nápoje může vést k postupné oxidaci a rozkladu fotosyntetických barviv.
4. **Přítomnost kyslíku:** Oxidace je hlavní příčinou degradace chlorofylu v nápoji. Kyslík a jiné oxidanty mohou způsobit blednutí zelené barvy nápoje. Proto je důležité spotřebovat matcha prášek co nejdříve po přípravě, aby se minimalizovala oxidace.
5. **Přítomnost antioxidantů:** Antioxidanty chrání fotosyntetická barviva před rozkladem. Proto přidání antioxidantů do nápoje matcha, může pomoci prodloužit jeho stabilitu.
6. **Další faktory:** Stabilitu fotosyntetických barviv v matchě mohou ovlivnit i jiné další faktory, mezi které patří kvalita čajových lístků, způsob zpracování a způsob přípravy.

Pro zachování stability fotosyntetických barviv v matcha nápoji je tedy doporučeno připravit jej bezprostředně před konzumací, chránit jej před světlem a teplem a pít ho čerstvý [14].

## 3.2 Zdravotní účinky čaje matcha na lidský organismus

Zdravotní přínosy zeleného čaje vyplývají z přítomnosti přírodních antioxidantů, jako jsou polyfenoly. Jedná se o širokou škálu sloučenin tvořících až 30 % suché hmotnosti zeleného čaje. Polyfenoly jsou považovány za mimořádně silné antioxidanty, s účinky srovnatelnými s vitamíny, jako jsou vitamíny C a E,  $\beta$ -karoten a tokoferol. Množství zdraví prospěšných účinných látek, které jsou obsažené v čajových nápojích závisí na druhu čaje, na množství čajových lístků na porci, teplotě vody při přípravě čaje a době vaření [9], [15], [16].

### 3.2.1 Obsah katechinů

Studie potvrzující vysoký antioxidační potenciál čajových nápojů tvrdí, že pochází ze značného obsahu katechinů, což je typ fenolické sloučeniny s příznivými účinky na lidské zdraví. Zelený čaj obsahuje čtyři hlavní katechiny: epikatechin (EC), epikatechin-3-galát (EKG), epigalokatechin (EGC) a epigalokatechin-3-galát (EGCG), z nichž EKG je nejaktivnější a nejvíce zastoupený. Vysoký obsah polyfenolů má větší schopnost pohlcovat volné radikály, než samotný vitamín C. Fenolické sloučeniny se přirozeně vyskytují v listech *Camellia sinensis*. V případě každodenní konzumace, tak může být matcha nápoj hlavním zdrojem katechinů ve stravě [17], [18], [19].

Celkový obsah polyfenolů v čaji matcha se pohybuje v rozmezí 169–273 mg GAE/g, nicméně byl publikován i nižší obsah polyfenolů v matcha čaji než v jiných zelených čajích. Takový výsledek může být způsoben zastíněním čajových rostlin, které inhibuje syntézu polyfenolů. Obsah katechinů v zelených čajích se obvykle pohybuje v hodnotách 5,46–7,44 mg.g<sup>-1</sup> a je mnohem vyšší než u černých čajů, kde se obsah katechinů pohybuje v rozmezí 0–3,47 mg.g<sup>-1</sup>. [17], [18], [19].

### 3.2.2 Obsah kofeinu

Kofein je základní složkou čajových nápojů a je zodpovědný za jejich výraznou a žádoucí chuť. Zároveň je to silný antioxidant. Jeho hladina může souviset s dobou sklizně a stářím listů – čím starší listy, tím nižší obsah kofeinu. Obsah kofeinu závisí také na odrůdě čaje, povětrnostních podmínkách během vegetace a také na metodě louhování. Účinky kofeinu souvisí s jeho antioxidačním potenciálem, neutralizací reaktivní formy kyslíku a zvýšením aktivity antioxidačních enzymů včetně glutathionu. V pravidelných dávkách může kofein snižovat stres, který je zprostředkovaný volnými radikály. Kromě toho může kofein

inhibovat sekreci prozánětlivých cytokinů. Matcha čaj má poměrně vysoký obsah kofeinu ve srovnání s jinými zelenými čaji, díky tomu získává jedinečnou chuť a aroma. Obsah kofeinu v zelených čajích se pohybuje v rozmezí 11,3–24,67 mg.g<sup>-1</sup>, zatímco u matcha čaje je mezi 18,9–44,4 mg.g<sup>-1</sup> [17], [21], [22].

### 3.2.3 Obsah fenolových kyselin

Fenolové kyseliny jsou sekundární rostlinné metabolity, vyznačující se vysokým antioxidačním a protizánětlivým potenciálem, dále má hypoglykemické a neuroprotektivní účinky. Další vlastností je, že inhibují růst rakovinných buněk a zabraňují metastázám. Některé fenolové kyseliny mohou prostřednictvím modulace metabolismu lipidů a sacharidů podporovat regulace metabolických poruch. Jedna z nejběžnějších sloučenin z této skupiny, která se vyskytuje v potravinách je kyselina chlorogenová. Publikované hodnoty obsahu fenolových kyselin ve vzorcích čaje matcha byly následující: kyselina gallová – 423 μg.g<sup>-1</sup>, kyselina p-hydroxybenzoová – 243 μg.g<sup>-1</sup>, kyselina chlorogenová – 4800 μg.g<sup>-1</sup>, kyselina kávová – 223 μg.g<sup>-1</sup>, kyselina ferulová – 289 μg.g<sup>-1</sup> a elagová kyselina – 371 μg.g<sup>-1</sup> [17], [23], [24].

### 3.2.4 Obsah vitamínu C

Vitamín C je základní mikronutrient v lidské výživě a jedná se o silný exogenní antioxidant. Díky svým vlastnostem podporuje imunitní obranu těla. Nálevy čaje matcha mohou obsahovat od 32,12 mg.l<sup>-1</sup> až do 44,8 mg.l<sup>-1</sup> vitamínu C, v závislosti na teplotě vody použité k přípravě nálevu a původu čaje. Sušený prášek matcha čaje obsahuje více než dvojnásobné množství vitamínu C než jiné zelené čaje. Obsah byl stanoven na 1,63–3,98 mg.g<sup>-1</sup> v závislosti na typu produktu a jeho původu [17], [25].

### 3.2.5 Obsah chlorofylu

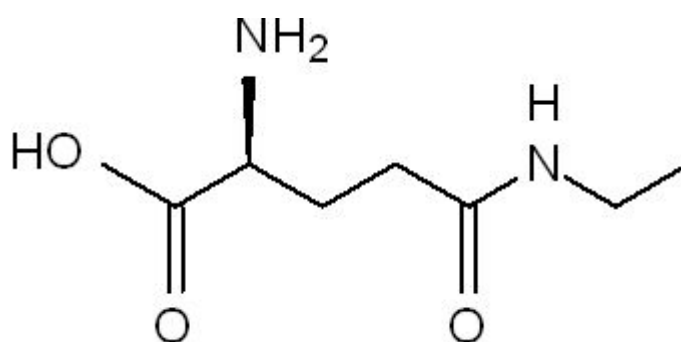
Díky pěstování ve stínu má čaj matcha zvýšený obsah chlorofylu a díky tomu také jedinečnou zářivou barvu. Chlorofyl a jeho deriváty vykazují silné antioxidační a protizánětlivé účinky. Obsah chlorofylu v čaji typu Tencha byl stanoven na hodnotu 5,65 mg.g<sup>-1</sup>, kdežto v zelených čajích hodnoty činily 4,33 mg.g<sup>-1</sup> [26].

### 3.2.6 Obsah theaninu

Theanin je aminokyselina, která se nachází v čajovníku *Camellia sinensis*. Díky pěstování rostlin určených k produkci matcha prášku ve stínu se theanin nerozkládá. Výsledkem je,

že listy Tenchy obsahují větší množství theaninu ve srovnání s jinými čaji. Relativně vysoký obsah theaninu v čaji matcha je zodpovědný za jeho jedinečnou chuť a v kombinaci s kofeinem poskytuje chuťový vjem typu umami. Kombinace L-theaninu a kofeinu může zvýšit koncentraci a bdělost ve vyšší míře než při použití jedné ze sloučenin samostatně (synergický účinek). Dle publikovaných studií je obsah L-theaninu v nálevu matcha čaje v množství  $6,1 \text{ mg.l}^{-1}$ , zatímco v sušeném vzorku bylo stanoveno  $44,65 \text{ mg.g}^{-1}$  [27], [28].

Vzorec molekuly theaninu je uveden na obrázku číslo 9.



Obrázek č. 9: Vzorec molekuly theaninu[13]

### 3.2.7 Zdravotní účinky karotenoidů

Pro naše zdraví je klíčových šest hlavních karotenoidů, přestože vědci identifikovali stovky různých typů. Mezi ně patří  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, kryptoxanthin, lykopen, lutein a zeaxanthin.  $\alpha$ -karoten a  $\beta$ -karoten najdeme v mrkvi a dýních, lykopen je hojný v červených plodech jako jsou vodní melouny, červený grapefruit, červený rybíz a aronie. Zeaxanthin se vyskytuje v tmavě zelené zelenině, dýních a červených paprikách, kryptoxanthin v mangách, pomerančích, meruňkách a broskvích, a lutein je zastoupen v zelené a žlutočervené zelenině – špenát, žlutočervené ovoce a vejce. Hlavní přínos karotenoidů spočívá v jejich antioxidačním účinku. Chrání buňky před poškozením nestabilními kyslíkovými molekulami, které se nazývají volné radikály. Každý karotenoid působí specificky na různé tkáně.  $\beta$ -karoten v těle přeměňujeme na vitamín A, což platí i pro  $\alpha$ -karoten a kryptoxanthin, byť v menším množství. Některé studie naznačují, že karotenoidy mohou preventivně působit proti rakovině tím, že omezují růst abnormálních buněk, ale tato tvrzení jsou stále předmětem výzkumu. Například lykopen se zkoumá v souvislosti s prevencí rakoviny prostaty. Tyto látky také mohou poskytovat ochranu proti srdečním

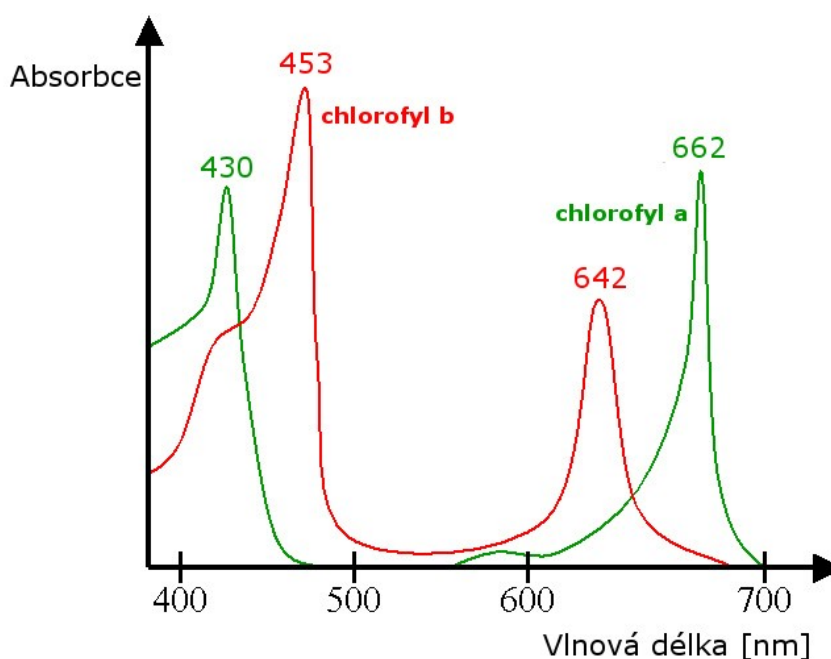
onemocněním a zpomalovat vývoj makulární degenerace, zvyšovat celkovou imunitu a blokovat tvorbu škodlivého cholesterolu (LDL), který zvyšuje riziko kardiovaskulárních nemocí. Lutein a zeaxanthin podporují zdraví očí absorpcí škodlivých ultrafialových paprsků a neutralizací volných radikálů na sítnici, což snižuje riziko výskytu makulární degenerace a dalších zrakových poruch souvisejících s věkem, vedoucích k postižení zraku nebo slepotě u starších osob [29].

## 4 METODY POUŽÍVANÉ PRO STANOVENÍ BARVIV

Mezi metody, které je možné použít pro stanovení fotosyntetických barviv patří: UV/VIS spektroskopie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a v neposlední řadě Ramanova spektroskopie. Těmto metodám je věnovaná pozornost v následující části textu.

### 4.1 Stanovení fotosyntetických pigmentů pomocí UV/VIS spektroskopie

Stanovení fotosyntetických pigmentů v matcha čaji pomocí UV/VIS spektrofotometrie je zajímavým a relevantním přístupem k měření obsahu chlorofylů a karotenoidů. Postup se obvykle skládá z několika kroků. Jako první se provádí příprava vzorku pro analýzu. To obvykle zahrnuje extrakci pigmentů z prášku čaje pomocí vhodného rozpouštědla, jako je například etanol, metanol nebo směs acetonu a vody. Vzorek je poté filtrován nebo centrifugován, aby se odstranily pevné částice. Následuje spektrofotometrická analýza, kdy čistěný extrakt je analyzován pomocí UV/VIS spektrofotometru. Měření se provádí ve viditelné oblasti spektra, obvykle mezi 400 a 700 nm, kde chlorofyl a karotenoidy vykazují charakteristická absorpční maxima. Chlorofyl a (většinou přítomný v největším množství) má absorpční maxima kolem 430 nm a 662 nm, zatímco chlorofyl b má maxima kolem 453 nm a 642 nm (viz Obrázek č. 10). Karotenoidy, jako je  $\beta$ -karoten, vykazují absorpční maxima v oblasti 450 až 470 nm.



