

Antioxidační aktivita a obsah polyfenolů v extraktech meduňky a hluchavky

Bc. Jitka Gajárková

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. Jitka Gajárková
Osobní číslo: T22413
Studijní program: N0721A210004 Technologie potravin
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Antioxidační aktivita a obsah polyfenolů v extraktech meduňky a hluchavky

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

Charakteristika meduňky a hluchavky, jejich složení, vlastnosti.

Antioxidanty, zástupci, zdroje a působení.

Přehled metod využívaných pro stanovení obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity.

II. Praktická část

Stanovení antioxidační aktivity extraktů meduňky a hluchavky s různými podmínkami extrakce pomocí spektrometrických metod.

Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu polyfenolů extraktů meduňky a hluchavky s různými podmínkami extrakce.

Stanovení vybraných fenolických sloučenin v extraktech meduňky a hluchavky metodou HPLC s UV detekcí.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Miraj, S., Rafeian-Kopaei, Kiani, S. *Melissa officinalis* L: A Review Study With an Antioxidant Prospective. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* 2017, 22, 385-394
- [2] Salehi, B., Armstrong, L., Rescigno, A., et al. *Lamium* Plants-A Comprehensive Review on Health Benefits and Biological Activities. *Molecules.* 2019, 24, 1913
- [3] Velišek, J., Hajšlová, J. *Chemie potravin II. Tábor: Osis, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9*
- [4] Yashin, A., Yashin, Y., Xia, X., Nemzer, B. Antioxidant Activity of Spices and Their Impact on Human Health: A Review. *Antioxidants (Basel),* 2017, 6, 70-88

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Soňa Škrovánková, 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 AUTORKY 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 pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

V teoretické části diplomové práce je charakterizována meduňka lékařská a hluchavka bílá, jejich vlastnosti a složení, dále popis antioxidantů a metod využívaných k jejich stanovení. Praktická část se zabývá stanovením celkového obsahu polyfenolických látek a analýzou vybraných fenolických látek v extraktech meduňky a hluchavky metodou HPLC s DAD detekcí. Také byla určena antioxidační aktivita spektrofotometrickými metodami s DPPH (IC₅₀) a ABTS v závislosti na dvou extrakčních teplotách při přípravě extraktů meduňky a hluchavky.

Klíčová slova: meduňka, hluchavka, polyfenoly, antioxidační aktivita, DPPH, ABTS, HPLC

ABSTRACT

In the theoretical part of the diploma thesis, lemon balm and white nettle are characterized as well as their properties and characteristics of antioxidants and the methods used for their evaluation. The practical part deals with the determination of the content of polyphenolic substances and the analysis of selected phenolic compounds in extracts of lemon balm and white nettle by the HPLC with DAD detector. Antioxidant activity was determined using spectrophotometric methods with DPPH (IC₅₀) and ABTS depending on two extraction temperatures in the lemon balm and white nettle extracts preparation.

Keywords: lemon balm, white nettle, polyphenols, antioxidant activity, DPPH, ABTS, HPLC

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce doc. Ing. Soně Škrovánkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a pomoc při zpracování této práce.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 CHARAKTERISTIKA ROSTLIN ČELEDI HLUCHAVKOVITÉ (LAMIACEAE).....	11
1.1 MEDUŇKA LÉKAŘSKÁ	11
1.1.1 Chemické složení	12
1.1.2 Biologické účinky	12
1.2 HLUCHAVKA BÍLÁ	13
1.2.1 Chemické složení	14
1.2.2 Biologické účinky	14
2 ANTIOXIDANTY	15
2.1 FENOLOVÉ SLOUČENINY	15
2.1.1 Kyselina rozmarýnová	16
2.1.2 Kyselina kávová	17
2.1.3 Kyselina protokatechová.....	17
2.1.4 Mechanismus působení fenolových sloučenin.....	18
2.2 FLAVONOIDY	19
2.2.1 Kvercetin a kvercitrin.....	20
2.2.2 Luteolin	20
3 METODY VYUŽÍVANÉ PRO STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍCH VLASTNOSTÍ	21
3.2 METODA DPPH.....	22
3.3 METODY STANOVENÍ OBSAHU POLYFENOLICKÝCH LÁTEK	23
3.3.1 Stanovení obsahu polyfenolických látek s Folin-Ciocalteuovým čínidlem.....	23
3.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	23
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	25
4 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	26
5 MATERIÁL A PŘÍSTROJE.....	27
5.2 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	28
5.3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	28
6 METODIKA STANOVENÍ.....	30
6.1 PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ ROSTLIN.....	30
6.2 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POMOCÍ METODY ABTS	30
6.2.1 Kalibrační křivka troloxu u metody ABTS	31
6.3 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POMOCÍ METODY DPPH.....	32
6.3.1 Kalibrační křivka troloxu u metody DPPH.....	33

6.3.2	IC ₅₀ stanovení.....	34
6.4	STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU POLYFENOLŮ S FOLIN-CIOCALTEUOVÝM ČINIDLEM	34
6.4.1	Kalibrační křivka standardu kyseliny gallové.....	35
6.5	STANOVENÍ VYBRANÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK METODOU HPLC/DAD.....	35
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
7.1	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU ABTS.....	38
7.1.1	Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS extraktů meduňky.....	38
7.1.2	Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS extraktů hluchavky.....	40
7.2	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU DPPH.....	41
7.3	STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU POLYFENOLŮ S FOLIN-CIOCALTEUOVÝM ČINIDLEM	49
7.3.1	Stanovení celkového obsahu polyfenolů extraktů meduňky.....	49
7.3.2	Stanovení celkového obsahu polyfenolů extraktů hluchavky.....	52
7.4	KORELAČNÍ ANALÝZA	53
7.5	STANOVENÍ VYBRANÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK METODOU HPLC/DAD.....	56
8	ZÁVĚR.....	61
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	63
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	68
	SEZNAM OBRÁZKŮ	69
	SEZNAM TABULEK.....	71
	SEZNAM PŘÍLOH.....	72

ÚVOD

Rostliny meduňka lékařská (*Melissa officinalis*) a hluchavka bílá (*Lamium album*), patří do čeledi hluchavkovitých. Jedná se o vytrvalé rostliny, především keře nebo byliny s aromatickými sloučeninami (silice) v listech nebo květech.

V současnosti se rostliny konzumují v podobě nálevů, jako potravinové doplňky nebo jako součást potravin a pokrmů v rámci teplé i studené kuchyně. Využívá se několik částí těchto rostlin jako jsou nať, list i květ, a to v sušené i čerstvé formě.

Tyto rostliny obsahují významné biologické látky, a to především fenolické látky jako kyselina rozmarýnová, kávová, protokatechová, vanilová, chlorogenová, *p*-kumarová a ferulová kyselina a také flavonoidy jako kvercetin, kvercitrin a luteolin. Tyto biologicky účinné látky působí v organismu antioxidačně, protizánětlivě, antivirově nebo antimikrobiálně.

Některé složky těchto rostlin vykazují antioxidační účinky, jsou to antioxidanty. Antioxidanty jsou látky působící proti volným radikálům, zpomalující nebo zastavující oxidaci (v potravinách mohou chránit lipidy, mastné kyseliny před oxidací). Jednotlivé rostliny obsahují různé množství jednotlivých fenolických sloučenin, přičemž každá z těchto sloučenin má různě silný antioxidační potenciál a projevuje tedy různou účinnost. Odlišnosti v obsahu jednotlivých složek v rostlině a v antioxidační aktivitě rostlin mohou být způsobeny i dalšími faktory, jako jsou různé klimatické, geografické a agronomické podmínky, dále dle doby sklizně nebo vzhledem k postupu při získávání extraktů a samotnému stanovení.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA ROSTLIN ČELEDI HLUCHAVKOVITÉ (*LAMIACEAE*)

Čeď hluchavkovité je široká skupina kvetoucích rostlin, zahrnuje asi 250 rodů, které mají až 7 852 druhových jmen. Rostliny této čeledi jsou obvykle keře nebo byliny s aromatickými sloučeninami (silice) v listech nebo květech. Poznávacím znakem této čeledi je tvar stonku, rysy listů a shluky květů. Z hlediska ekologie jsou tyto rostliny důležité pro jejich samosprašnost, a jako útočiště hmyzů. Do čeledi hluchavkovité patří rostliny z rodu *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Plectranthus*, *Hyptis*, *Teucrium*, *Vitex*, *Thymus*, *Lamium*, *Melissa* a *Nepeta*. Významné biologické látky těchto rostlin působí antioxidačně, protizánětlivě, antivirově nebo antimikrobiálně. Většina druhů z čeledi hluchavkovité je spojena s jejich hlavními složkami, kterými jsou fenolické látky a silice. K nejvýznamnějším sloučeninám rostlin této čeledi se řadí kyselina hydroxyskořicová, terpenoidy (iridoity a sekoiridoity), flavonoidy nebo antokyaniny [1, 2].