Obrázek č. 10: Charakteristická absorpční maxima chlorofylu a, b [54]



Dalším krokem je kvantifikace. K určení koncentrace analytu ve vzorku se využívá Lambert-Beerův zákon, který je uveden na obrázku číslo 11.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \Rightarrow A = \varepsilon \cdot l \cdot c \Rightarrow A = \frac{1}{F} \cdot c$$

Obrázek č. 11: Lambert-Beerův zákon [54]

#### Vysvětlivky:

A – absorbance,  $\varepsilon$  – absorpční molární koeficient ( $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), c – koncentrace absorbující složky v roztoku ( $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), l – šířka vrstvy, přes kterou záření prochází (cm), F – faktor, zahrnující experimentální podmínky měření

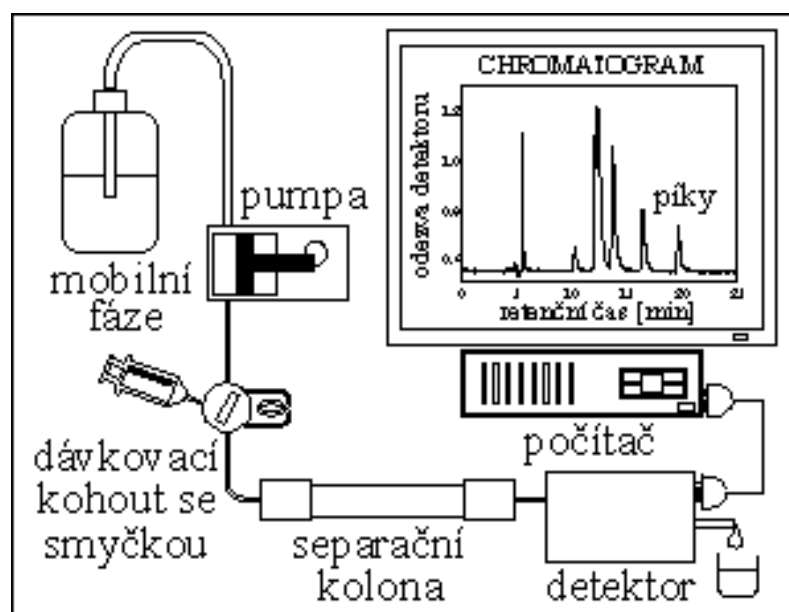
Tento zákon uvádí, že absorpce je přímo úměrná koncentraci absorbující látky ve vzorku. Pomocí kalibračních křivek, získaných měřením známých koncentrací standardních roztoků pigmentů, lze určit koncentrace chlorofylu a karotenoidů ve vzorku matcha čaje. Tato metoda je ceněna pro svou přesnost, rychlost a schopnost poskytovat podrobné informace o složení pigmentů v matcha čaji [13], [30], [31].

## 4.2 Stanovení fotosyntetických pigmentů pomocí HPLC

HPLC, neboli high-performance liquid chromatography, je pokročilá forma kapalinové chromatografie používaná pro rozdělení komponent vzorků. Tato metoda se využívá jak pro určení typu a množství složek ve vzorku, tak i pro jejich oddělení, což je známé jako preparativní chromatografie. Hlavním rozdílem oproti tradiční sloupcové chromatografii je u HPLC použití silného vysokotlakého čerpadla. Toto čerpadlo umožňuje rychlejší průchod mobilní fáze skrze menší chromatografickou kolonu, ve které je stacionární fáze připevněna k velmi jemným částicím, které mají velikost několik mikrometrů. Díky tomuto uspořádání dosahuje HPLC efektivnější a rychlejší separace složek ve srovnání s běžnou sloupcovou chromatografií [32].

Kapalinový chromatograf je sestaven z několika základních částí (Obrázek číslo 12):

1. Systém pro skladování a přenos mobilní fáze, který zahrnuje vysokotlaké čerpadlo.
2. Mechanismus pro vkládání vzorků do systému.
3. Zařízení pro oddělování složek, což zahrnuje chromatografickou kolonu a termostat pro regulaci teploty kolony.
4. Detekční jednotka pro identifikaci látek nebo zařízení pro sběr frakcí.



Obrázek č. 12: Schéma HPLC [55]

Existují různé varianty kapalinových chromatografů, přičemž některé součásti mohou být přidány nebo vynechány. V procesu izokratické eluce je mobilní fáze převedena z nádrže do vysokotlakého čerpadla. Při gradientové eluci se kombinují průtoky z dvou nebo více nádrží podle specifického programu v míchači umístěném před nebo za čerpadlem. Mobilní fáze je odplyněna pomocí odplyňovače. Poté je převedena přes zařízení pro vkládání vzorků do chromatografické kolony, která je přímo propojena s detektorem [33].

## 5 POUŽITÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE PRO STANOVENÍ FOTOSYNTETICKÝCH BARVIV

Ramanova spektroskopie je metoda molekulární spektroskopie, která, stejně jako Fourierova transformace infračervené spektroskopie (FTIR), využívá vzájemné působení světla a hmoty k získání informací o struktuře a vlastnostech různých materiálů. Zatímco infračervená spektroskopie se zaměřuje na absorpci světla, Ramanova spektroskopie se spoléhá na jeho rozptyl. Tato analytická technika nabízí detailní pohled na molekulární vibrace, což může poskytnout další vhledy do chemických reakcí. Obě metody, Ramanova i FTIR spektroskopie, poskytují spektrální otisk specifických molekulárních vibrací, který je klíčový pro identifikaci chemických látek. Ramanova spektroskopie má navíc schopnost poskytovat dodatečné informace o nižších frekvenčních modech a vibracích, což může odhalit charakteristiky krystalové mřížky a základní strukturu molekul [34], [35].

Rozsah Ramanova jevu koreluje s polarizovatelností elektronů v molekule. Jde o formu neelastického rozptylu světla, který vznikne v důsledku excitace molekuly analytu po dopadu fotonu. Tato excitace uvede molekulu na krátkou dobu do stavu virtuální energie, než dojde k emisi fotonu. Nepružný rozptyl znamená, že energie emitovaného fotonu má buď nižší, nebo vyšší energii než dopadající foton. Následkem tohoto jevu přejde molekula analytu do jiného rotačního nebo vibračního stavu [36].

Aby celková energie systému zůstala konstantní poté, co molekula přejde do nového rotačně-vibračního elektronového stavu, rozptýlený foton se posune na jinou energii, a tedy na jinou frekvenci. Tento energetický rozdíl je roven rozdílu mezi počátečním a konečným rotačně-vibračním stavem molekuly. Pokud má konečný stav vyšší energii než počáteční stav, bude rozptýlený foton posunut na nižší frekvenci, takže celková energie zůstane stejná. Tento posun frekvence se nazývá Stokesův posun, jinak řečeno posun dolů. Pokud má konečný stav nižší energii, rozptýlený foton bude posunut na vyšší frekvenci, což se nazývá anti-Stokesův posun neboli posun nahoru [22], [23].

Aby molekula vykazovala Ramanův jev, musí dojít ke změně dipólové polarizace, která odpovídá změně rotačně-vibračního stavu molekuly. Intenzita Ramanova rozptylu je úměrná této změně polarizace. Proto Ramanovo spektrum (intenzita rozptylu jako funkce frekvenčních posunů) závisí na rotačně-vibračních stavech molekuly. [22], [23].

Ramanův jev je založen na interakci mezi elektronovým mrakem molekuly a vnějším elektrickým polem dopadajícího monochromatického světla, které může vytvořit indukovaný dipólový moment v molekule na základě její polarizace. Protože laserové světlo neexcituje molekulu, nemůže dojít ke skutečnému přechodu mezi energetickými hladinami. Ramanův efekt by neměl být zaměňován s emisí (fluorescence nebo fosforescence), kdy molekula v excitovaném stavu emituje foton a vrací se do základního stavu. Ramanův rozptyl se liší od infračervené (IR) absorpce, kde energie absorbovaného fotonu odpovídá rozdílu energie mezi počátečním a konečným rotačně-vibračním stavem. Závislost Ramanova jevu na derivaci polarizace dipólu se také liší od IR spektroskopie, která závisí na derivaci dipólového momentu. Tento kontrastní rys umožňuje zachytit rotačně-vibrační přechody, které nemusí být aktivní v IR oblasti, aby byly analyzovány pomocí Ramanovy spektroskopie, jak je doloženo pravidlem vzájemného vyloučení v centrosymetrických molekulách. Přechody, ve kterých se vyskytují silné Ramanovy intenzity, mají často slabé IR intenzity a naopak. Pokud je vazba silně polarizovaná a má malou změnu její délky, jako je ta, ke které dochází při vibraci, má jen malý výsledný vliv na polarizaci. Vibrace polárních vazeb (např. C-O, N-O, O-H) jsou tedy poměrně slabé. Polární vazby však vykazují větší změnu dipólového momentu během vibrace, což vytváří silný IR absorpční pás. Naopak nepolární vazby (např. C-C, C-H, C=C) vykazují velké změny v polarizaci během vibrace. Nicméně dipólový moment není ovlivněn, takže zatímco vibrace nepolárních vazeb poskytují silné Ramanovy intenzity, jsou slabé v IR spektru.

Třetí technika vibrační spektroskopie, neelastický nekoherentní rozptyl neutronů (IINS), může být použita k určení frekvencí vibrací ve vysoce symetrických molekulách, které mohou být v IR i Ramanově spektroskopii neaktivní. Pravidla výběru IINS nebo povolené přechody se liší od pravidel IR a Ramanovy spektroskopie, takže se tyto tři techniky doplňují. Všechny dávají stejnou frekvenci pro daný vibrační přechod, ale relativní intenzity poskytují různé informace kvůli různým typům interakce mezi molekulou a fotony pro IR a Ramanovu spektroskopii a neutrony pro IINS [37], [34], [35].

## 5.1 Využití Ramanovy spektroskopie pro stanovení fotosyntetických pigmentů

Ramanova spektroskopie byla využita pro stanovení chlorofylu v čajových lístcích. Pro analýzu byl použit laserový konfokální mikro-Ramanův spektrometr s excitační vlnovou

délkou 532 nm a spektrálním rozlišením 0,2 nm. Spektra byla měřena v rozsahu vlnočtů 579 – 3062  $\text{cm}^{-1}$ , intenzita laseru byla 50 mW a expoziční čas byl 1 s. Získaná spektra byla zpracována a vyhodnocena pomocí metod statické analýzy dat (MSC, WT, SNV, RCF a airPLS). K extrakci efektivního pásma pro spektrální měření fotosyntetických pigmentů byl použit algoritmus (CARS). Metodám datové analýzy byla podrobena data ve spektrálním rozsahu 792 – 1961  $\text{cm}^{-1}$ . Výsledná spektra obsahovala tři intenzivní pásy, které byly přiřazeny kývavé vibraci v rovině  $\text{CH}_3$  skupiny při vlnočtu 1008  $\text{cm}^{-1}$ , C-C natahovací vibraci při vlnočtu 1159  $\text{cm}^{-1}$  a C=C natahovací vibraci při vlnočtu 1528  $\text{cm}^{-1}$ . Přiřazení těchto charakteristických vlnočtů je uvedeno na obrázku číslo 13 [38].

## 5.2 Využití Ramanovy spektroskopie pro stanovení karotenoidů

Ramanova spektroskopie byla použita také pro stanovení karotenoidů přímo v čajových lístcích. Spektra získaná z celých čajových lístků obsahovala charakteristické píky pro

| Wavenumbers/ $\text{cm}^{-1}$           | Assignment   |
|---|--|
| 788/800/1046/1073/1114/1222/1553        | Chlorophyll a  |
| 971                                     | $\beta$ -carotene [ $\pi(\text{C}_{11}-\text{C}_{12})$ ]                                 |
| 988                                     | Chlorophyll  |
| 1026                                    | $\beta$ -carotene [ $\rho(9\text{Me}), \nu(\text{C}_8-\text{C}_9)$ ]                     |
| 1068/1155/1165/1265/1392/1530/1555      | Chlorophyll a  |
| 1128/1160/1210/1380/1465/1523/1567/1644 | Chlorophyll b  |
| 1133                                    | $\beta$ -carotene  |
| 1137                                    | $\beta$ -carotene [ $\nu(\text{C}_{10}-\text{C}_{11})$ ]                                 |
| 1144                                    | Chlorophyll [ $\nu(\text{CN}), \delta(\text{CNC})$ ]                                     |
| 1145                                    | Chlorophyll a [ $\nu(\text{C}_9\text{N}), \delta(\text{C}_9\text{NC}_9)$ ]               |
| 1149                                    | $\beta$ -carotene [14 – 15, 15H, 15 = 15]  |
| 1157                                    | $\beta$ -carotene [ $\nu(\text{C}_{14}-\text{C}_{15}), \delta(\text{C}_{15}-\text{H})$ ] |
| 1172                                    | $\beta$ -carotene [5 – 4, 18r, 6 – 7]  |
| 1186                                    | Chlorophyll a [ $\nu(\text{C}_m\text{C}_{10}), \delta(\text{C}_b\text{H})$ ]             |
| 1187                                    | $\beta$ -carotene [10H, 11H, 8 – 9]  |
| 1191                                    | $\beta$ -carotene [ $\delta(\text{C}_{10}-\text{H}), \delta(\text{C}_{11}-\text{H})$ ]   |
| 1216                                    | $\beta$ -carotene [ $\nu(\text{C}_{12}-\text{C}_{13}), \delta(\text{C}_{14}-\text{H})$ ] |
| 1225                                    | Chlorophyll [ $\delta(\text{CH}), \delta(\text{CH}_2)$ ]                                 |
| 1226                                    | $\beta$ -carotene [12 – 13, 14H, 15 = 15]  |
| 1281                                    | $\beta$ -carotene [15H, 14H, CCC15b]   |
| 1310                                    | $\beta$ -carotene [12H, 11 = 12, 15 = 15]  |
| 1322                                    | $\beta$ -carotene [ $\delta(\text{C}_{12}-\text{H}), \nu(\text{C}_{11}-\text{C}_{12})$ ] |
| 1347                                    | $\beta$ -carotene [12H, 11 = 12, 15 = 15]  |
| 1450                                    | $\beta$ -carotene [ $\delta_{as}(9\text{Me}), \delta_{as}(13\text{Me})$ ]                |
| 1485                                    | $\beta$ -carotene [13 = 14, 11 = 12, 12H]  |
| 1518                                    | Lutein [C=C stretching vibration]  |
| 1524                                    | Chlorophyll a [ $\nu(\text{C}_b\text{C}_b), \nu(\text{C}_a\text{C}_b)$ ]                 |
| 1528                                    | Carotenoids [ $\nu(\text{C}=\text{C})$ ]   |
| 1542                                    | Chlorophyll a [ $\nu(\text{C}_b\text{C}_b)$ ]  |
| 1552                                    | Chlorophyll a [ $\nu(\text{C}_3\text{C}_b), \nu(\text{C}_b\text{C}_b)$ ]                 |
| 1562                                    | $\beta$ -carotene [11 = 12, 15H, 12H]  |

Obrázek č. 13: Charakteristické vlnočty pro chlorofyly a karotenoidy [38]

karotenoidy. Charakteristika sloučenin byla dále potvrzena srovnáním se dvěma karotenoidovými standardy,  $\beta$ -karotenem a luteinem, což jsou karotenoidy přítomné v nejvyšším podílu v čerstvých čajových lístcích. Silné Ramanovy pásy na hodnotách vlnočtu 1003, 1156, 1190 a 1520  $\text{cm}^{-1}$  odpovídají  $\beta$ -karotenu, zatímco Ramanovy pásy na hodnotách 1002, 1154, 1187 a 1518  $\text{cm}^{-1}$  odpovídají luteinu. Hlavní Ramanovy píky ve spektru nacházející se na hodnotách vlnočtů 1001, 1154, 1185 a 1520  $\text{cm}^{-1}$  byly přiřazeny vibraci metylové skupiny  $-\text{CH}_3$ , symetrické vibraci vazeb  $\text{C}-\text{C}$  a polyenové skupině  $\text{C}=\text{C}$ . Ve spektrech byly pozorovány mírné posuny vlnočtů ( $\leq 5 \text{ cm}^{-1}$ ) u několika pásů mezi luteinem a  $\beta$ -karotenem. Pro  $\beta$ -karoten byla maximální intenzita vibrace vazby  $\text{C}-\text{C}$  zaznamenána při vlnočtu 1156  $\text{cm}^{-1}$ , pík vibrace vazby  $\text{C}=\text{C}$  byl zaznamenán při vlnočtu 1520  $\text{cm}^{-1}$ . Zatímco pro lutein byla hodnota intenzity vibračního pásu  $\text{C}-\text{C}$  při 1154  $\text{cm}^{-1}$ , u vazby  $\text{C}=\text{C}$  byla hodnota vlnočtu 1518  $\text{cm}^{-1}$ . Tyto rozdíly ve vlnočtech mohou být zapříčiněny tím, že lutein je okysličený karoten a jeho oxidovaná hydroxylová skupina může ovlivnit vibrace vazeb  $\text{C}-\text{C}$  nebo  $\text{C}=\text{C}$ . Tyto studie prokazují, že Ramanovu spektroskopii lze použít k rozlišení různých druhů karotenoidů. Kromě toho je Ramanova maximální intenzita mnohem vyšší pro  $\beta$ -karoten než pro lutein, ikdyž se používá stejná koncentrace standardního roztoku. [39], [40].