1.1 Meduňka lékařská

Meduňka lékařská, *Melissa officinalis* L. (obr. 1) je vytrvalá rostlina patřící do čeledi hluchavkovité a rodu meduňka. Existují tři známe poddruhy z oblasti Středomoří *M. officinalis* subsp. *officinalis*, *M. officinalis* subsp. *inodora* a *M. officinalis* subsp. *altissima*. Meduňka lékařská je původem z Evropy, Střední Asie a Íránu, nyní je rozšířená po celém světě. Roste v písčitéch, křovinatých oblastech, objevuje se jak v nízkých, tak ve vysokých nadmořských výškách. Rostlina se obvykle dorůstá výšky od 30 do 125 cm, květy jsou bílé nebo světle růžové, jsou seskupeny do shluků po 4-12 květech. Stonek je vzpřímený, rozvětvený, obvykle lysý a čtyřhranný. Listy jsou vejčité a řapíkaté o délce cca 6 cm a šířce 3 cm. Semena meduňky lékařské jsou tmavě hnědé nebo černé barvy. Přizpůsobuje se odlišným klimatickým podmínkám díky vlasatému kořenovému systému. Tradičně se meduňka používala na uklidnění, trávení, křeče, pro gastrointestinální poruchy a analgetické účinky. V Evropě se nálev z meduňky používá k léčbě běžného nachlazení, horečky a kašle, také jako mírné sedativum k léčbě bolesti hlavy, migrény, nervového napětí nebo nespavosti. Listy meduňky se v gastronomii používají jako kořenící rostlina do salátů nebo zeleninových polévek v čerstvém, nebo suchém stavu [3, 4, 5].



Obrázek 1 Rostlina Meduňka lékařská [6]

1.1.1 Chemické složení

Chemické složení rostliny se může lišit podle klimatických, sezónních a geografických podmínek, dále dle doby sklizně a postupu při získávání extraktů. Listy meduňky lékařské obsahují flavonoidy jako je kvercitrin, rhamnocitrin a luteolin, dále fenolické sloučeniny a z nich hlavně kyselinu rozmarýnovou, kávovou a protokatechovou. Rostlina také obsahuje terpeny jako kyselina ursolová nebo oleanolová, a silici obsahující složku citral. Silice získaná z této rostliny má citronovou vůni a žlutou barvu. Silici meduňky lze získat chemickou extrakcí nebo destilací vodní parou z části rostliny květ, list i nať. V meduňce byla zjištěna silice, která obsahovala citronelal (14,4 %), isogeranoil (6,4 %), geranyl acetát (10,2 %), neryl acetát (5,1 %), karyofylen (8,1 %) a karyofylen oxid (11 %). Složení silice se liší podle klimatických, sezónních a geografických podmínek, doby sklizně a postupů použité destilační techniky [3, 4, 7, 8].

1.1.2 Biologické účinky

Jako významné biologické účinky meduňky byly zjištěny antioxidační, hypoglykemické, hypolipidemické, antimikrobiální, protirakovinné a antidepressivní účinky. Silice z meduňky má protizánětlivé účinky, aplikuje se při nemocech spojených se zánětem a bolestí. Extrakty z této rostliny prokázali působení na širokou škálu gram pozitivních a gram negativních

bakterií i některých hub. Extrakt z meduňky má schopnost působit na volné radikály, je schopen pohlcovat širokou škálu těchto syntetických a přirozeně se vyskytujících volných radikálů. Antioxidační účinek byl vysvětlen dvěma mechanismy, a to vychytáváním volných radikálů jako peroxy- a alkoxylových radikálů, kdy dojde k přerušení řetězové reakce, a rozklad vzniklých hydroperoxidů [3, 4, 9, 10].

Bylo prokázáno že extrakt může zabránit oxidaci lipidových složek v buněčných membránách, působí proti superoxidovému aniontovému radikálu a proti radikálu oxidu dusného [9].

1.2 Hluchavka bílá

Hluchavka bílá, *Lamium album* L. (obr. 2) je vytrvalá rostlina patřící do čeledi hluchavkovité a rodu hluchavka. Tento rod zahrnuje asi 40 druhů, kromě *L. album* jsou známe *L. purpureum*, *L. maculatum* a *L. garganicum* [11].

Hluchavka bílá je původem z Evropy, Asie a severní Afriky. Rostlina je 50-100 cm vysoká, stonek je v průřezu obdélníkový, její listy jsou srdčité nebo vejčité s pilovým okrajem. Květy jsou bílé nebo krémově bílé, dvoulisté s 19–21 mm dlouhou dvoupyskou korunou, ta je delší než kalich. Vyrůstají z paždí listů v horní části stonku v počtu 5-22 květů. Nadzemní části rostlin jsou hustě pokryty žláznatými i nežláznatými trichomy. Její části nať, list i květ jsou jedlé. V tradiční medicíně se hluchavka používala na záněty, trauma, hypertenzi, děložní krvácení a při bolesti. V některých zemích se hluchavka používala jako potravina proti hladomoru a v Evropě, Číně a Japonsku jako složka alternativní výživy. V současnosti se rostlina běžně používá do omelet, k dušenému a pečenému masu. Pro své farmakologické účinky se konzumuje v podobě nálevu a také jako potravinový doplněk. Rod *Lamium* je zdrojem především fenolových kyselin a flavonoidů [12, 13].



Obrázek 2 Rostlina Hluchavka bílá [14]

1.2.1 Chemické složení

Hluchavka bílá obsahuje fenypropanoidy, flavonoidy (kvercetin), polysacharidy, taniny, fenoly, triterpenové saponiny, fytoekdysteroidy, iridoidy, sekoiridoidy antokyaniny, a silici [11].

Květy hluchavky bílé vykazují vysokou biologickou aktivitu kvůli obsahu sloučenin jako jsou flavonoidy, třísloviny, fenolové kyseliny, dále cholinu, glykosidů, saponinů, slizů a silic. Z fenolických látek květ hluchavky obsahuje kyseliny protocatechovou, chlorogenovou, vanilovou, kavovou, *p*-kumarovou a ferulovou. Fenoly a flavonoidy neutralizují reaktivní formu kyslíku (ROS) vzniklé oxidativním stresem [12, 15].

1.2.2 Biologické účinky

U hluchavky byly zjištěny antioxidační, protizánětlivé, antiseptické a bakteriostatické účinky. Květ hluchavky pomáhá při kožních zánětech, onemocnění trávicího ústrojí nebo močových cest. Vysokou antioxidační aktivitu vykazují flavonoidy a fenolové kyseliny. Flavonoidy jsou spojeny s ochranou fibroblastů lidské kůže před oxidačním stresem. U kvercetinu byl prokázán inhibiční účinek na buněčný růst [12, 13, 15].

2 ANTIOXIDANTY

Antioxidační aktivita rostlin souvisí s jejich chemickým složením. Antioxidanty jsou látky přítomné v rostlinách v malém množství, které významně zpomalují nebo zastavují oxidaci, neutralizují volné radikály. Mezi významné zdroje antioxidantů patří rostliny [16]. Přírodními antioxidanty jsou fenolové sloučeniny (tokoferoly, flavonoidy a fenolové kyseliny), dusíkaté sloučeniny (alkaloidy, deriváty chlorofylu), karotenoidy nebo kyselina askorbová (vitamin C). Tyto antioxidanty vykazují antioxidační účinky. Flavonoidy mají schopnost vychytávat volné radikály a mohou tvořit komplexy s katalytickými kovovými ionty, které je činí neaktivní. Antioxidanty mohou chránit lipidy v potravinách před oxidační degradací [16, 17].

2.1 Fenolové sloučeniny

Jedná se o sekundární metabolity rostlin, mají významné biologické účinky, včetně antioxidačních. Tyto sloučeniny mají aromatický kruh nesoucí jednu nebo více hydroxylových skupin a jejich struktury mají rozsah od jednoduché fenolické molekuly až po molekulu komplexního vysokomolekulárního polymeru. Rozdělují se do několika kategorií jako jsou jednoduché fenoly, fenolové kyseliny, kumariny, flavonoidy, stibeny, taniny, lignany a ligniny. Rozdělení fenolů i s jejich strukturou je uvedeno v tabulce 2. Z těchto kategorií jsou účinné zejména flavonoidy. Působí proti singletovému kyslíku a volným radikálům, které mohou způsobovat řadu onemocnění [5, 17, 18].

Fenolické sloučeniny jsou polární látky, při extrakci se využívá jako rozpouštědlo voda, metanol nebo etanol. Účinnost extrakce závisí na délce, přičemž delší doba extrakce je často spojena s vyšší účinností. Každá rostlina obsahuje různé fenolické sloučeniny a každá z těchto sloučenin má různou antioxidační aktivitu. Antioxidační aktivita fenolických sloučenin závisí na struktuře, zejména počtu a polohách hydroxylových skupin a jejich povaze [18, 19, 20].

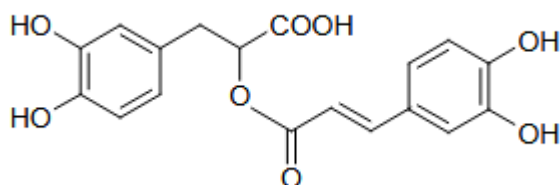
K fenolům, které jsou zastoupeny v rostlinách meduňka a hluchavka patří kyseliny rozmarýnová, kyseliny kávová, protokatechová, vanilová, chlorogenová, *p*-kumarová a ferulová. [4, 12, 15].

Tabulka 1 Třídy fenolických sloučenin v rostlinách [18]

Třídy fenolických sloučenin	Struktura
Jednoduché fenoly, benzochinony	C ₆
Hydroxybenzoové kyseliny	C ₆ -C ₁
Hydroxyskořicové kyseliny, fenylypropanoidy (kumariny, izokumariny, chromony, chromeny)	C ₆ -C ₃
Naftochinony	C ₆ -C ₄
Xantony	C ₆ -C ₁ -C ₆
Stibeny, antrachinony	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoidy, izoflavonoidy	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignany, neolignany	(C ₆ -C ₃) ₂
Bioflavonoidy	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligniny	(C ₆ -C ₃) _n
Kondenzované taniny (proantokyanidiny, flavolany)	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

2.1.1 Kyselina rozmarýnová

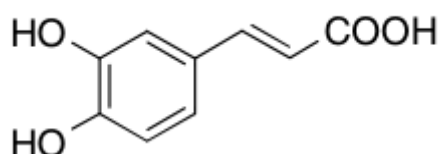
Tato kyselina (obr.3) je významným antioxidantem, jedná se o ester fenolových kyselin. Nejvíce se vyskytuje u druhů z čeledi brutnákovité a hluchavkovité. Současný výzkum se soustředí na jeho fyziologické a farmakologické účinky. Kyselina vykazuje antialergické, antimikrobiální, antivirové a protizánětlivé účinky. Koncentrace kyseliny rozmarýnové v rostlinách meduňky závisí na extrakčních podmínkách, pohybuje se v rozmezí mezi 10 až 80 %. Kyselina rozmarýnová se používá v potravinářském průmyslu ke zpomalení oxidačního procesu [10, 21, 22].



Obrázek 3 Kyselina rozmarýnová [21]

2.1.2 Kyselina kávová

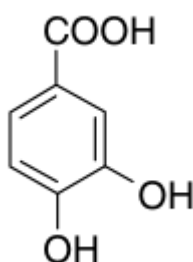
Tato kyselina (3,4-dihydroxybenzoeslová, obr. 4) patří k neflavonoidním fenolickým sloučeninám, vyskytuje se v kávě, ovoci (kiwi, švestka, hruška), medu a rostlinách jako je meduňka lékařská a hluchavka bílá. Kyselina kávová vykazuje antimikrobiální, antitrombotické, antihypertenzní a protizánětlivé účinky. Funguje jako antioxidant, působí proti reaktivním formám kyslíku (ROS) [23].



Obrázek 4 Kyselina kávová [18]

2.1.3 Kyselina protokatechová

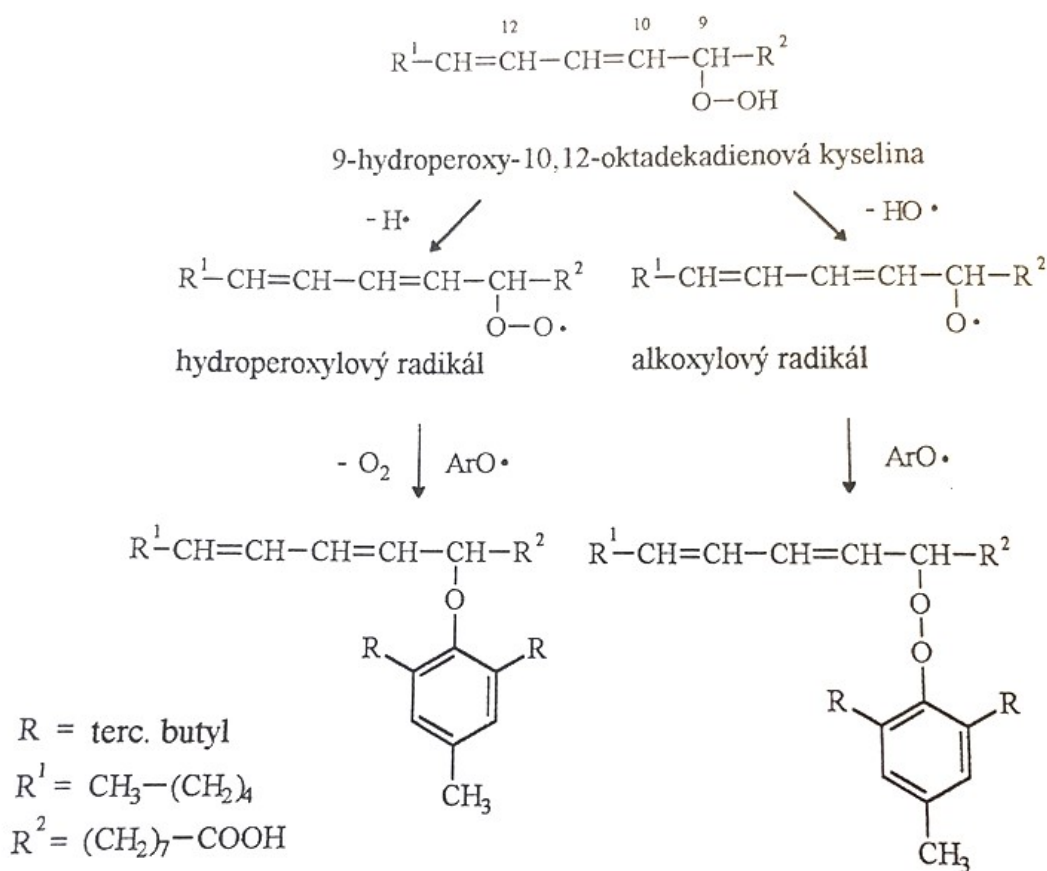
Jedná se o kyselinu 3,4-dihydroxybenzoovou (obr. 5). Bylo prokázáno její působení jako inhibitor oxidace lipidů v mase. Vykazuje antioxidační, protizánětlivé, antibakteriální účinky a antivirovou aktivitu. Jako fenolová kyselina má vysoký předpoklad poskytnutí vodíku, působí proti volným radikálům, peroxidu vodíku a hyperoxidovým radikálům. Vzhledem ke své struktuře vykazuje vysokou afinitu ke kovům, vazným místem je pyrokatechol a karboxylová kyselina [24].



Obrázek 5 Kyselina protokatechová [18]

2.1.4 Mechanismus působení fenolových sloučenin

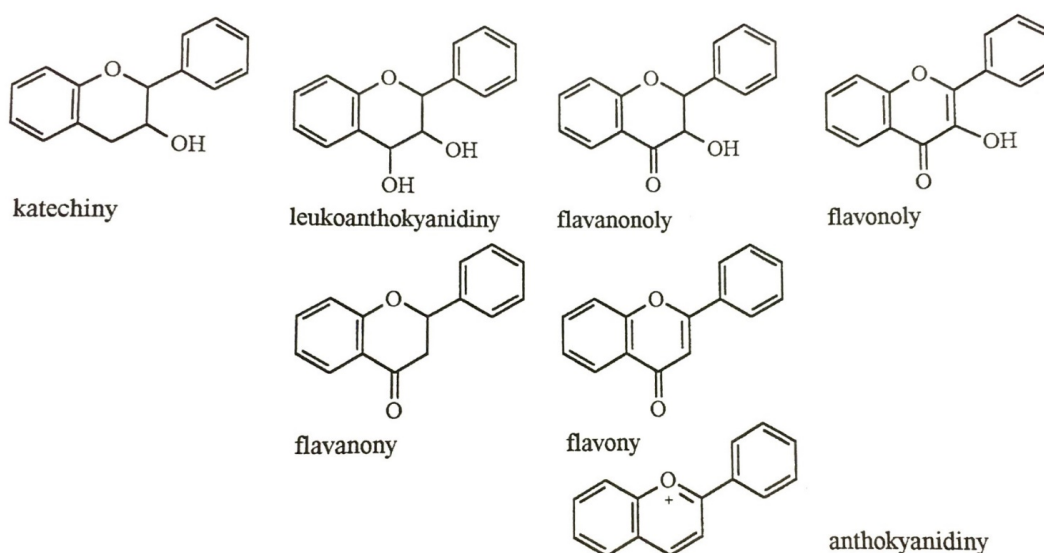
Fenolové sloučeniny (ArOH) se jako primární antioxidanty se uplatňují proti oxidaci lipidů (R-H), (obr. 6). V propagační fázi autooxidační reakce reagují s hydroperoxidovými radikály (ROO·) nebo alkoxylovými radikály (RO·), které vznikly oxidací lipidů. Fenolové sloučeniny poskytují volným radikálům atom vodíku a tím přerušují řetězovou radikálovou reakci. Jako produkty vznikají fenolové radikály antioxidantu. Tyto radikály reagují s volným hydroperoxylovým nebo alkoxylovým radikálem oxidované mastné kyseliny v terminační fázi reakce (obr. 6) [21].