Z publikovaných studií vyplývá možnost použití Ramanovy spektroskopie pro stanovení obsahu fotosyntetických barviv přímo v listech čajovníku, což by mohlo být v budoucnu použito pro rychlé a přesné hodnocení stupně zralosti čajových lístků, příp. také pro mechanizaci třídění čajových listů při sklizni [37], [39], [40].

### 5.3 Výhody a nevýhody Ramanovy spektroskopie

Jako každá měřicí technika, tak i Ramanova spektroskopie má své výhody a nevýhody.

Mezi výhody patří:

- Není nutná žádná úprava nebo úplně malá úprava měřeného vzorku. Tím se snižují požadavky na množství použitých chemických činidel a minimalizuje se množství odpadu.
- Lze měřit ve vodném prostředí – optické materiály nejsou citlivé na vlhkost.
- Je aplikovatelná na různé formy látek a zároveň na všechna látková skupenství.
- Poskytuje intenzivní pásy pro symetrické vibrace.
- Nedestruktivní, bezkontaktní a rychlá metoda.
- Při měření vzorků není zapotřebí odstranění vody a oxidu uhličitého [41].

Mezi nevýhody patří:

- Vysoké pořizovací náklady (dražší než IR spektroskopie).
- Fluorescence vzorku, jelikož bývá o několik řádů vyšší než Ramanův rozptyl a dochází k překrytí Ramanova spektra.
- Obsahuje-li vzorek směs více látek, dochází k překrývání pásů a analýza je obtížná [41].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 6 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce bylo stanovit fotosyntetické pigmenty v čaji matcha pomocí Ramanovy spektroskopie a zároveň obsah těchto látek potvrdit dalšími laboratorními metodami – UV/VIS spektrofotometrií a metodou HPLC.

Cíle práce lze rozdělit na dvě části:

1. Teoretická část:

- Charakterizovat fotosyntetické pigmenty v zeleném čaji.
- Popsat metody, které jsou vhodné ke stanovení fotosyntetických pigmentů.
- Popsat metodu Ramanovy spektroskopie se zaměřením na stanovení fotosyntetických pigmentů.

2. Praktická část:

- Stanovit obsah popela a sušiny ve vzorcích čaje matcha.
- Stanovit obsah fotosyntetických pigmentů pomocí Ramanovy spektroskopie.
- Stanovit obsah fotosyntetických pigmentů pomocí UV/VIS spektroskopie a metody HPLC.

## 7 MATERIÁL A METODY

### 7.1 Použité materiály a chemikálie

- Japonská bio matcha – distributor: DAY Spa Shop, Brno
- Japonský bio čaj matcha HARMONY, distributor v ČR: Kyosun s.r.o., Praha
- Bio čaj matcha – distributor pro ČR: drogerie DM
- Matcha natural – výrobce: Zdraví z přírody s. r. o, Zlín
- Aceton: Penta s.r.o.
- CaCO<sub>3</sub>: Lach-Ner, s.r.o.
- Mořský písek: Ing. Petr Lukeš
- NaCl: Ing. Petr Lukeš
- Butylhydroxytoluen: Carl Roth GmbH + Co. KG
- Hexan: Lach-Ner, s.r.o.
- Isopropanol: Mikrochem spol. s r.o.
- Lutein: Sigma-Aldrich
- Canthaxanthin: Dr. Ehrenstorfer GmbH
- Zeaxanthin: Dr. Ehrenstorfer GmbH
- β-karoten: Merck & Co., Inc.
- trans-β-apo-8'-carotenal: ChromaDex, Inc.
- Astaxanthin: HPC Standards GmbH
- Lykopen: TCI, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.
- Běžné laboratorní nádobí a pomůcky

### 7.2 Použité přístroje

- Analytické váhy A&D GH – 200 EC, výrobce: Labicom
- UV/VIS spektrofotometr Biochrom WPA S1200+, výrobce: Biochrom Ltd.
- UHPLC Dionex Ultimate 3000, výrobce: Thermo Fisher Scientific Inc.

- iRaman Plus, model: BWS465-785S, výrobce: B&W Tek, Renishaw Metrohm AG
- Muflová pec: LAC, s.r.o.
- Vodní lázeň FUNKE GERBER – WD436D, výrobce: Funke-Dr.N.Gerber Labortechnik GmbH
- Odstředivka Hettich EBA 20, výrobce: Andreas Hettich GmbH & Co. KG
- Sušárna VENTICELL, výrobce: BMT Brněnská Medicínská Technika a.s.

### 7.3 Charakteristika vzorků

Pro stanovení fotosyntetických pigmentů v matcha prášku byly použity tyto vzorky:

**Vzorek č. 1:** Japonská bio matcha, distributor v ČR: DAY Spa Shop s.r.o., Brno, země původu čaje: Japonsko, obsah balení 100 g, minimální trvanlivost do 04/2025, certifikáty: Produkt ekologického zemědělství (CZ-BIO-002), Zemědělská bio produkce mimo EU

**Vzorek č. 2:** Japonský bio čaj matcha HARMONY, distributor v ČR: Kyosun s.r.o., Praha 9, země původu čaje: Japonsko (Shizuoka, Aichi), baleno v sáčcích 30 x 2 g, minimální trvanlivost do 05/2025, certifikáty: Produkt ekologického zemědělství (CZ-BIO-002), Zemědělská bio produkce mimo EU, JAS

**Vzorek č. 3:** Bio čaj matcha, distributor v ČR: DM drogerie markt s.r.o., České Budějovice, země původu čaje: Japonsko, obsah balení 30 g, minimální trvanlivost do 05/2026, certifikáty: Produkt ekologického zemědělství (CZ-BIO-001), Zemědělská bio produkce mimo EU (DE-OKO-003)

**Vzorek č. 4:** Matcha natural, distributor v ČR: Zdraví z přírody s.r.o., Zlín, země původu čaje: Čína, obsah balení 100 g, minimální trvanlivost do 03/2025

#### 7.4 Stanovení obsahu popela ve vzorcích matcha čajů

Pro stanovení obsahu popela byly nejdříve vyžehány prázdné porcelánové kelímky při teplotě  $550 \pm 25$  °C po dobu 1 hodiny. Po uplynutí této doby, byly kelímky vloženy do exsikátoru, aby vychladly a poté byly zváženy na analytických vahách s přesností na 0,1 mg. Do kelímků bylo naváženo po 1 g vzorku opět s přesností na 0,1 mg. Následně byly kelímky se vzorky vloženy do muflové pece, kde byly při teplotě  $550 \pm 25$  °C po dobu 6 hodin spalovány. V další fázi byly vzorky z muflové pece vloženy do exsikátoru pomocí kleští a po vychladnutí byly porcelánové kelímky zváženy s přesností na 0,1 mg. Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří provedených stanovení. Postup je modifikací normy ČSN ISO 2171 (461019) [42]. Výpočet obsahu popela ve vzorku byl proveden dle vztahu (1).

$$\text{Výpočet obsahu popela [\%]: } P = [(m_1 - m_2) / (m_3 - m_2)] * 100 \quad (1)$$

##### Vysvětlivky:

$m_1$  – hmotnost porcelánového kelímku s popelem [g]

$m_2$  – hmotnost prázdného porcelánového kelímku [g]

$m_3$  – hmotnost porcelánového kelímku s navážkou vzorku [g]

#### 7.5 Stanovení obsahu sušiny ve vzorcích matcha čajů

Sušina jednotlivých vzorků byla stanovena tak, že byl navážen 1 g daného vzorku s přesností na 0,1 mg do předem vysušené a zvážené plechové misky, kdy nejdříve byla zvážena prázdná miska, poté miska se vzorkem. Následovalo sušení v sušárně při teplotě  $105 \pm 2$  °C po dobu 6 hodin a následovalo opětovné zvážení misek a po následném přepočtu dle (2) byl získán podíl sušiny ve vzorku. Výsledek je průměrem ze 3 stanovení.

$$\text{Výpočet obsahu sušiny [\%]: } X = (b/a) * 100 \quad (2)$$

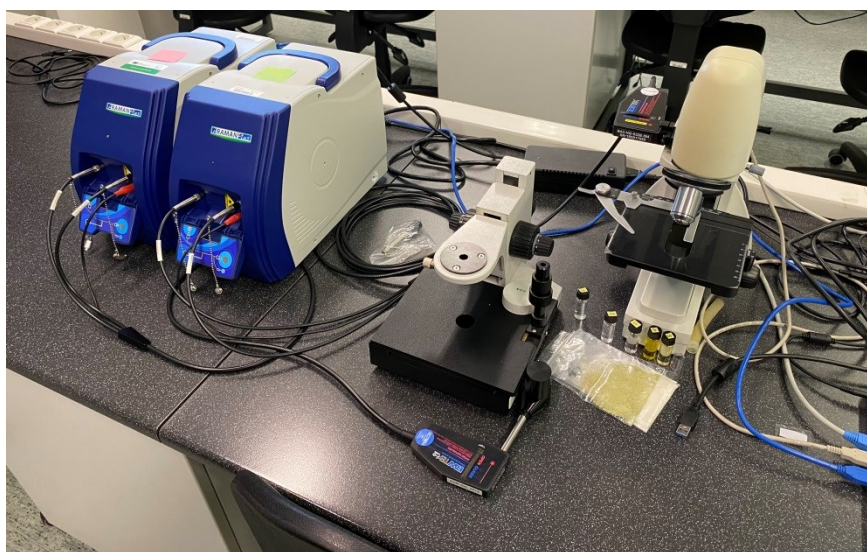
##### Vysvětlivky:

a – navážka vzorku matcha prášku [g]

b – hmotnost vysušeného vzorku matcha prášku [g]

## 7.6 Měření spekter metodou Ramanovy spektroskopie

Měření bylo prováděno přenosným přístrojem iRaman Plus, který je zobrazen na obrázku číslo 14. Zdrojem světla byl laser 785 nm, expoziční čas byl 10 sekund, každé spektrum je výsledkem 10 opakování měření. Spektra byla měřena v rozsahu vlnočtů  $484 - 3197 \text{ cm}^{-1}$ , s rozlišením  $3,5 \text{ cm}^{-1}$ . Měření vzorků bylo zajištěno pomocí optické sondy, která byla vyvedena do měřicí cely, kam byla umístěna skleněná vialka s kapalným vzorkem.



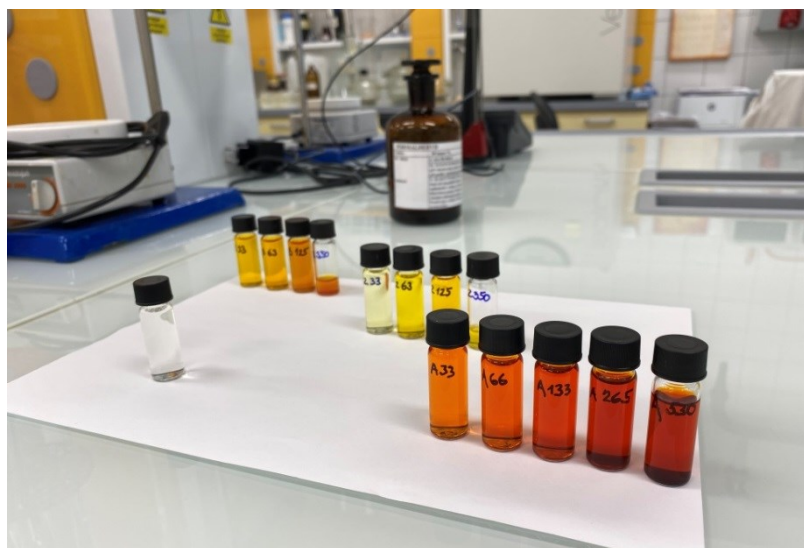
**Obrázek č. 14: Přenosný přístroj iRaman Plus**

Pro získání a vyhodnocení dat pro přípravu spekter byl použit software BWSpec™ 4. Pro měření spekter pomocí Ramanovy spektroskopie byl použit přímo prášek matcha čaje bez předchozích úprav. Vzorek byl vložen do PE fólie a měřen přiložením optické sondy přímo přes obal. Pro získání spekter vybraných karotenoidních standardů byly standardy rozpuštěny v acetonu a měřeny v kulatých skleněných vialkách o objemu 5 ml. Pro přípravu kalibračních křivek byly vybrány standardy astaxanthinu,  $\beta$ -karotenu a zeaxanthinu. Navážka standardů pro astaxanthin činila  $5,3 \text{ mg}/10 \text{ ml}$  acetonu, pro  $\beta$ -karoten činila  $3,5 \text{ mg}/10 \text{ ml}$  acetonu a pro zeaxanthin činila  $3,5 \text{ mg}/10 \text{ ml}$  acetonu. Následným ředěním acetonem byly připraveny koncentrační řady v rozsazích, které jsou uvedeny v tabulce číslo 1.