Obrázek 6 Reakce volného radikálu antioxidantu s volným radikálem oxidované linolové kyseliny [21]

2.2 Flavonoidy

Tato skupina přírodních látek patří do třídy rostlinných sekundárních metabolitů s polyfenolickou strukturou. Jsou součástí fenolických sloučenin s nízkou molekulovou hmotností. Nachází se jako součásti vyšších rostlin, zde mají funkci obranou a pomáhají růstu, jsou zodpovědné za barvu a vůni květů, nachází se ve všech částech rostlin, v ovoci a zelenině. Podle struktury se flavonoidy dělí na flavonoidy zahrnují katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly a anthokyanidy, (obr. 7), toto rozdělení je dáno stupněm oxidace C₃. Flavonoidy, které ve své struktuře zahrnují furanový cyklus se dělí na aurony, chalkony a dihydrochalkony. Všechny flavonoidy obsahují ve své základní kostře 15 atomů uhlíku, které jsou uspořádány ve formě dvou fenylových kruhů (A a B) a heterocyklického kruhu C. Jedná se o uspořádání C₆-C₃-C₆. Antioxidační aktivita flavonoidů se zvyšuje s počtem hydroxylových skupin substituovaných na B kruhu, zejména na C₃. Mezi jejich biologické účinky patří antioxidační. Pro své příznivé biochemické a antioxidační účinky jsou využívány v nutričních, farmaceutických, medicínských a kosmetických aplikacích [5, 20, 21, 25].

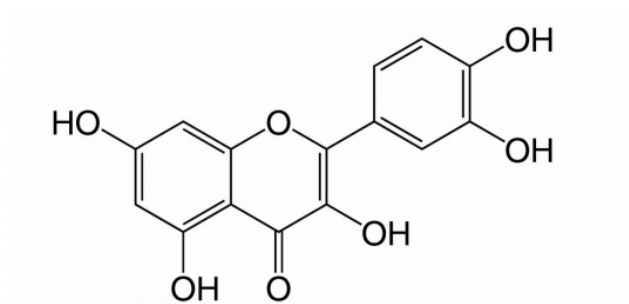


Obrázek 7 Obecná struktura flavonoidů [21]

Mezi flavonoidy, které jsou obsaženy v rostlinách meduňka a hluchavka patří především kvercetin, kvercitril a luteolin [3, 11].

2.2.1 Kvercetin a kvercitrin

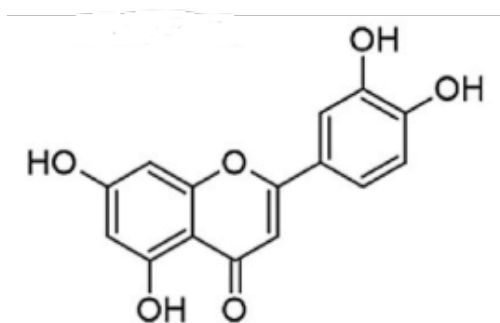
Nejběžnějším flavonoidem je kvercetin (obr. 8), v rostlinách je přítomen především jako jeho glykosidové formy, například kvercitrin (3-rhamnosyl-kvercetin) a rutosid (3-rhamnosy-glucosyl kvercetin). Kvercitrin má antioxidační vlastnosti a vstřebává se lépe než ostatní formy kvercetinu, strukturou se skládá z kvercetinu a deoxycukru rhamnózy. Působí antibakteriálně, proti peroxidu vodíku a UV záření [21, 26].



Obrázek 8 Kvercetin [27]

2.2.2 Luteolin

Luteolin (obr. 9) patří do skupiny flavonů, je přítomný ve významném množství v ovoci a zelenině, také v meduňce. Vykazuje antioxidační, antimikrobiální a protizánětlivý účinek. Také může působit proti růstu buněk. Strukturou se podobá kvercetinu. Skládá se z 15 uhlíku se dvěma benzenovými jádry s hydroxylovými skupinami. [28]



Obrázek 9 Luteolin [28]

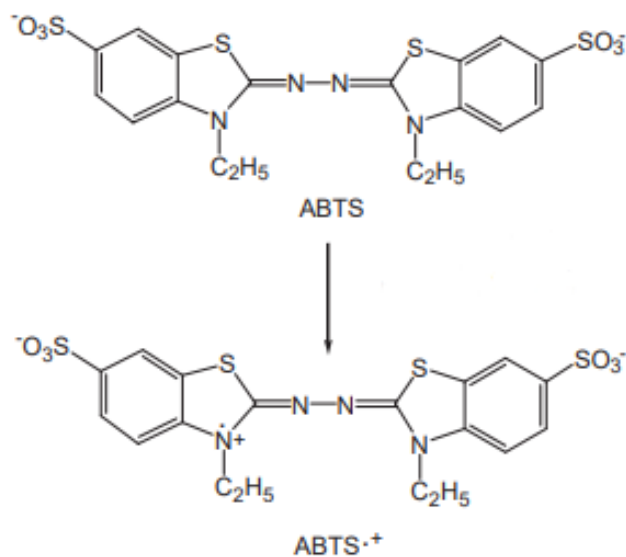
3 METODY VYUŽÍVANÉ PRO STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍCH VLASTNOSTÍ

Pro stanovení antioxidační aktivity se používají *in vitro* a *in vivo* metody. Metody *in vitro* se používají pro rostlinné extrakty nebo izolované sloučeniny, oproti tomu metody *in vivo* se používají pro zjišťování AA u biologických systémů. Mezi nejpoužívanější metody *in vitro* patří metody s činidly ABTS a DPPH. Metoda s činidlem ABTS je vhodná jak pro hydrofilní, tak pro lipofilní antioxidanty. Tyto metody jsou dostupné, jednoduché a rychlé na přípravu. Antioxidační aktivita se může zjišťovat jak u jednotlivých látek, tak i směsí [17].

3.1 Metoda ABTS

Tato metoda je založena na schopnosti vzorku zhášet kationtový radikál kyseliny 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové) ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) (obr. 10). Tmavě modrý roztok kationtového radikálu $\text{ABTS}^{\cdot+}$ vzniká nejprve aktivací metmyoglobinu peroxidem vodíku v přítomnosti ABTS^+ a následnou oxidací persulfátem draselným. Zhášení kationtového radikálu $\text{ABTS}^{\cdot+}$ antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, se sleduje spektrofotometricky na základě změn absorpčního spektra $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Absorbance se nejčastěji měří při vlnové délce 734 nm [17, 29].

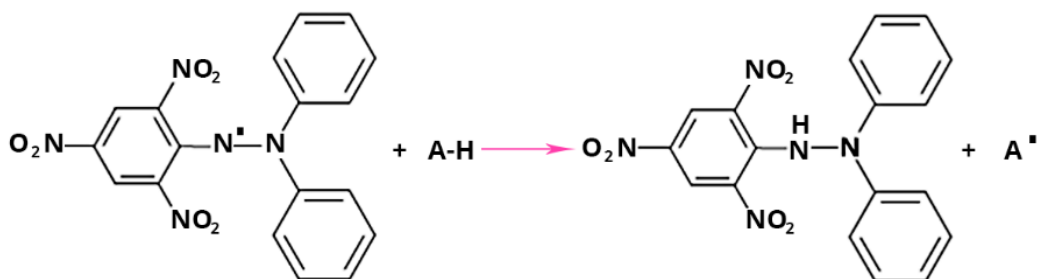
Výsledná antioxidační aktivita (AA) vzorku je srovnávaná s antioxidační aktivitou syntetické látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylové kyseliny). AA vzorků se hodnotí parametrem TEAC, označuje antioxidační (antiradikálovou) kapacitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu Troloxu. TEAC je definována jako milimolární koncentrace Troloxu vykazující stejnou antioxidační aktivitu jako testovaná látka při koncentraci 1 mmol.l^{-1} pro čisté látky a pro směsi [29, 30].



Obrázek 10 Reakce s ABTS činidlem [29]

3.2 Metoda DPPH

Činidlo DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylový radikál) je stabilní volný radikál, který reaguje se sloučeninami schopnými poskytnout atom vodíku. Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin) (obr. 11). Tato reakce vede k odbarvení tmavě fialového činidla DPPH. Stupeň odbarvení je úměrný koncentraci molekul antioxidačního typu. Absorbance se měří spektrofotometricky nejčastěji při vlnové délce 517 nm. Nízká absorbance poukazuje na vysokou aktivitu vzorku pohlcovat volné radikály. Antioxidační (antiradikálová) aktivita se vyjadřuje v ekvivalentech vybraných standardů jako je kyselina askorbová nebo v jednotkách standardu Troloxu [17, 30].