Tabulka č. 1: Koncentrace standardů karotenoidů v acetonu ( $\mu\text{g/ml}$ )

| Koncentrace standardů ( $\mu\text{g/ml}$ ) |                          |
|--|--------------------------|
| astaxanthin                                | 4/8/17/33/66/133/265/530 |
| $\beta$ -karoten                           | 4/8/17/33/63/125/350     |
| zeaxanthin                                 | 33/63/125/350            |

Na obrázku číslo 15 jsou seřazeny roztoky karotenoidů připravené k měření pomocí Ramanovy spektroskopie, jako blank byl používán aceton. Jednotlivé karotenoidy vykazují charakteristické zbarvení – oranžový  $\beta$ -karoten (vialky vlevo vzadu), žlutý zeaxanthin (vialky uprostřed) a oranžově-červený astaxanthin (vialky vpravo vpředu).



Obrázek č. 15: Připravené naředěné standardy karotenoidů

## 7.7 Stanovení chlorofylů pomocí metody UV/VIS spektroskopie

Měřením pomocí UV/VIS spektrofotometru Biochrom WPA S1200+ byly změřeny jednotlivé absorbance chlorofylu a a chlorofylu b. Měření probíhalo při vlnových délkách 663 nm a 645 nm.

Postupně bylo naváženo 0,05 g matcha prášku s přesností na 0,1 mg. Navážený vzorek byl ve třecí misce rozetřen společně s malým množstvím mořského písku, 20 ml acetonu (80 %) a na špičku nože byl přidán  $\text{CaCO}_3$ , pro zabránění tvorby feofytinu. Směs byla ponechána odstát v temnu a následně odstředěna na centrifuze při 6000 rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl převeden do 25 ml odměrné baňky a doplněn acetonem po rysku. V takto připraveném roztoku byla měřena absorbance při vlnových délkách: 663 nm a 645 nm. Vlnové délky 663 nm a 645 nm odpovídají absorpčnímu maximu chlorofylu a a chlorofylu b.

Pro výpočty koncentrací byly použity následující rovnice (dle Arnona) [43].

$$\text{Koncentrace chlorofylu a (v mg.l}^{-1}\text{)} c_a = 12,70 \cdot A_1 - 2,69 \cdot A_2 \quad (3)$$

$$\text{Koncentrace chlorofylu b (v mg.l}^{-1}\text{)} c_b = 22,90 \cdot A_2 - 4,68 \cdot A_1 \quad (4)$$

$A_1$  – 663 nm,  $A_2$  – 645 nm

Výsledek pro jednotlivé vzorky je vždy průměrem ze tří stanovení.

## 7.8 Stanovení obsahu karotenoidů v matcha čajích metodou HPLC

Pro stanovení obsahu jednotlivých karotenoidů v matcha prášku byla použita metoda HPLC s následujícími parametry měřicího zařízení:

- **Typ přístroje:** UHPLC Dionex Ultimate 3000, detektor UV/VIS, DAD
- **Kolona:** Waters YMC CAROTENOID S-5  $\mu\text{m}$ : 250mm x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$
- **MF B:** metanol
- **MF C:** metanol/MTBE 20/80
- $\lambda$ : 420, 450, 475 a 480 nm, vyhodnoceno při 450 nm
- **Průtok:** 0,7 ml.min<sup>-1</sup>
- **Délka analýzy:** 50 minut
- **Teplota kolony:** 25°C
- **Nástřik:** 50  $\mu\text{l}$
- **Gradientová eluce:**
  1. 0 - 10 min 90 - 75 % B
  2. 10 - 20 min 75 - 50 % B
  3. 20 - 25 min 50 - 30 % B
  4. 25 - 35 min 30 - 10 % B
  5. 35 - 37 min 10 - 6 % B
  6. 37 -39 min 6 - 90 % B
  7. 39 - 50 min 90 % B

Do větší lékovky bylo naváženo 0,25 g vzorku čaje matcha s přesností na 0,1 mg, dále bylo přidáno 3 ml směsi hexanu s 0,05 % BHT (butylhydroxytoluen) a 2 ml isopropanolu a lékovka byla třepána 15 minut na třepačce. Poté byla směs převedena do mikrozkuřavky, odstředěna na odstředivce a horní vrstva pipetou odsáta do misky. Pelet byl převeden do lékovky, rozdrcen a opět bylo přidáno 3 ml hexanu s 0,05 % BHT a 2 ml isopropanolu. Po 15 minutovém protřepání na třepačce byla směs převedena do mikrozkuřavky, centrifugována a horní vrstva odsáta pipetou a přidána k prvnímu podílu do misky. Tento extrakt s karotenoidy na misce byl odpařen na teplé vodní lázni při teplotě 50 °C. Zbytek v misce byl rozpuštěn v isopropanolu, kvantitativně převeden do 10 ml odměrné baňky a doplněn isopropanolem po rysku. Pro přípravu kalibračních křivek byly použity tyto standardy:  $\beta$ -karoten, lutein, zeaxanthin, kantaxanthin, trans- $\beta$ -apo-8'-karotenal a lykopen. Koncentrace standardů



pro přípravu kalibračních křivek činily: 1/5/10/20  $\mu\text{g/ml}$  v isopropanolu. Kalibrační křivky použité pro odečet výsledků jsou uvedeny v přílohách PI – PIV.

## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

Ve všech 4 vzorcích matcha čaje byl stanoven obsah popela a sušiny postupy uvedenými v kap. 7.5 a 7.6. Výsledky těchto stanovení jsou shrnuty v Tabulce č. 2.

### 8.1 Výsledky stanovení obsahu popela a sušiny ve vzorcích matcha čajů

**Tabulka č. 2: Výsledky stanovení průměrného obsahu popela a sušiny ve vzorcích matcha čajů**

|           | <b>Průměrný obsah popela [%]</b> | <b>Hodnota sušiny [%]</b> |
|-----------|----------------------------------|---------------------------|
| <b>V1</b> | 5,1±0,1                          | 95,9±0,1                  |
| <b>V2</b> | 5,8±0,1                          | 97,3±0,1                  |
| <b>V3</b> | 5,9±0,1                          | 96,1±0,1                  |
| <b>V4</b> | 5,3±0,1                          | 96,1±0,1                  |

Průměrný obsah popela v jednotlivých vzorcích práškových matcha čajů se pohyboval v rozmezí 5,1% až 5,9%. Nejmenší průměrný obsah popela byl zjištěn ve vzorku číslo 1, naopak nejvyšší obsah popela byl zjištěn ve vzorku číslo 3. Dle dostupné literatury se, hodnoty popela u matcha čajů pohybovaly v rozmezí 4,6% až 5,2%. [44]

Hodnoty sušiny se po přepočtu pohybovaly v rozmezí od 95,9% do 97,3%, což představuje obsah vlhkosti v práscích v rozmezí 2,7 – 4,1%. Při tomto stanovení bylo zjištěno, že průměrné hodnoty sušiny se u jednotlivých vzorků čajů matcha liší minimálně. Pro srovnání s odbornou literaturou, hodnoty sušiny u matcha čajů jsou uváděny v rozmezí 96,2 % až 97,3% [44].

## 8.2 Výsledky stanovení fotosyntetických barviv pomocí metody Ramanovy spektroskopie

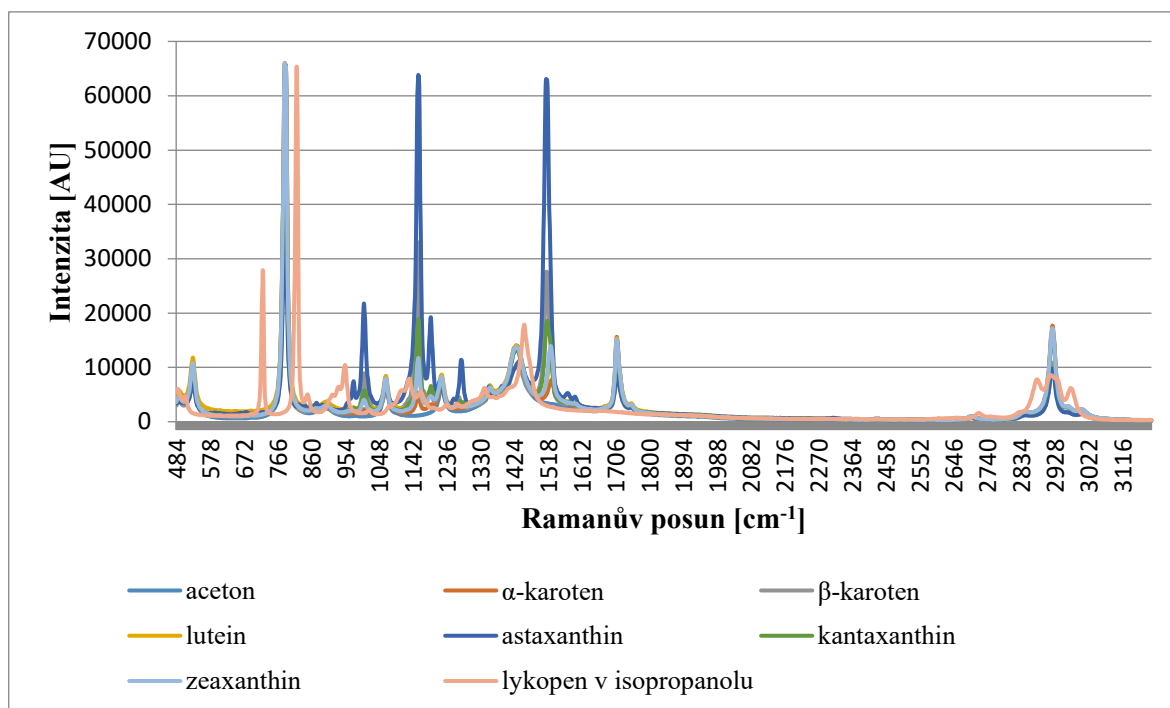
### 8.2.1 Měření práškových vzorků matcha čaje

Měřením práškových vzorků matcha čaje nebylo možné získat Ramanovo spektrum vzorku. Ramanův signál byl zcela překryt velmi intenzivní luminiscencí vzorku, vyvolanou dopadem světla na molekuly chlorofylu. To znemožnilo stanovení barviv přímo ve vzorku [38].

V odborné literatuře jsou uvedeny postupy měření Ramanových spekter přímo v čajových lístcích, tzn. i za přítomnosti chlorofylu. V těchto studiích byla použita excitační vlnová délka laseru 532 nm, nízký výkon laseru a velmi krátký expoziční čas 0,01 – 1 s. Následně byly použity také pokročilé statistické metody analýzy dat. Takovéto uspořádání umožnilo získání Ramanova signálu fotosyntetických barviv přímo v čajovníkových listech i za přítomnosti vysokého obsahu chlorofylu a umožnilo tak sledování distribuce fotosyntetických barviv v listu (viz kap. 5.1) [37], [39], [40].

### 8.2.2 Měření Ramanových spekter standardů karotenoidů

Pro další měření Ramanových spekter fotosyntetických barviv byly použity standardy karotenoidů, které byly rozpuštěny v acetonu. Byla získána spektra těchto látek, která jsou uvedena na obrázku číslo 16:  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, lutein, astaxanthin, kantaxanthin, zeaxanthin a lykopen v acetonu, světle modře je zobrazeno spektrum čistého acetonu.



**Obrázek č. 16: Ramanova spektra standardů karotenoidů**

Vzhledem k velké podobnosti struktury jednotlivých karotenoidů se jejich spektra překrývají. Nejvýraznější píky odpovídají vlnovým 1007  $\text{cm}^{-1}$ , 1159  $\text{cm}^{-1}$  a 1516  $\text{cm}^{-1}$ , píky střední intenzity odpovídají vlnovým 976 a 1278  $\text{cm}^{-1}$ . Píky slabé intenzity jsou pozorovatelné při vlnových 1235, 1578 a 1593  $\text{cm}^{-1}$  u astaxanthinu. Při porovnání s literaturou lze tyto pásy přiřadit vibračním vazeb C=C pro vlnové  $\sim 1520 \text{ cm}^{-1}$ , symetrické vibraci vazeb C-C a C-H pro vlnové  $\sim 1160 \text{ cm}^{-1}$  a vibraci skupiny  $-\text{CH}_3$  pro vlnové  $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$  [45].

V odborné literatuře byl publikován velmi malý posun vlnových u některých Ramanových pásů specifických pro  $\beta$ -karoten a lutein (viz kap. 5.2). Pomocí tohoto posunu vlnových bylo možné od sebe odlišit spektrum těchto dvou jinak strukturně podobných karotenoidů. Tento posun byl zaznamenán díky velmi nízkému spektrálnímu rozlišení zařízení použitého v této studii, které bylo 0,2 nm. Zařízení použité v této diplomové práci má spektrální rozlišení 3,5 nm, což zachycení tohoto rozdílu znemožňuje a proto se Ramanovy pásy  $\beta$ -karotenu a luteinu ve spektru překrývají.

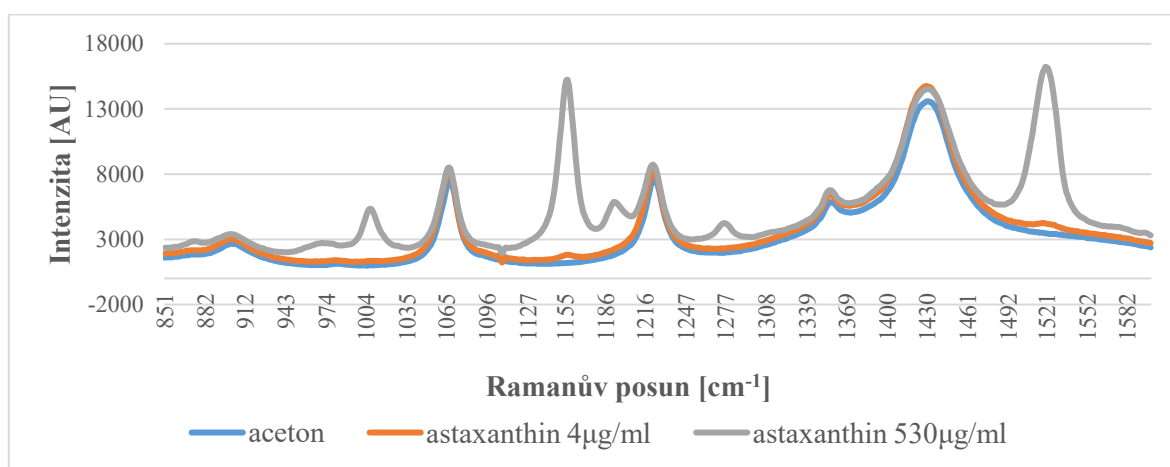
### 8.2.1 Měření Ramanových spekter vybraných standardů

Pro astaxanthin,  $\beta$ -karoten a zeaxanthin byly připraveny koncentrační řady jejich standardů v různém rozsahu koncentrací. Byla sledována intenzita Ramanova signálu při vybraných vlnových délkách v závislosti na koncentraci analytu. Standardy byly rozpuštěny v acetonu.

astaxanthin: 4/8/17/33/66/133/265/530  $\mu\text{g/ml}$

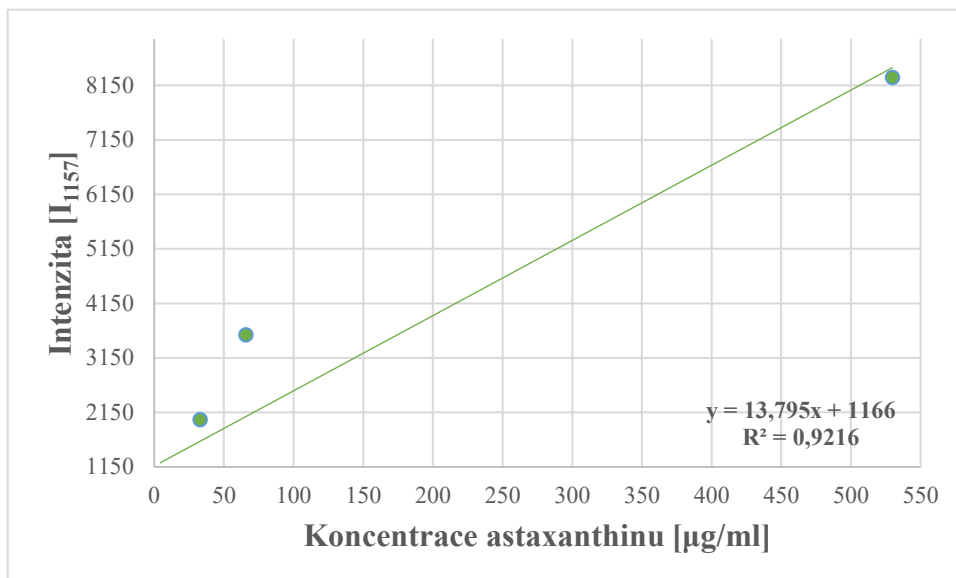
$\beta$ -karoten: 4/8/17/33/63/125/350  $\mu\text{g/ml}$

zeaxanthin: 33/63/125/350  $\mu\text{g/ml}$



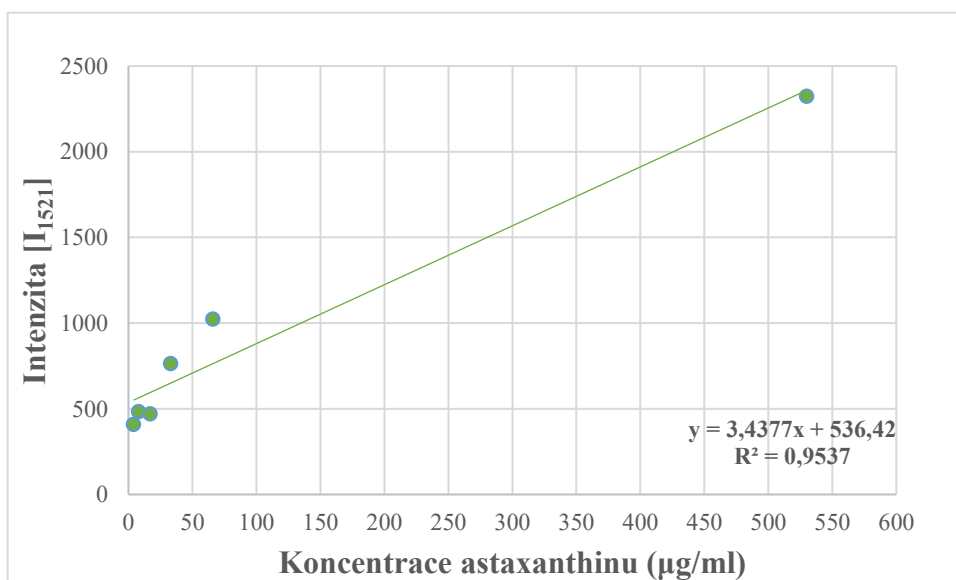
**Obrázek č. 17: Ramanovo spektrum astaxanthinu při různých koncentracích standardů**

Na obrázku č. 17 jsou znázorněna spektra standardu astaxanthinu pro dvě krajní koncentrace roztoků a to 4  $\mu\text{g/ml}$  a 530  $\mu\text{g/ml}$ . Pro vyhodnocení a porovnání s literaturou byla sledována změna intenzity Ramanova signálu pro vlnočty 1157  $\text{cm}^{-1}$  a 1521  $\text{cm}^{-1}$ , jelikož v těchto bodech nedochází k překryvu acetonu a astaxanthinu a Ramanovy pásy vykazují silnou intenzitu. Ramanův pás při vlnočtu 1157  $\text{cm}^{-1}$  odpovídá vibraci vazby C-H, dle srovnání s literaturou, ve které byla uvedena hodnota vlnočtu 1159  $\text{cm}^{-1}$ . Zjištěná hodnota vlnočtu 1521  $\text{cm}^{-1}$  odpovídá vibraci vazby C=C, v citované literatuře byla uvedena hodnota vlnočtu 1519  $\text{cm}^{-1}$  [38].



Obrázek č. 18: Závislost intenzity při 1157 cm<sup>-1</sup> pro astaxanthin

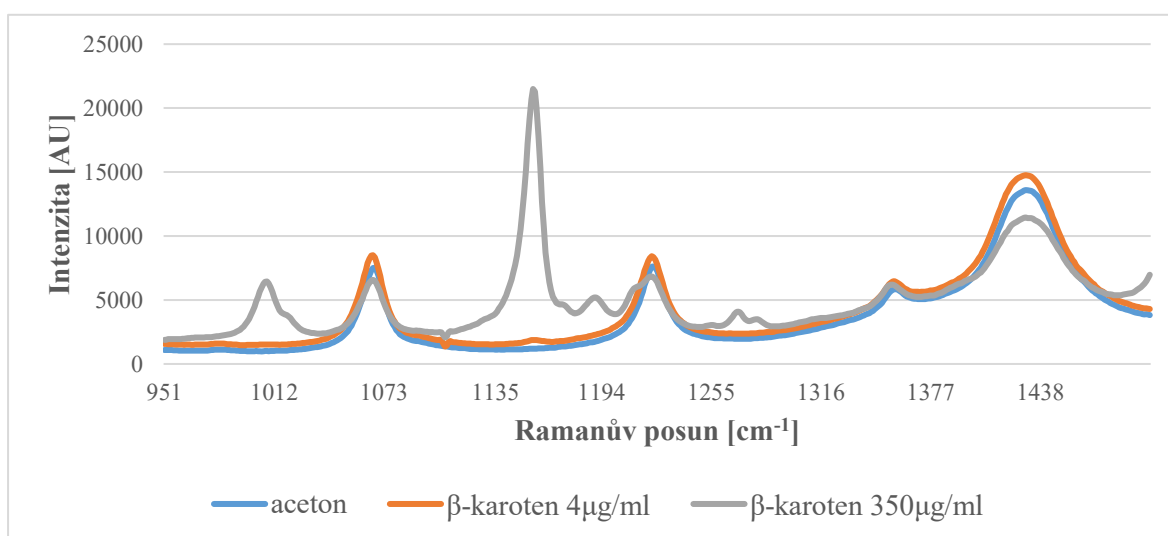
Na obrázku č. 18 je zobrazen graf závislosti intenzity Ramanova signálu astaxanthinu v acetonu pro hodnotu vlnočtu 1157 cm<sup>-1</sup> na koncentraci analytu. Pro její vynesení byly odstraněny odlehlé body koncentrací 133 a 265 µg/ml. Lineární rovnice přímky je ve tvaru  $y=13,795x + 1166$  a korelační koeficient činí 0,9216.



Obrázek č. 19: Závislost intenzity při 1521 cm<sup>-1</sup> pro astaxanthin

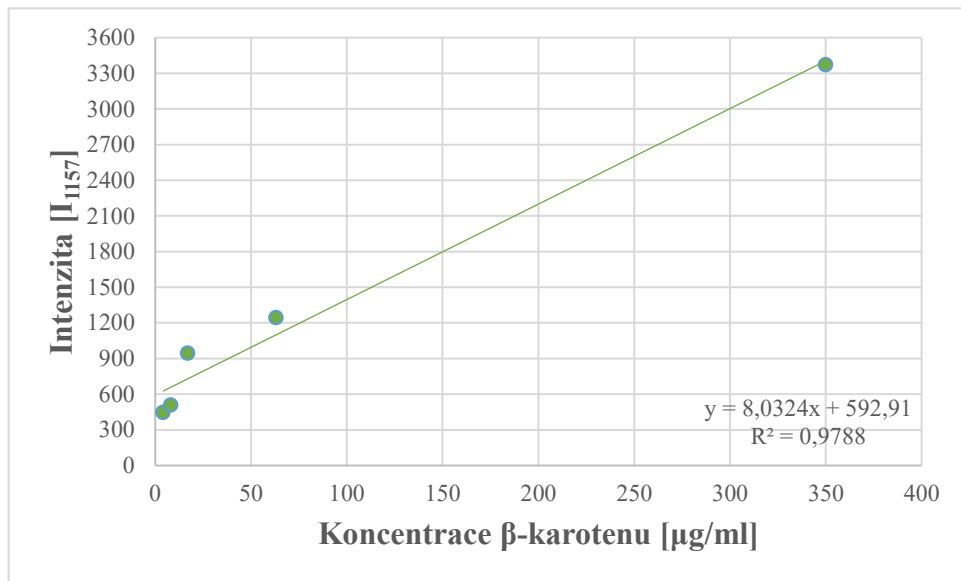
Na obrázku číslo 19 je zobrazena přímka závislosti intenzity Ramanova signálu při vlnočtu  $1521\text{ cm}^{-1}$  na koncentraci astaxanthinu. Pro její vynesení byly odstraněny odlehlé body koncentrací  $133$  a  $265\text{ }\mu\text{g/ml}$ . Lineární rovnice přímky je ve tvaru  $y = 3,4377x + 536,42$  a korelační koeficient má hodnotu  $0,9537$ .

Vyšší korelace intenzity Ramanova signálu s koncentrací astaxanthinu byla nalezena pro hodnoty vlnočtu  $1521\text{ cm}^{-1}$ , což odpovídá Ramanovu pásu přiřazovanému symetrické vibraci vazby C=C [38]



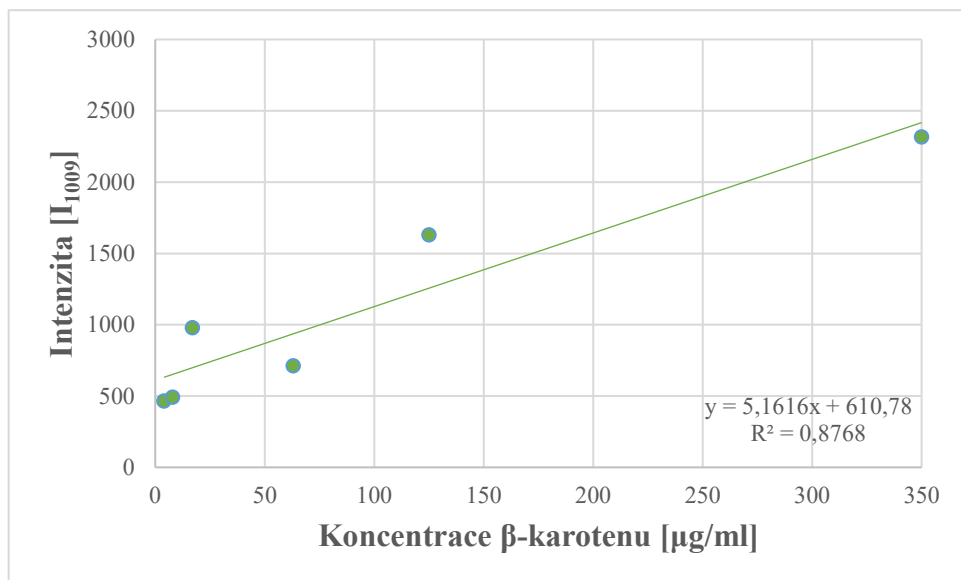
**Obrázek č. 20: Ramanovo spektrum  $\beta$ -karotenu při různých koncentracích standardů**

Na obrázku číslo 20 jsou znázorněna Ramanova spektra standardů  $\beta$ -karotenu pro dvě krajní hodnoty koncentrace  $4\text{ }\mu\text{g/ml}$  a  $350\text{ }\mu\text{g/ml}$ . Pro vyhodnocení a porovnání s odbornou literaturou byly použity píky při vlnočtech  $1009\text{ cm}^{-1}$  a  $1157\text{ cm}^{-1}$ . V těchto vybraných bodech nedochází k překryvu mezi acetonem a  $\beta$ -karotenem. Ramanův pás při hodnotě vlnočtu  $1009\text{ cm}^{-1}$  je přiřazován vibraci vazby C-CH<sub>3</sub> (v literatuře odpovídá hodnotě vlnočtu  $1006\text{ cm}^{-1}$ ). Pík při vlnočtu  $1157\text{ cm}^{-1}$  odpovídá vibraci vazby C-C, která měla dle dostupné studie polohu Ramanova pásu při vlnočtu  $1156\text{ cm}^{-1}$  [46].



Obrázek č. 21: Závislost intenzity při  $1157\text{ cm}^{-1}$  pro  $\beta$ -karoten

Na obrázku číslo 21 je znázorněn graf závislosti intenzity Ramanova pásu při hodnotě vlnočtu  $1157\text{ cm}^{-1}$  pro koncentrace  $\beta$ -karotenu v rozsahu  $4 - 350\text{ }\mu\text{g/ml}$ . Pro její vynesení byly odstraněny odlehlé hodnoty koncentrací  $33$  a  $125\text{ }\mu\text{g/ml}$ . Lineární rovnice přímky je ve tvaru  $y = 8,0324x + 592,91$  a korelační koeficient udává hodnotu  $0,9788$ .