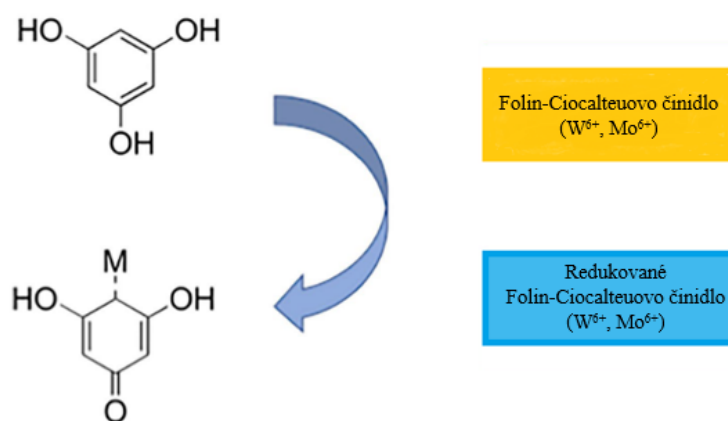


Obrázek 11 Reakce s DPPH činidlem [31]

3.3 Metody stanovení obsahu polyfenolických látek

3.3.1 Stanovení obsahu polyfenolických látek s Folin-Ciocalteuovým činidlem

Běžným a častým činidlem pro stanovení obsahu polyfenolických látek je Folin-Ciocalteuovo činidlo. Toto činidlo se skládá ze směsi fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny. Probíhá zde oxidace fenolických látek v alkalickém prostředí. Produkty této oxidačně-redukční reakce mají modré zbarvení (obr. 12). Intenzita výsledného zbarvení je úměrná koncentraci polyfenolických látek ve vzorku. Jako standard pro toto stanovení se využívá kyselina gallová. Absorbance se měří spektrofotometricky při vlnové délce kolem 750 nm. Celkový obsah polyfenolů se vyjadřuje v mg ekvivalentu kyseliny gallové na gram extraktu. Tato metoda není vhodná pro lipofilní antioxidanty [17].



Obrázek 12 Princip metody s Folin-Ciocalteuovým činidlem [19]

3.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) lze separovat látky dle jejich interakce se stacionární fází a použití mobilní fáze, a je užitečným nástrojem pro analýzu fenolických sloučenin v různých matricích. HPLC není omezená těkavostí vzorku nebo tepelnou stabilitou. Touto metodou lze separovat labilní přírodní látky i vysokomolekulární látky. Kombinuje se s různými detektory pro identifikaci jednotlivých složek, jako jsou detektor s využitím ultrafialového (UV) a viditelného (VIS) záření a detektor fotodiodového pole (PDA) [19, 32].

HPLC se skládá z několika částí, které zahrnují kolonu což je stacionární fáze, čerpadlo, které pohání průtok roztoku, mobilní fáze a detektor, který sbírá data. Mechanismus retence

závisí na interakci mezi mobilní a stacionární fází. Mezi běžná rozpouštědla používaná při této metodě je kombinace vody a organických rozpouštědel jako je acetonitril. Různé složení mobilní fáze během analýzy je známé jako gradientová eluce, která je zaměřena na lepší separaci složek v závislosti na aktuálním složení mobilní fáze. Sloučeniny se můžou oddělovat i na základě afinity k mobilní fázi [19].

Spektrofotometrický detektor (UV/VIS) měří absorbanci eluátu v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Pro lepší detekci se využívá detektor, který pomocí diodového pole (DAD) proměří absorpční spektrum v určité oblasti vlnových délek. Tento detektor zaznamenává celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Detektorem je pole fotodiod, jejich počet určuje spektrální rozlišení detektoru. Umožňuje detekci analytu při jakékoliv zvolené vlnové délce [33].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce byla charakteristika rostlin meduňky lékařské (*Melissa officinalis*) a hluchavky bílé (*Lamium album*), a analýza jejich antioxidačních vlastností vybranými metodami.

V teoretické části byla práce zaměřena na popis rostlin meduňky a hluchavky, jejich složení a zdravotní vlastnosti. Dále také charakteristika antioxidantů a jednotlivých metod pro stanovení antioxidačních vlastností, které byly v experimentální části využity.

V praktické části práce bylo cílem analyzovat extrakty meduňky a hluchavky, získaných při dvou extrakčních teplotách. Celkový obsah polyfenolických látek stanovit spektrofotometrickou metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Antioxidační aktivitu stanovit pomocí fotometrických metod s využitím ABTS a DPPH činidla. U metody s využitím DPPH činidla určit hodnotu IC_{50} . Ve vybraných extraktech také stanovit významné fenolické látky pomocí metody HPLC s DAD detektorem.

5 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

5.1 Materiál

V diplomové práci byly analyzovány extrakty připravené z dvou rostlin, konkrétně meduňky lékařské (*Melissa officinalis*) a hluchavky bílé (*Lamium album*). Vzorky byly získány z tržní sítě od několika českých i zahraničních výrobců a z domácího pěstitelství, v celkovém počtu 23 vzorků, 12 vzorků meduňky a 11 vzorků hluchavky (tab. 2). Jednalo se o vzorky v čerstvé a sušené formě. Jako vzorky meduňky byly vybrány části list a nať. Jako vzorky hluchavky byly vybrány části list, nať a květ.

Tabulka 2 Vzorky bylin

Druhy rostlin	Označení	Forma	Část byliny	Země původu
Meduňka lékařská	1 SM	Sušená	Nať	Polsko
	2 SM	Sušená	Nať	SK
	3 SM	Sušená	Nať	ČR
	4 SM	Sušená	Nať	ČR
	5 SM	Sušená	Nať	ČR
	6 SM	Sušená	List	EU
	7 SM	Sušená	Drcená rostlina	Polsko
	8 SM	Sušená	List	ČR
	9 SM	Sušená	List	ČR
	10 SM	Sušená	List	Domácí pěstitelství, ČR
	1 ČM	Čerstvá	List	Domácí pěstitelství, ČR
	2 ČM	Čerstvá	List	ČR
Hluchavka bílá	1 HN	Sušená	Nať	ČR
	2 HN	Sušená	Drcená rostlina	Rumunsko
	3 HN	Sušená	Nať	ČR
	4 HN	Sušená	Nať	ČR
	5 HN	Sušená	Nať	ČR
	6 HN	Sušená	Nať	Domácí pěstitelství, ČR
	1 HL	Sušená	List	ČR
	1 HK	Sušená	Květ	ČR
	2 HK	Sušená	Květ	ČR

	3 HK	Sušená	Květ	ČR
	4 HK	Sušená	Květ	EU a mimo EU

5.2 Přístroje a pomůcky

- Spektrofotometr (Libra S6 Biochrom, Velká Británie)
- Analytické váhy (Voyager PRO VP214C, Ohaus, USA)
- Třepačka (Vortex CHS, ČR)
- Filtrační papír (KA 4, Papírna Perštejn, ČR)
- Laboratorní sklo
- Teploměr
- Aparatura pro HPLC-DAD (Dionex Ultimate 3000 System, USA)
 - autosampler Dionex Ultimate 3000 WPS-3000 SL A WPS-3000 RS
 - pumpa Dionex Ultimate 3000 SD
 - kolona Phenomenex Kinetex C 18 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm)
 - detektor Dionex Diode Array Detector, DAD-3000 RS
 - vyhodnocovací program Chromeleon 7 (verze 7.2.1.5537)

5.3 Chemikálie a roztoky

- Etanol p.a. (Penta s.r.o. ČR)
- Acetátový pufr (Lukeš, ČR)
- Uhličitan sodný (Lukeš, ČR)
- DPPH (Sigma Aldrich, Francie)
- ABTS (Sigma Aldrich, Francie)
- Trolox (Sigma Aldrich, Francie)
- Folin – Ciocalteuovo činidlo (Penta s.r.o. ČR)
- Standard kyseliny gallové (Sigma Aldrich, Francie)

- Standard kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard kyseliny neochlorogenové (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard kyseliny 4-hydroxybenzoové (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard epigalokatechinu (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard katechinu (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard kyseliny chlorogenové (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard kyseliny vanilové (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard kyseliny kávové (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard kyseliny syringové (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard epikatechinu (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard kyseliny *t-p*-kumarové (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard kyseliny ferulové (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard kyseliny sinapové (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard kyseliny elagové (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard rutinu (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard kyseliny *t*-hydroxyskořicové (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard kyseliny protokatechové (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard resveratrolu (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard kyseliny *trans*-skořicové (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard kaempferolu (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard kvercetin (Sigma Aldrich, Francie)
- Standard etylesteru kyseliny protokatechové (Sigma Aldrich, Francie)
- Demineralizovaná voda

6 METODIKA STANOVENÍ

Ze vzorků uvedených v tab. 2 byly připraveny odpovídající vodné extrakty rostlin. Extrakty byly využity ke stanovení antioxidační aktivity pomocí metody ABTS a DPPH, ke stanovení celkového počtu polyfenolů za pomoci Folin-Ciocalteuovo činidla a ke stanovení vybraných polyfenolů metodou HPLC.

6.1 Příprava extraktů rostlin

Extrakty byly připraveny ze sušených a čerstvých částí rostlin.

Ze sušených částí rostlin bylo naváženo 1,5 g s přesností na 0,0001 g. K sušeným rostlinám bylo přidáno 100 ml demineralizované vody při teplotách 95 a 80 °C. Rostliny byly extrahovány 10 minut za občasného promíchání. Extrakt byl zfiltrován přes filtrační papír. Extrakty byly následně zředěny dle potřeby.