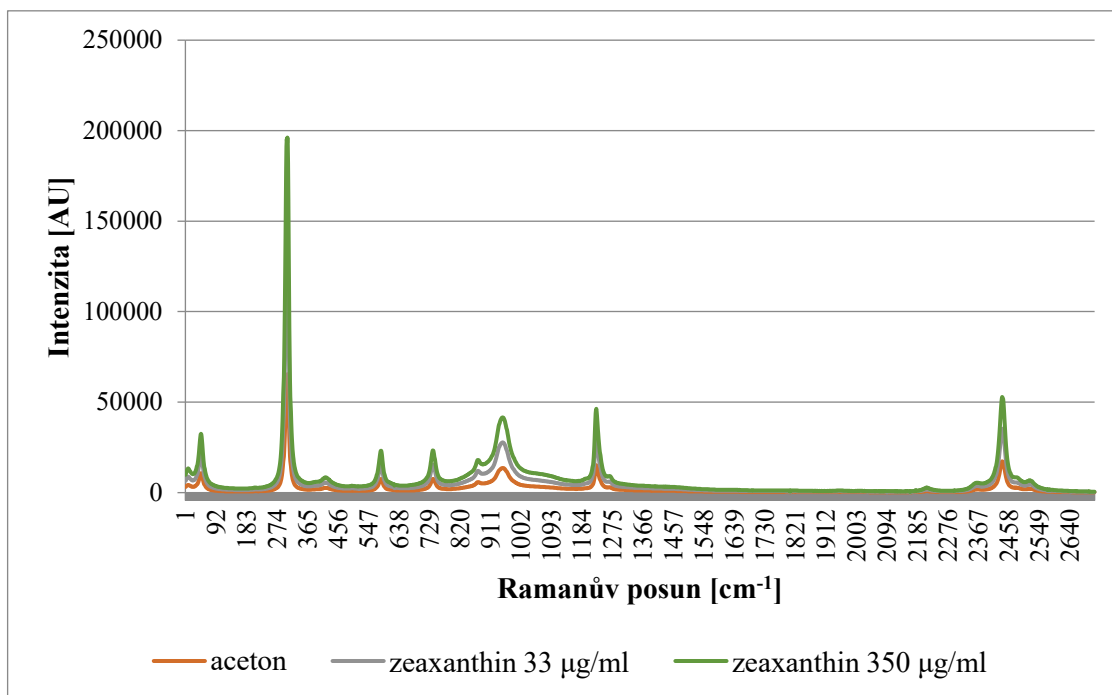
Obrázek č. 22: Závislost intenzity při  $1009\text{ cm}^{-1}$  pro  $\beta$ -karoten

Na obrázku číslo 22 je vynesena graf závislosti intenzity Ramanova pásu při hodnotě vlnočtu  $1009\text{ cm}^{-1}$  pro koncentrace  $\beta$ -karotenu v rozsahu  $4 - 350\text{ }\mu\text{g/ml}$ . Pro její vynesení



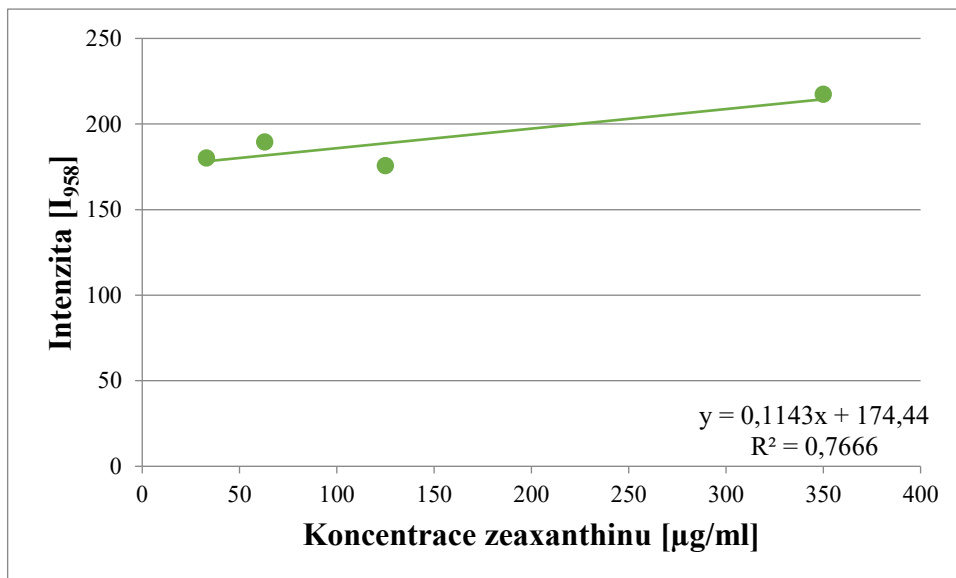
byl odstraněn odlehlý bod, který měl hodnotu koncentrace 33  $\mu\text{g/ml}$ . Lineární rovnice přímky má tvar  $y = 5,1616x + 610,78$  a korelační koeficient má hodnotu 0,8768.

Vyšší korelace intenzity Ramanova signálu s koncentrací  $\beta$ -karotenu byla nalezena pro hodnoty vlnočtu 1157  $\text{cm}^{-1}$ , což odpovídá Ramanovu pásu přiřazovanému symetrické vibraci vazby C–C. [38]



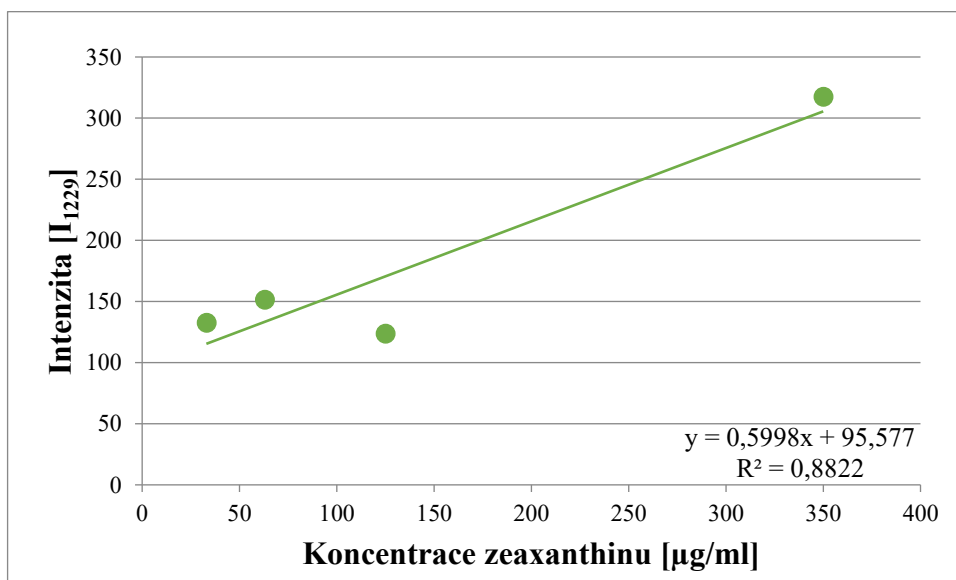
**Obrázek č. 23: Ramanovo spektrum zeaxanthinu při různých koncentracích standardů**

Na obrázku číslo 23 je zobrazeno Ramanovo spektrum zeaxanthinu pro koncentrace v rozsahu 33 – 350  $\mu\text{g/ml}$ . Pro vyhodnocení a porovnání s odbornou literaturou byly použity hodnoty vlnočtu 958  $\text{cm}^{-1}$  a 1229  $\text{cm}^{-1}$ . V těchto vybraných bodech nedochází k překryvu mezi acetonem a zeaxanthinem. Charakteristické píky pro zeaxanthin podle odborné studie jsou: 1000  $\text{cm}^{-1}$  (vibrace vazby  $\text{CH}_3$ ), 1160  $\text{cm}^{-1}$  (vibrace vazby C–C) a 1520  $\text{cm}^{-1}$  (vibrace vazby C=C) [45].



Obrázek č. 24: Závislost intenzity při 958 cm<sup>-1</sup> pro zeaxanthin

Na obrázku číslo 24 je vynesena graf závislosti intenzity Ramanova pásu při hodnotě vlnočtu 1009 cm<sup>-1</sup> pro koncentrace zeaxanthinu v rozsahu 33 – 350 µg/ml. Lineární rovnice přímky má tvar  $y = 0,1143x + 174,44$  a korelační koeficient má hodnotu 0,7666.



Obrázek č. 25: Závislost intenzity při 1229 cm<sup>-1</sup> pro zeaxanthin

Na obrázku číslo 25 je vynesena graf závislosti intenzity Ramanova pásu při hodnotě vlnočtu 1229 cm<sup>-1</sup> pro koncentrace zeaxanthinu v rozsahu 33 – 350 µg/ml. Lineární rovnice přímky má tvar  $y = 0,5998x + 95,577$  a korelační koeficient má hodnotu 0,8822.

Vyšší korelace intenzity Ramanova signálu s koncentrací zeaxanthinu byla nalezena pro hodnoty vlnočtu  $1229\text{ cm}^{-1}$ .

### 8.3 Výsledky stanovení chlorofylů spektrofotometricky

Pomocí metody UV/VIS spektrofotometrie bylo stanovováno množství chlorofylu a, chlorofylu b a celkový obsah chlorofylu.

**Tabulka č. 3: Výsledky stanovení průměrného obsahu chlorofylů ve vzorcích matcha čajů**

| <b>Stanovení obsahu chlorofylů ve vzorcích matcha čajů [<math>\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}</math>]</b> |                    |                    |                        |
|---|--------------------|--------------------|------------------------|
| <b>vzorek</b>   | <b>chlorofyl a</b> | <b>chlorofyl b</b> | <b>chlorofyl a + b</b> |
| V1  | $2,6\pm 0,4$       | $1,4\pm 0,2$       | $4,0\pm 0,6$           |
| V2  | $4,2\pm 0,7$       | $2,7\pm 0,5$       | $6,9\pm 1,0$           |
| V3  | $3,9\pm 0,6$       | $3,2\pm 0,5$       | $7,1\pm 1,1$           |
| V4  | $1,8\pm 0,3$       | $1,1\pm 0,2$       | $2,9\pm 0,5$           |

Jednotlivé výsledky koncentrací chlorofylu a i b byly přepočítány na obsah v sušině a jsou přehledně uvedeny v tabulce číslo 3. Nejvyšší koncentrace chlorofylu a byla stanovena u vzorku číslo 2 a 3, hodnota činila  $4,2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  pro vzorek číslo 2 a  $3,9\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  pro vzorek číslo 3. Naopak nejnižší hodnota chlorofylu a byla stanovena u vzorku číslo 4, hodnota koncentrace chlorofylu a činila  $1,8\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Nejvyšší koncentrace chlorofylu b byla stanovena u vzorku číslo 3, hodnota činila  $3,2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , naopak nejnižší hodnota koncentrace chlorofylu a i b, byla stanovena u vzorku číslo 4, hodnota koncentrace chlorofylu a činila  $1,8\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  a hodnota koncentrace chlorofylu b činila  $1,1\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Nejvyšší celková koncentrace chlorofylů a + b, byla stanovena ve vzorku číslo 3, hodnota činila  $7,1\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Z tabulky číslo 3 dále vyplývá, že je patrný rozdíl mezi původem matcha čaje, a to zejména u vzorku číslo 4, který pochází z Číny. Hodnoty jednotlivých koncentrací chlorofylů byly nižší než u vzorků číslo 1, 2 a 3, které pochází z Japonska. Pro srovnání byly vybrány hodnoty koncentrací chlorofylů u zelených a černých čajů, jejich hodnoty se pohybovaly v rozmezí  $0,2$  až  $1,9\text{ mg/l}$  [47].

Obsah chlorofylu v čaji matcha je výrazně vyšší než je tomu u běžných zelených čajů, což je dáno způsobem pěstování a velmi šetrnou technikou sklizně a zpracování čajových lístků.

## 8.4 Výsledky stanovení karotenoidů pomocí metody HPLC

Pomocí metody HPLC byl stanoven obsah karotenoidů –  $\beta$ -karotenu, zeaxanthinu, kantaxanthinu, trans- $\beta$ -apo-8'-karotenu a luteinu ve vzorcích matcha čajů. Kalibrační přímky  $\beta$ -karotenu, zeaxanthinu, kantaxanthinu a trans- $\beta$ -apo-8'-karotenu jsou uvedeny v přílohách diplomové práce (PI – PIV).

**Tabulka č. 4: Obsah karotenoidů ve vzorcích matcha čajů**

| Obsah karotenoidů ve vzorcích čaje matcha [ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ] |                  |                |               |                                  |               |
|---|------------------|----------------|---------------|----------------------------------|---------------|
| vzorek  | $\beta$ -karoten | zeaxanthin     | kantaxanthin  | trans- $\beta$ -apo-8'-karotenal | lutein        |
| V1  | 709 $\pm$ 35     | 67 $\pm$ 3,4   | 57 $\pm$ 2,8  | 10,3 $\pm$ 0,5                   | 155 $\pm$ 7,8 |
| V2  | 622 $\pm$ 31     | 203 $\pm$ 10,2 | 169 $\pm$ 8,5 | 7,5 $\pm$ 0,4                    | 200 $\pm$ 10  |
| V3  | 552 $\pm$ 28     | 119 $\pm$ 6,0  | 82 $\pm$ 4,1  | 7,1 $\pm$ 0,4                    | 137 $\pm$ 6,9 |
| V4  | 324 $\pm$ 16     | 5,7 $\pm$ 0,3  | 10 $\pm$ 0,5  | 2,8 $\pm$ 0,2                    | 22 $\pm$ 1,2  |

Z tabulky číslo 4 vyplývá, že nejvíce zastoupenými karotenoidy ve vzorcích matcha čaje jsou  $\beta$ -karoten a lutein, jejichž hodnoty se pohybují v rozmezí 324  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  až 709  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  pro  $\beta$ -karoten a v rozmezí 22  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  až 200  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  pro lutein. u vzorku číslo 4 byly naměřeny nejnižší hodnoty všech stanovovaných karotenoidů. Nejvyšší zastoupení luteinu a zeaxanthinu obsahuje vzorek číslo 2. Vzorek číslo 1 obsahuje nejvyšší množství trans- $\beta$ -apo-8'-karotenu a také  $\beta$ -karotenu. Celkově se dá konstatovat, že u japonských vzorků (V1, V2 a V3) je vyšší obsah karotenoidů než u vzorku čínského čaje matcha (V4). Toto zjištění odpovídá také informacím od dodavatele čajů, kteří v případě čajů V1 – V3 deklarují certifikáty ekologického zemědělství, což může souviset také se šetrnějšími podmínkami při zpracování čaje a tím také nižším stupněm degradace těchto látek. Pro čaj V4 výrobce takový certifikát nedokládá.

Pro srovnání s odbornou literaturou byla hodnota  $\beta$ -karotenu v zeleném čaji 495  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , což odpovídá rozmezí 324 až 709  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , které bylo naměřeno ve vzorcích čajů matcha. Naopak hodnota luteinu v zeleném čaji činila 893  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ve vzorcích matcha čajů se naměřené hodnoty pohybovaly v rozmezí 22 až 200  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Hodnota zeaxanthinu v zeleném čaji činila 39  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , hodnoty naměřené ve vzorcích matcha čajů se pohybovaly v rozmezí 5,7 až 203  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . [48]

Celkový obsah karotenoidů ve vzorku V1 byl  $998,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ve vzorku V2 byl  $1201,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ve vzorku V3 byl stanoven  $897,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  a ve vzorku V4 byl stanoven  $364,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Z toho vyplývá, že nejvyšší celkový obsah karotenoidů obsahoval vzorek číslo 2.

## 9 ZÁVĚR

Měření vzorků matcha čaje pomocí Ramanovy spektroskopie komplikovala výrazná luminiscence chlorofylu, která přehlušila Ramanův signál, a tudíž nebyla viditelná spektra jednotlivých barviv. Ramanova spektra byla změřena pro jednotlivé karotenoidy samostatně. Ve spektrech měřených karotenoidů ( $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, lutein, astaxanthin, kantaxanthin, zeaxanthin a lykopen) byly nalezeny intenzivní pásy při hodnotách vlnočtu  $1157\text{ cm}^{-1}$  a  $1521\text{ cm}^{-1}$  pro astaxanthin,  $1009\text{ cm}^{-1}$  a  $1157\text{ cm}^{-1}$  pro  $\beta$ -karoten a  $958\text{ cm}^{-1}$  a  $1229\text{ cm}^{-1}$  pro zeaxanthin, které jsou dle literatury přiřazovány vibracím vazby C-H ( $1159\text{ cm}^{-1}$ ), C=C ( $1519\text{ cm}^{-1}$ ) pro astaxanthin, C-CH<sub>3</sub> ( $1006\text{ cm}^{-1}$ ), C-C ( $1157\text{ cm}^{-1}$ ) pro  $\beta$ -karoten. Charakteristické píky pro zeaxanthin podle odborné studie jsou:  $1000$  (vibrace vazby CH<sub>3</sub>),  $1160$  (vibrace vazby C-C) a  $1520\text{ cm}^{-1}$  (vibrace vazby C=C).

Pro případnou kvantitativní analýzu byly u astaxanthinu,  $\beta$ -karotenu a zeaxanthinu proměřeny koncentrační řady těchto analytů a byla vyhodnocena závislost intenzity vybraných píků na jejich koncentraci. Nejvýznamnější korelace byla nalezena u astaxanthinu pro Ramanovy pásy s hodnotou vlnočtu  $1521\text{ cm}^{-1}$  odpovídající symetrické vibraci vazby C=C. U  $\beta$ -karotenu byla nalezena významná korelace intenzity Ramanova pásu s koncentrací standardu při vlnočtu  $1157\text{ cm}^{-1}$  odpovídající symetrické vibraci vazby C-C, a také korelace intenzity Ramanova pásu při hodnotě vlnočtu  $1009\text{ cm}^{-1}$ , který je přiřazován vibraci skupiny -CH<sub>3</sub>. U zeaxanthinu byly hodnoceny píky s vlnočtem  $946\text{ cm}^{-1}$  a  $1225\text{ cm}^{-1}$  s nízkou korelací.

Obsah celkového chlorofylu, včetně chlorofylu a a chlorofylu b, ve vzorcích matcha čajů byl stanoven spektrofotometricky po extrakci do acetonu. Obsah chlorofylů ve vzorcích japonských čajů matcha byl vyšší než u čínského čaje. Celkový obsah chlorofylu se pohyboval v rozmezí  $2,9 - 7,1\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , což jsou hodnoty vyšší, než jsou běžně udávány pro zelené čaje.

Pro stanovení obsahu karotenoidů byla v diplomové práci použita metoda HPLC. Pomocí této techniky byl zjištěn obsah  $\beta$ -karotenu, zeaxanthinu, kantaxanthinu, trans- $\beta$ -apo-8'-karotenalu a luteinu. Celkový obsah karotenoidů v matcha čajích se pohyboval v rozmezí  $364,5 - 1201,5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Nejvíce zastoupenými karotenoidy byly  $\beta$ -karoten a lutein, jejichž hodnoty se pohybovaly v rozmezí  $324\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  až  $709\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  pro  $\beta$ -karoten a v rozmezí  $22\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  až  $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  pro lutein. U tří matcha čajů, které pocházely z Japonska a měly od

výrobce uvedenou certifikaci (výrobek ekologického zemědělství), byly stanoveny vyšší hodnoty obsahu chlorofylu a karotenoidů než u čínského čaje matcha bez certifikátu.

Výhodou Ramanovy spektroskopie je buď žádná nebo jen v malé míře úprava vzorku, dále rychlost, přesnost a bezkontaktnost. Nevýhodou je slabý Ramanův signál a u řady vzorků (včetně zelených čajů) vybudení luminiscence, díky které dochází k šumu a překrytí charakteristických spekter měřených látek. Vyřešení tohoto problému by umožnilo konstrukci zařízení pro stanovení obsahu fotosyntetických barviv přímo v listech čajovníku, což by bylo výhodné pro rychlé a přesné hodnocení stupně zralosti čajových listů a pro usnadnění třídění čajových listů během sklizně a následného zpracování.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] CHEADLE, Louise a KILBY, Nick. Kniha o čaji matcha: vše, co jste o tomto úžasném zeleném superčaji chtěli vědět. Vydání první. Přeložil Lenka KŘIVÁNKOVÁ. Esence. Praha: Euromedia, 2017. ISBN 978-80-7549-284-5.
- [2] M. E. and Hirado, „The Introduction of the Rinzai school of Zen and Matcha tea to Japan“, 2016, s. 105–125.
- [3] Helen Saberi, *Tea: A Global History*, 2010, s 183, vydavatel: Reakcion
- [4] MITSCHER, Lester A. a DOLBY TOEWS, Victoria. Kniha o zeleném čaji: čínský pramen mládí : jak pomocí zeleného čaje předcházet rakovině a zpomalovat stárnutí. [Praha]: ZEMS, 2006. ISBN 80-903305-9-2.
- [5] AHMED, Selena a STEPP, John Richard. Green Tea. Online. In: *Tea in Health and Disease Prevention*. Elsevier, 2013, s. 19-31. ISBN 9780123849373. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384937-3.00002-1>. [cit. 2024-05-07].
- [6] PHUAH, Yi Qian; CHANG, Sui Kiat; NG, Wen Jie; LAM, Ming Quan a EE, Kah Yaw. A review on matcha: Chemical composition, health benefits, with insights on its quality control by applying chemometrics and multi-omics. Online. *Food Research International*. 2023, roč. 170. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113007>. [cit. 2024-05-07].
- [7] P. Seed a E. Techniques, „Popular Kheti“, roč. 1, č. 1, s. 162–163, 2014.
- [8] L. R. Juneja a M. P. Kapoor, *Green tea Polyphenols - Nutraceuticals of modern life*. 2010. ISBN 9781138199378
- [9] KOCHMAN, Joanna; JAKUBCZYK, Karolina; ANTONIEWICZ, Justyna; MRUK, Honorata a JANDA, Katarzyna. Health Benefits and Chemical Composition of Matcha Green Tea: A Review. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 1. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26010085>. [cit. 2024-05-07].
- [10] V. Mitić, V. Stankov Jovanović, M. Dimitrijević, J. Cvetković, G. Petrović, a G. Stojanović, „Chemometric Analysis of Chlorophyll a, b and Carotenoid Content in Green Leafy Vegetables“, *Biol. Nyssana*, roč. 4, č. 1–2, s. 49–55, 2013.
- [11] THAKUR, Abhishek. Health Promoting Phytochemicals in Vegetables: A Mini Review. Online. *International Journal of Food and Fermentation Technology*. 2018,



- roč. 8, č. 2. ISSN 22491570. Dostupné z: <https://doi.org/10.30954/2277-9396.02.2018.1>. [cit. 2024-05-07].
- [12] GULCIN, İlhami. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. Online. Archives of Toxicology. 2020, roč. 94, č. 3, s. 651-715. ISSN 0340-5761. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>. [cit. 2024-05-07]. "
- [13] Online. Dostupné z: [www.matchatea.cz](http://www.matchatea.cz). [cit. 2024-05-07].
- [14] SUKEMI, ; PRATUMYOT, Kornkanya; SRISUWANNAKET, Choladda; NIAMNONT, Nakorn a MINGVANISH, Withawat. Dyeing of cotton with the natural dye extracted from waste leaves of green tea ( *Camellia sinensis* var. *assamica* ). Online. Coloration Technology. 2019, roč. 135, č. 2, s. 121-126. ISSN 1472-3581. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/cote.12381>. [cit. 2024-05-07].
- [15] KOMES, Draženka; HORŽIĆ, Dunja; BELŠČAK, Ana; GANIĆ, Karin Kovačević a VULIĆ, Ivana. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. Online. Food Research International. 2010, roč. 43, č. 1, s. 167-176. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.022>. [cit. 2024-05-07].
- [16] MANDEL, Silvia A.; AVRAMOVICH-TIROSH, Yael; REZNICHENKO, Lydia; ZHENG, Hailin; WEINREB, Orly et al. Multifunctional Activities of Green Tea Catechins in Neuroprotection. Online. Neurosignals. 2005, roč. 14, č. 1-2, s. 46-60. ISSN 1424-862X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000085385>. [cit. 2024-05-07].
- [17] KOLÁČKOVÁ, Tereza; KOLOFIKOVÁ, Kateřina; SYTAŘOVÁ, Irena; SNOPEK, Lukáš; SUMCZYNSKI, Daniela et al. Matcha Tea: Analysis of Nutritional Composition, Phenolics and Antioxidant Activity. Online. Plant Foods for Human Nutrition. 2020, roč. 75, č. 1, s. 48-53. ISSN 0921-9668. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00777-z>. [cit. 2024-05-07].
- [18] Wangkarn, S.; Grudpan, K.; Khanongnuch, C.; Pattananandecha, T.; Apichai, S.; Saenjurn, C. Development of HPLC Method for Catechins and Related Compounds Determination and Standardization in Miang (Traditional Lanna Fermented Tea Leaf in Northern Thailand). *Molecules* 2021, 26, 6052. <https://doi.org/10.3390/molecules26196052>.

- [19] PASTORIZA, S.; MESÍAS, M.; CABRERA, C. a RUFÍAN-HENARES, J. A. Healthy properties of green and white teas: an update. Online. *Food & Function*. 2017, roč. 8, č. 8, s. 2650-2662. ISSN 2042-6496. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C7FO00611J>. [cit. 2024-05-07].
- [20] K. Kurlito, G. Kurowski, M. Malinowska, B. Laskowska, E. Sikora, a O. Vogt, „Wpływ warunków parzenia na zawartość antyoksydantów w naparach różnych rodzajów herbat / Influence of brewing conditions on antioxidant content in different kinds of tea infusions", *Wiadomości Chem.*, roč. 67, č. 11–12, s. 1130–1147, 2013.
- [21] ČÍŽKOVÁ, H.; VOLDŘICH, M.; MLEJNECKÁ, J. a KVASNIČKA, F. Authenticity evaluation of tea-based products. Online. *Czech Journal of Food Sciences*. 2008, roč. 26, č. 4, s. 259-267. ISSN 12121800. Dostupné z: <https://doi.org/10.17221/10/2008-CJFS>. [cit. 2024-05-07].
- [22] STEFANELLO, Naiara; SPANEVELLO, Roselia Maria; PASSAMONTI, Sabina; PORCIÚNCULA, Lisiane; BONAN, Carla Denise et al. Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. Online. *Food and Chemical Toxicology*. 2019, roč. 123, s. 298-313. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.005>. [cit. 2024-05-07].
- [23] NAVEED, Muhammad; HEJAZI, Veghar; ABBAS, Muhammad; KAMBOH, Asghar Ali; KHAN, Ghulam Jilany et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. Online. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018, roč. 97, s. 67-74. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>. [cit. 2024-05-07].
- [24] WENG, Chia-Jui a YEN, Gow-Chin. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. Online. *Cancer Treatment Reviews*. 2012, roč. 38, č. 1, s. 76-87. ISSN 03057372. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.03.001>. [cit. 2024-05-07].

- [25] JAKUBCZYK, Karolina; KOCHMAN, Joanna; KWIATKOWSKA, Aleksandra; KAŁDUŃSKA, Justyna; DEC, Karolina et al. Antioxidant Properties and Nutritional Composition of Matcha Green Tea. Online. *Foods*. 2020, roč. 9, č. 4. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods9040483>. [cit. 2024-05-07].
- [26] KUSMITA, Lia; PUSPITANINGRUM, Ika a LIMANTARA, Leenawaty. Identification, Isolation and Antioxidant Activity of Pheophytin from Green Tea (*Camellia Sinensis* (L.) Kuntze). Online. *Procedia Chemistry*. 2015, roč. 14, s. 232-238. ISSN 18766196. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.033>. [cit. 2024-05-07].
- [27] UNNO, Keiko; FURUSHIMA, Daisuke; HAMAMOTO, Shingo; IGUCHI, Kazuaki; YAMADA, Hiroshi et al. Stress-Reducing Function of Matcha Green Tea in Animal Experiments and Clinical Trials. Online. *Nutrients*. 2018, roč. 10, č. 10. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu10101468>. [cit. 2024-05-07].
- [28] GREISINGER, Sabine; JOVANOVSKI, Stefan a BUCHBAUER, Gerhard. An Interesting Tour of New Research Results on Umami and Umami Compounds. Online. *Natural Product Communications*. 2016, roč. 11, č. 10. ISSN 1934-578X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1934578X1601101040>. [cit. 2024-05-07].
- [29] M. Šivel, B. Klejdus, S. Kráčmar, a V. Kubáň, „Utein - Významný karotenoid ve výživě člověka“, *Chem. List.*, roč. 107, č. 6, s. 456–463, 2013.
- [30] M. Benore, A. Ninfa, a D. Ballou, *Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology 2nd Edition*. John Wiley & Sons, 2009
- [31] QU, Fang; GONG, Nan; WANG, Shenghan; GAO, Yue; SUN, Chenglin et al. Effect of pH on fluorescence and absorption of aggregates of chlorophyll a and carotenoids. Online. *Dyes and Pigments*. 2020, roč. 173. ISSN 01437208. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107975>. [cit. 2024-05-07].
- [32] Cvet M.: *Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci., Biol. Sec.* 14 (1903); *Ber. Deut. Botan. Ges.* 24, 316 (1906)

- [33] VIGDERGAUZ, M. S. Chromatography in the nature. Online. Chromatographia. 1978, roč. 11, č. 3, s. 119-122. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF02261678>. [cit. 2024-05-07].
- [34] LIN, Xiaohui a SUN, Da-Wen. Recent developments in vibrational spectroscopic techniques for tea quality and safety analyses. Online. Trends in Food Science & Technology. 2020, roč. 104, s. 163-176. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.009>. [cit. 2024-05-07].
- [35] GUPTA, Shilpi; HUANG, Chung Hao; SINGH, Gajendra Pratap; PARK, Bong Soo; CHUA, Nam-Hai et al. Portable Raman leaf-clip sensor for rapid detection of plant stress. Online. Scientific Reports. 2020, roč. 10, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76485-5>. [cit. 2024-05-07].
- [36] Gordon G. Hammes, *Spectroscopy for the Biological Sciences*. 2005. ISBN 978-0-471-73354-6
- [37] GARDINER, Derek J. a GRAVES, Pierre R. (ed.). Practical Raman Spectroscopy. Online. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1989. ISBN 978-3-540-50254-8. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-74040-4>. [cit. 2024-05-07].
- [38] ZENG, Jianjun; PING, Wen; SANAEIFAR, Alireza; XU, Xiao; LUO, Wei et al. Quantitative visualization of photosynthetic pigments in tea leaves based on Raman spectroscopy and calibration model transfer. Online. Plant Methods. 2021, roč. 17, č. 1. ISSN 1746-4811. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00704-3>. [cit. 2024-05-07].
- [39] ZHANG, Yingying; GAO, Wanjun; CUI, Chuanjian; ZHANG, Zhengzhu; HE, Lili et al. Development of a method to evaluate the tenderness of fresh tea leaves based on rapid, in-situ Raman spectroscopy scanning for carotenoids. Online. Food Chemistry. 2020, roč. 308. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125648>. [cit. 2024-05-07].
- [40] FENG, Lin; GAO, Ming-Jun; HOU, Ru-Yan; HU, Xiao-Yi; ZHANG, Liang et al. Determination of quality constituents in the young leaves of albino tea cultivars. Online. Food Chemistry. 2014, roč. 155, s. 98-104. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.044>. [cit. 2024-05-07].