Z čerstvých částí rostlin bylo naváženo 1 g s přesností na 0,0001 g. Rostliny byly rozetřeny v třecí misce. K čerstvým rozetřeným bylinám bylo přidáno 100 ml demineralizované vody při teplotách 95 a 80 °C. Rostliny byly extrahovány 10 minut za občasného promíchání. Extrakt byl zfiltrován přes filtrační papír. Extrakty byly zředěny dle potřeby.

Pro stanovení antioxidační aktivity pomocí metody ABTS a DPPH, pro určení celkového množství polyfenolů za pomoci Folin-Ciocalteuovo činidla a pro stanovení vybraných zástupců polyfenolů byly podle potřeby původní extrakty naředěny na 50 až 10% koncentraci. Pro stanovení koncentrace IC₅₀ (DPPH test) byly vybrané připravené extrakty také dále ředěny dle potřeb této metody.

6.2 Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody ABTS

Pro stanovení AA byl použitý roztok ABTS. Vlivem reakce mezi činidlem a silným antioxidantem dochází k odbarvení barevného zeleno-modrého činidla. Absorbanci zreagovaného odbarveného roztoku lze poté měřit spektrofotometricky při 734 nm. Pro výpočet inaktivace byl změřen i kontrolní vzorek, ve kterém byl použitý aktivovaný roztok ABTS a demineralizovaná voda.

Složení reakční směsi [34]:

- 6 ml aktivovaného roztoku ABTS
- 75 µl vzorku

Kontrolní vzorek:

- 6 ml aktivovaného roztoku ABTS
- 75 µl demineralizované vody

Zkumavky s reakční směsí byly uzavřeny zátkou, promíchány na vortexu a vloženy do tmy po dobu 30 minut. Po 30minutové reakci byly vzorky měřeny na spektrofotometru při vlnové délce 734 nm. Jako slepý pokus byl použit octanový pufr.

Z hodnot absorbance vzorků byla vypočítána inaktivace pomocí rovnice pro výpočet inaktivace I [%]:

$$I = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100 \text{ [%]}$$

A_0 – absorbance kontrolního vzorku při vlnové délce 734 nm

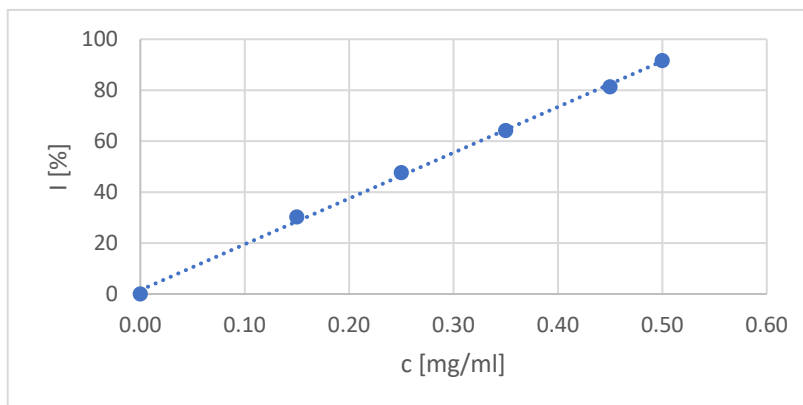
A_1 – absorbance vzorku s extraktem byliny při vlnové délce 734 nm

Z hodnot inaktivace byla vypočtena antioxidační aktivita (AA) jednotlivých vzorků pomocí kalibrační křivky na standard trolox. AA byla přepočtena na původní hmotnost a vyjádřena jako ekvivalent troloxu v miligramech na gram vzorku.

6.2.1 Kalibrační křivka troloxu u metody ABTS

Pro sestavení kalibrační křivky byl použitý trolox ze zásobního roztoku o koncentraci 0,5 mg/ml. Následně byl zředěn na koncentrace: 0,45; 0,35; 0,25; 0,15 mg/ml. Jednotlivě zředěný roztok troloxu reagoval s reakční směsí ABTS. Příprava reakčních roztoků, měření jejich absorbancí a výpočet inaktivace byly provedeny postupem uvedeným v kapitole 5.2.

Z vypočítané inaktivace troloxu byla sestavena kalibrační křivka jako závislost úbytku absorbance (inaktivace I) na koncentraci kalibračních roztoků troloxu (obr. 13).



Obrázek 13 Kalibrační křivka troloxu (ABTS)

Z grafu byla zjištěna rovnice lineární regrese troloxu:

$$y = 179,76 \cdot x + 1,5355$$

y – hodnota inaktivace I [%]

x – koncentrace troloxu [mg/ml]

Hodnota spolehlivosti $R^2 = 0,9986$

Z hodnot inaktivace byla vypočtena antioxidační aktivita jednotlivých vzorků pomocí kalibrační křivky na standard troloxu. AA byla přepočtena na původní hmotnost a vyjádřena jako ekvivalent troloxu v miligramech na gram vzorku.

6.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody DPPH

Pro stanovení antioxidační aktivity je využíváno činidlo DPPH. Vlivem reakce mezi činidlem a silným antioxidantem dochází k odbarvení sytě fialového barevného činidla. Absorbance lze měřit spektrofotometricky při 517 nm.

Do zkumavky byla napipetována reakční směs [35]:

- 2,75 ml roztoku DPPH
- 1,5 ml acetátového pufru o pH 5,5
- 0,15 ml extraktu bylin

Kontrolní vzorek:

- 2,75 ml roztoku DPPH
- 1,5 ml acetátového pufru o pH 5,5
- 0,15 ml demineralizované vody

Zkumavky s reakční směsí byly uzavřeny zátkou, promíchány na vortexu a vloženy do tmy po dobu 60 minut. Po 60minutové reakci byly vzorky měřeny na spektrofotometru při vlnové délce 517 nm. Jako slepý pokus byla použita směs obsahující etanol místo činidla DPPH. Pro výpočet inaktivace byl změřen i kontrolní vzorek.

Z hodnot absorbance vzorků byla vypočítaná inaktivace pomocí rovnice pro výpočet inaktivace I [%]:

$$I = \frac{K-A}{K} \cdot 100 [\%]$$

I - inaktivace [%]

K - hodnota absorbance kontrolního vzorku

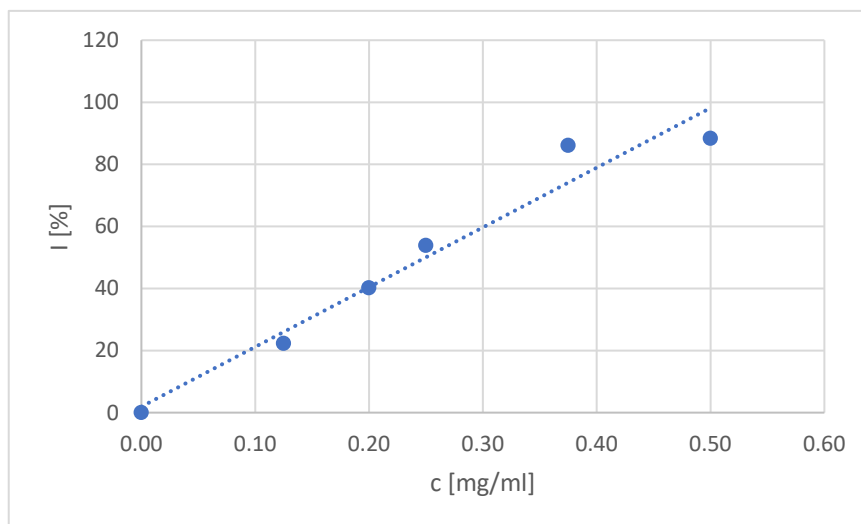
A - hodnota absorbance extraktu

Z hodnot inaktivace byla vypočtena antioxidační aktivita jednotlivých vzorků pomocí kalibrační křivky na standard troloxu. AA byla přepočtena na původní hmotnost a vyjádřena jako ekvivalent troloxu v miligramech na gram vzorku.

6.3.1 Kalibrační křivka troloxu u metody DPPH

Pro sestavení kalibrační křivky byl použitý trolox ze zásobního roztoku o koncentraci 0,5 mg/ml. Následně byl zředěn na koncentrace: 0,45; 0,35; 0,25; 0,15 mg/ml. Jednotlivé zředěné roztoky troloxu reagovaly s reakční směsí DPPH. Příprava reakčních roztoků, měření jejich absorbancí a výpočet inaktivace byl proveden postupem uvedeným v kapitole 6.3.

Z vypočítané inaktivace roztoků troloxu byla sestavena kalibrační křivka jako závislost úbytku absorbance (inaktivace I) na koncentraci kalibračních roztoků troloxu (obr. 14).



Obrázek 14 Kalibrační křivka troloxu (DPPH)

Z grafu byla zjištěna rovnice lineární regrese troloxu:

$$y = 192,49 \cdot x + 1,9321$$

y – hodnota inaktivace I [%]

x – koncentrace troloxu c [mg/ml]

Hodnota spolehlivosti $R^2 = 0,9558$

6.3.2 IC₅₀ stanovení

Hodnota IC₅₀ vyjadřuje koncentraci roztoku, která je potřebná pro 50% redukci radikálů DPPH. Bylo vybráno 6 vzorků, tři vzorky s nejvyšší antioxidační aktivitou, dva vzorky s nejnižší antioxidační aktivitou a jeden vzorek z čerstvé části rostliny, u kterých bylo provedeno také stanovení IC₅₀. Jednalo se o vzorky meduňky 2 SM, 8 SM a 1 ČM, vzorky hluchavky z natě 3 HN a 5 HN a vzorek hluchavky květ 2 HK. Všechny vzorky byly extrahovány při teplotě 95°C. Příprava reakčních roztoků, měření jejich absorbancí a výpočet inaktivace byl proveden postupem uvedeným v kapitole 6.3.