- [41] Introductory Raman Spectroscopy. Online. Elsevier, 1994. ISBN 9780122539909. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/C2009-0-21238-4>. [cit. 2024-05-07].
- [42] ČSN ISO 2171 (461019), Obiloviny, luštěniny a výrobky z nich - Stanovení obsahu popela spalováním. 2023.
- [43] PORRA, Robert J. Online. Photosynthesis Research. Roč. 73, č. 1/3, s. 149-156. ISSN 01668595. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/A:1020470224740>. [cit. 2024-05-07].
- [44] KOLÁČKOVÁ, Tereza; SUMCZYNSKI, Daniela; BEDNAŘÍK, Vratislav; VINTER, Štěpán; ORSAVOVÁ, Jana et al. Mineral and trace element composition after digestion and leaching into matcha ice tea infusions (*Camellia sinensis* L.). Online. Journal of Food Composition and Analysis. 2021, roč. 97. ISSN 08891575. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103792>. [cit. 2024-05-07].
- [45] UDENSI, Joy; LOUGHMAN, James; LOSKUTOVA, Ekaterina a BYRNE, Hugh J. Raman Spectroscopy of Carotenoid Compounds for Clinical Applications—A Review. Online. Molecules. 2022, roč. 27, č. 24. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27249017>. [cit. 2024-05-07].
- [46] NIKELSHPARG, Evelina I.; BRATASHOV, Daniil N.; NIKELSHPARG, Matvey I. a ANIKIN, Vasily V. Fate of carotenoids in the closed living system of gall–gall wasp–parasitoid. Online. Chemoecology. 2022, roč. 32, č. 1, s. 31-40. ISSN 0937-7409. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00049-021-00364-2>. [cit. 2024-05-07].
- [47] KRÁLOVÁ, Marie. Úprava vzorků čajových extraktů získaných metodou ASE. Diplomová práce. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014.
- [48] SHI, Jiang; WU, Wenliang; ZHANG, Yongcheng; BALDERMANN, Susanne; PENG, Qunhua et al. Comprehensive analysis of carotenoids constituents in purple-coloured leaves and carotenoid-derived aroma differences after processing into green, black, and white tea. Online. LWT. 2023, roč. 173. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114286>. [cit. 2024-05-07].
- [49] Biochemie - vzdělávací portál. Online. TEPLÁ, Milada. Biochemie - vzdělávací portál. 2013. Dostupné z: <http://www.studiumbiochemie.cz/>. [cit. 2024-05-07].
- [50] Herbalus. Online. HOFFMANNOVÁ, Tereza. Herbalus. 2024. Dostupné z: <https://www.herbalus.cz/blog/5457608-beta-karoten-neboli-provitamin-a-zdroje->

- ucinky-kontraindikace. [cit. 2024-05-07].
- [51] Herb-key. Online. Herb-key. 2024. Dostupné z: <https://www.gmp-factory.com/>. [cit. 2024-05-07].
- [52] HPLC stanovení luteinu, zeaxanthinu a betakarotenu v potravních doplňcích. Rigorózní práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2010.
- [53] RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Food Carotenoids. Online. Wiley, 2015. ISBN 9781118733301. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118864364>. [cit. 2024-05-07].
- [54] KARLÍČEK, Rolf. Analytická chemie pro farmaceuty. 2. vyd. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Univerzita Karlova, 2001. ISBN 80-246-0348-9.
- [55] COUFAL, Pavel. HPLC. Online. HPLC. 1996. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>. [cit. 2024-05-07].

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

BHT – Butylhydroxytoluen

IR – Infračervené záření

IINS – Neelastický nekoherentní rozptyl neutronů

MSC – multiplicative scatter correction

WT – wavelet transform

SNV – standard normal variate

RCF – rolling-circle filter

airPLS – adaptive iteratively reweighted penalized least squares

CARS – competitive adaptive re-weighted algorithm

## SEZNAM OBRÁZKŮ

|  |    |
|--|----|
| Obrázek č. 1: Proces výroby matcha čaje [6] .....  | 12 |
| Obrázek č. 2: Sklizeň čaje matcha [13] .....   | 13 |
| Obrázek č. 3: Matcha čaj[13] .....   | 14 |
| Obrázek č. 4: Vzorce chlorofylů a, b [49] .....  | 15 |
| Obrázek č. 5: Vzorec $\beta$ -karotenu [50] .....  | 17 |
| Obrázek č. 6: Vzorec lykopenu [51] .....   | 17 |
| Obrázek č. 7: Vzorec luteinu [52] .....  | 17 |
| Obrázek č. 8: Vzorec zeaxanthinu [53] .....  | 17 |
| Obrázek č. 9: Vzorec molekuly theaninu[13] .....   | 22 |
| Obrázek č. 10: Charakteristická absorpční maxima chlorofylu a, b [54] .....                  | 24 |
| Obrázek č. 11: Lambert-Beerův zákon [54] .....   | 25 |
| Obrázek č. 12: Schéma HPLC [55] .....  | 26 |
| Obrázek č. 13: Charakteristické vlnočty pro chlorofyly a karotenoidy [38] .....              | 29 |
| Obrázek č. 14: Přenosný přístroj iRaman Plus .....   | 37 |
| Obrázek č. 15: Připravené nařaděné standardy karotenoidů .....                               | 38 |
| Obrázek č. 16: Ramanova spektra standardů karotenoidů .....                                  | 44 |
| Obrázek č. 17: Ramanovo spektrum astaxanthinu při různých koncentracích standardů .....      | 45 |
| Obrázek č. 18: Závislost intenzity při $1157\text{ cm}^{-1}$ pro astaxanthin .....           | 46 |
| Obrázek č. 19: Závislost intenzity při $1521\text{ cm}^{-1}$ pro astaxanthin .....           | 46 |
| Obrázek č. 20: Ramanovo spektrum $\beta$ -karotenu při různých koncentracích standardů ..... | 47 |
| Obrázek č. 21: Závislost intenzity při $1157\text{ cm}^{-1}$ pro $\beta$ -karoten .....      | 48 |
| Obrázek č. 22: Závislost intenzity při $1009\text{ cm}^{-1}$ pro $\beta$ -karoten .....      | 48 |
| Obrázek č. 23: Ramanovo spektrum zeaxanthinu při různých koncentracích standardů .....       | 49 |
| Obrázek č. 24: Závislost intenzity při $958\text{ cm}^{-1}$ pro zeaxanthin .....             | 50 |
| Obrázek č. 25: Závislost intenzity při $1229\text{ cm}^{-1}$ pro zeaxanthin .....            | 50 |



**SEZNAM TABULEK**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabulka č. 1: Koncentrace standardů karotenoidů v acetonu (µg/ml).....</b>                           | <b>38</b> |
| <b>Tabulka č. 2: Výsledky stanovení průměrného obsahu popela a sušiny ve vzorcích matcha čajů .....</b> | <b>42</b> |
| <b>Tabulka č. 3: Výsledky stanovení průměrného obsahu chlorofylů ve vzorcích matcha čajů .....</b>      | <b>51</b> |
| <b>Tabulka č. 4: Obsah karotenoidů ve vzorcích matcha čajů.....</b>                                     | <b>52</b> |

**SEZNAM PŘÍLOH**

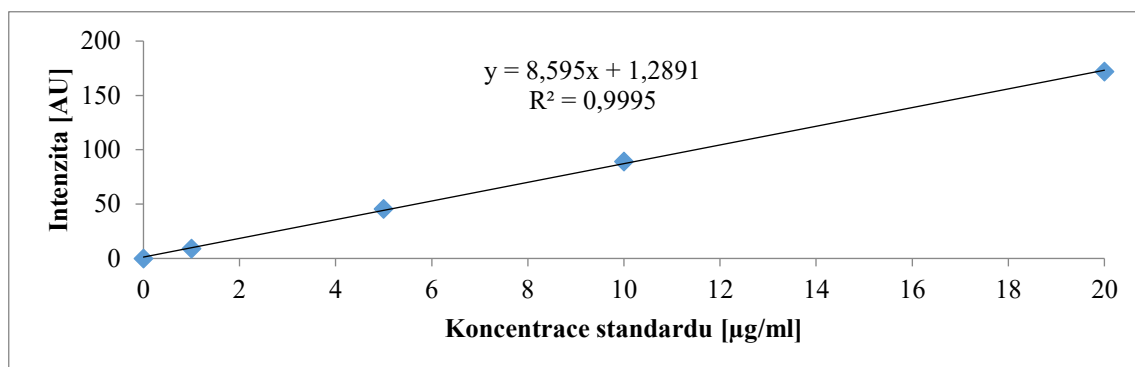
Příloha P1: Kalibrační přímka standardu  $\beta$ -karotenu pro metodu HPLC

Příloha P2: Kalibrační přímka standardu zeaxanthinu pro metodu HPLC

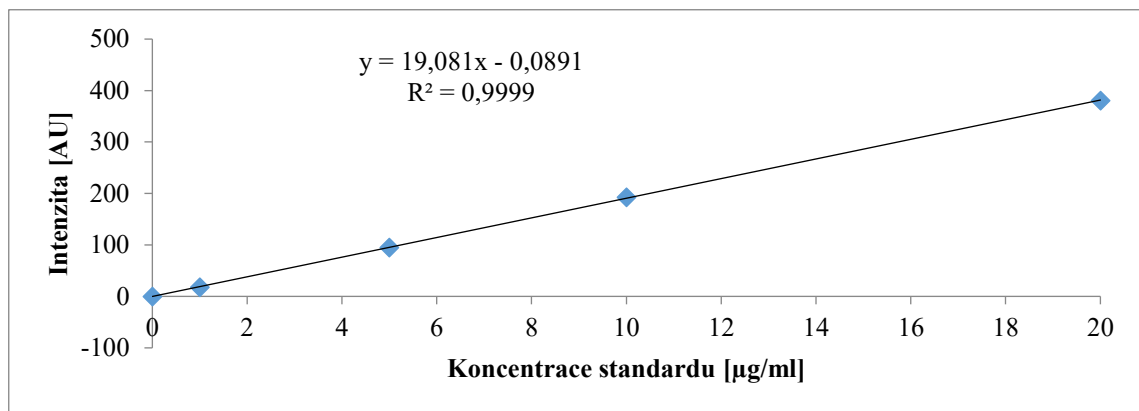
Příloha P3: Kalibrační přímka standardu kantaxanthinu pro metodu HPLC

Příloha P4: Kalibrační přímka standardu trans- $\beta$ -apo-8'-karotenu pro metodu HPLC

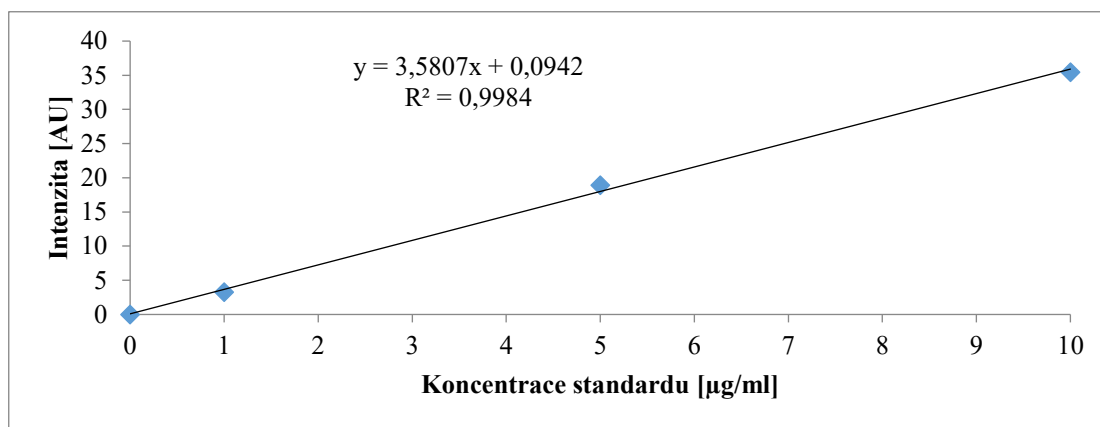
## PŘÍLOHA P1: KALIBRAČNÍ PŘÍMKA STANDARDU B-KAROTENU PRO METODU HPLC



## PŘÍLOHA P2: KALIBRAČNÍ PŘÍMKA STANDARDU ZEAXANTHINU PRO METODU HPLC



### PŘÍLOHA P3: KALIBRAČNÍ PŘÍMKA STANDARDU KANTAXANTHINU PRO METODU HPLC



## PŘÍLOHA P4: KALIBRAČNÍ PŘÍMKA TRANS-B-APO-8'- KAROTENALU METODY HPLC