Hodnoty inaktivace jednotlivých zředěných vzorků rostlin byly graficky zobrazeny a výsledné hodnoty koncentrací IC₅₀ byly následně vypočítány pomocí lineární regrese pro I=50%.

6.4 Stanovení celkového obsahu polyfenolů s Folin-Ciocalteuovým činidlem

Pro stanovení celkového obsahu polyfenolů je využíváno Folin-Ciocalteuovo činidlo. Metoda je založena na reakci změny barvy mezi činidlem a přítomnými polyfenoly, kdy vzniká sytě modrý komplex, který lze měřit spektrofotometricky při 750 nm.

Do zkumavky byla napipetována reakční směs [34]:

- 2 ml 10 % roztoku Folin-Ciocalteuova činidla
- 0,2 ml extraktu bylin

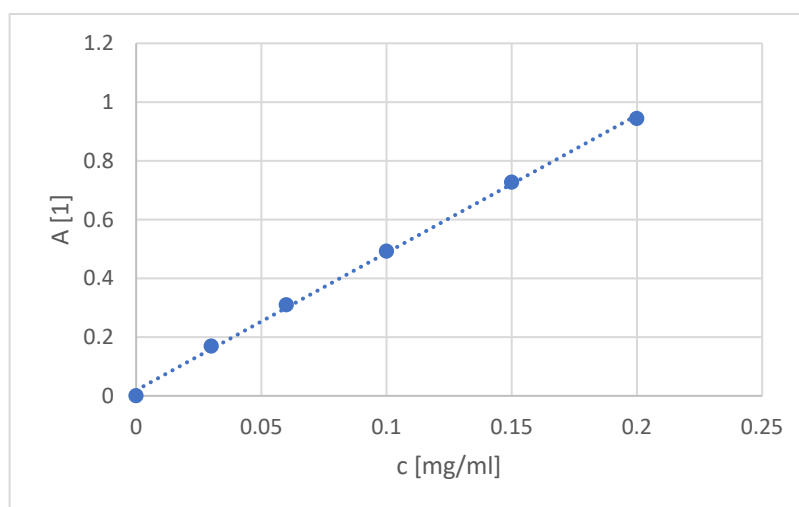
Zkumavky s reakční směsí byly uzavřeny zátkou, promíchány na vortexu a vloženy do tmy po dobu 5 minut. Po 5-minutové reakci bylo do směsi přidáno 2 ml 10%-ního roztoku uhličitanu sodného. Zkumavky byly uzavřeny zátkou, promíchány a vloženy do tmy po dobu 15 minut. Po 15-minutové reakci byly vzorky promíchány a měřeny na spektrofotometru při vlnové délce 750 nm. Jako slepý pokus byla použita směs obsahující vodu.

Pomocí kalibrační křivky na standard kyseliny gallové byl vypočítán celkový obsah polyfenolů ve vzorcích a obsah byl přepočten na původní hmotnost. Celkový obsah polyfenolů je vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové v miligramech na gram vzorku.

6.4.1 Kalibrační křivka standardu kyseliny gallové

Pro sestavení kalibrační křivky byla použita kyselina gallová o koncentracích: 0,2; 0,15; 0,1; 0,06; 0,03 mg/ml. Jednotlivé zředěné roztoky kyseliny gallové reagovaly s reakční směsí. Příprava reakčních roztoků, měření jejich absorbancí a výpočet celkového množství polyfenolů byl proveden postupem uvedeným v kapitole 6.4.

Z naměřených hodnot absorbance v závislosti na koncentraci kalibračního roztoku kyseliny gallové byla sestavena kalibrační křivka standardu kyseliny gallové (obr. 15).



Obrázek 15 Kalibrační křivka kyseliny gallové

Rovnice lineární regrese kalibrační přímky kyseliny gallové:

$$y = 4,681 \cdot x + 0,019$$

y – absorbance [1]

x – koncentrace kyseliny gallové [mg/ml]

Hodnota spolehlivosti $R^2 = 0,9988$

6.5 Stanovení vybraných fenolických látek metodou HPLC/DAD

Pro stanovení vybraných fenolických látek metodou HPLC s detektorem DAD bylo vybráno 6 vzorků, tři vzorky s nejvyšší antioxidační aktivitou, dva vzorky s nejnižší AA a jeden vzorek z čerstvé části rostliny. Jednalo se o vzorky meduňky ze sušené 7 SM a 8 SM, a vzorek čerstvé 1 ČM rostliny, vzorky hluchavky z natě 3 HN a 1 HL a vzorek hluchavky z květu 2 HK. Všechny vzorky byly extrahovány při teplotě 95°C.

Dělení vybraných polyfenolů probíhalo na koloně Phenomenex Kinetex C 18 (150 mm x 4,6 mm) o velikosti částic 5 μm . Mobilní fáze A byla složena v poměru 99:1 z vody a kyseliny octové o čistotě 99,8%. Mobilní fáze B byla složena v poměru 67:32:1 z vody acetonitrilu a kyseliny octové o čistotě 99,8%. Byla použita selektivita mobilních fází v průběhu dělení, přesné složení mobilních fází v závislosti na čase je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3 Složení mobilních fází během gradientové eluce

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0 – 10	80 - 90	10 - 20
10 – 16	60 – 80	20 – 40
16 – 20	50 – 60	40 – 50
20 – 25	30 – 50	50 – 70
25 – 30	30	70
30 – 40	30 – 90	70 – 10
40 - 45	90	10

Teplota kolony byla udržována při teplotě 30 °C. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a objem nástřiku vzorku byl 10 μl . Analýza trvala 45 minut. Měření probíhalo při vlnových délkách 210, 254, 275 a 375 nm a vyhodnocení bylo provedeno při vlnové délce 275 nm vůči naměřeným standardům.

6.5.1 Určení kalibračních křivek standardů u metody HPLC

Pro stanovení vybraných 22 standardů významných fenolických látek pomocí metody HPLC byly připraveny jejich kalibrační křivky. Byly analyzovány tyto fenolické látky: kyselina gallová, kyselina protokatechová, kyselina neochlorogenová, kyselina 4-hydroxybenzoová, epigallokatechin, katechin, kyselina chlorogenová, kyselina vanilová, kyselina kávová, kyselina syringová, epikatechin, kyselina *t-p*-kumarová, kyselina ferrulová, kyselina sinapová, kyselina elagová, rutin, kyselina *t*-hydroxyskořicová, etylester kyseliny protokatechové, resveratrol, kyselina *trans*-skořicová, kaempferol a kvercetin.

U každého standardu byl připraven zásobní roztok o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, následně byl každý roztok zředěn mobilní fází A na koncentrace: 5; 20; 30; 50 $\mu\text{g/ml}$. Ředěné standardy byly proměřeny za podmínek daných v kapitole č. 6.5. Ze zjištěných hodnot byla pokaždé

sestavena kalibrační křivka jako závislost plochy píku na koncentraci kalibračních roztoků standardů. Z kalibrační křivky byla zjištěna rovnice lineární regrese (tab. 4), pomocí které byl poté vypočítán obsah fenolických látek v μg na gram vzorku.

Tabulka 4 Rovnice lineární regrese fenolických látek

	Rovnice regrese
Kyselina gallová	$y = 0,5896x$
Kyselina protokatechová	$y = 0,2359x$
Kyselina neochlorogenová	$y = 0,1559x$
Kyselina 4-hydroxybenzoová	$y = 0,5114x$
Epigallokatechin,	$y = 0,0221x$
Katechin	$y = 0,1076x$
Kyselina chlorogenová	$y = 0,4383x$
Kyselina vanilová	$y = 0,2125x$
Kyselina kávová	$y = 0,4118x$
Kyselina syringová	$y = 0,4632x$
Epikatechin	$y = 0,1366x$
Kyselina trans-p-kumarová	$y = 0,6377x$
Kyselina ferrulová	$y = 0,3616x$
Kyselina sinapová	$y = 0,1767x$
Kyselina elagová	$y = 0,2005x$
Rutin	$y = 0,1653x$
Kyselina t-hydroxyskořicová	$y = 1,2589x$
Etylester kyseliny protokatechové	$y = 0,2618x$
Resveratrol	$y = 0,5899x$
Kyselina trans-skořicová	$y = 1,4799x$
Kaempferol	$y = 0,2241x$
Kvercetin	$y = 0,2074x$

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

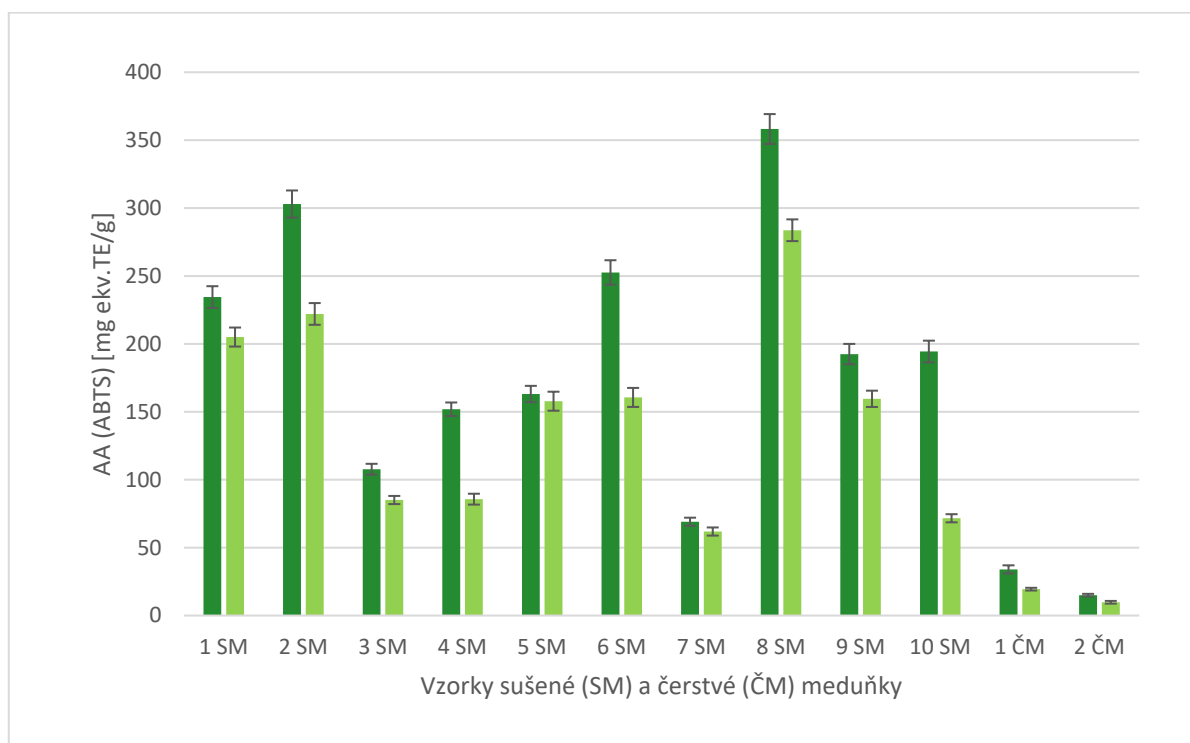
V diplomové práci byla metodami ABTS, DPPH a IC_{50} zjišťovaná antioxidační aktivita připravených extraktů z rostlin. Metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem byl stanoven celkový obsah polyfenolů. Technikou HPLC s DAD detekcí byly stanoveny jednotlivé vybrané polyfenoly.

7.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Antioxidační aktivita metodou ABTS byla stanovena u všech vzorků rostlin při dvou extrakčních teplotách, 95 a 80 °C. Vzorky byly připraveny způsobem uvedeným v kapitole 6.1. Stanovení bylo provedeno postupem popsáním v kapitole 6.2. Antioxidační aktivita byla vypočítána postupem uvedeným v kap 6.2.1. AA byla přepočtena na původní hmotnost a vyjádřena jako ekvivalent troloxu v miligramech na gram vzorku.

7.1.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS extraktů meduňky

Antioxidační aktivita metodou ABTS byla provedena celkem u 10 vzorků sušené meduňky a 2 vzorků čerstvé meduňky. Na obr. 16 jsou výsledky stanovení AA.



Obrázek 16 AA stanovené metodou ABTS ze sušených a čerstvých vzorků meduňky

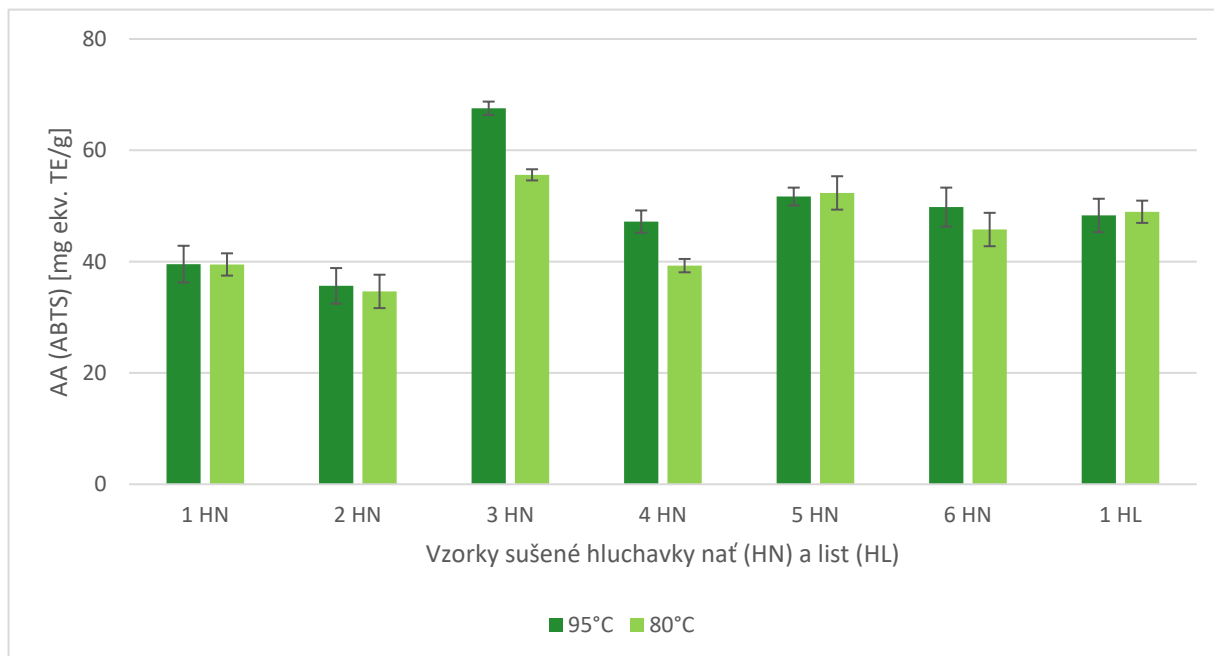
Při porovnání působení extrakční teploty u sušených vzorků meduňky bylo zjištěno, že vyšší AA měly ve všech případech vzorky extrahované při vyšší teplotě, 95 °C, v porovnání s hodnotami AA vzorků po extrakci při nižší teplotě, 80 °C, a to průměrně o 35,8 %. Průměrná AA extraktů sušených vzorků meduňky je 202,69 mg troloxu na gram vzorku při extrakční teplotě 95 °C. U extrakce při nižší teplotě je průměrná AA u sušených vzorků 149,30 mg/g. Průměrná AA u čerstvých vzorků je mnohem nižší, 24,48 mg/g při extrakční teplotě 95 °C, u extrakce při nižší teplotě je průměrná AA u čerstvých vzorků pouze 14,6 mg/g. U čerstvých vzorků byla zjištěna nižší AA než u sušených vzorků o 87,9 % při vyšší teplotě a o 90,2 % při nižší teplotě, i z důvodu obsahu vyššího množství vody v těchto vzorcích.

U získaných extraktů ze sušených vzorků při extrakční teplotě 95 °C se AA pohybovala v širokém rozmezí od 69,1 mg/g do 358 mg/g. Jako vzorek s nejnižší AA lze označit vzorek 7 SM, kde bylo pozorováno nejvíce různých drobných částí, příměsí, oproti ostatním vzorkům. Vzorek pochází z Polska a skládá se z celé nadrcené rostliny. Mezi vzorky se nacházel i vzorek v Bio kvalitě, 6 SM, a vzorek z domácího pěstitelství, 10 SM. AA vzorku v Bio kvalitě se pohybuje nad průměrem AA všech získaných extraktů při teplotách 95 a 80 °C, a to AA vyšší o 24,6 % při vyšší teplotě extrakce, a o 7,6 % při nižší teplotě. Naproti tomu AA vzorku z domácího pěstitelství je podprůměrná u obou extraktů získaných při teplotách 95 a 80 °C, AA je nižší o 4,1 % při vyšší teplotě a o 52 % při nižší teplotě extrakce.

Vzorky sušených rostlin meduňky pocházejí z dvou částí rostlin, z natě (1-5 SM) a listu (6, 8-10 SM). Průměrná AA u sušených rostlin z části natě je 192,03 mg/g při extrakční teplotě 95 °C, z části list je 249,42 mg/g. Průměrná AA je tedy vyšší u vzorků obsahujících listy rostliny, a to o 29,9 %. U čerstvých vzorků byla vyšší AA naměřena u vzorku z domácího pěstitelství (1 ČM), při obou extrakčních teplotách, oproti druhému vzorku, který byl zakoupen v tržní síti. AA vzorku 1 ČM byla vyšší o 126,8 % při vyšší teplotě a o 98,9 % vyšší při nižší teplotě.

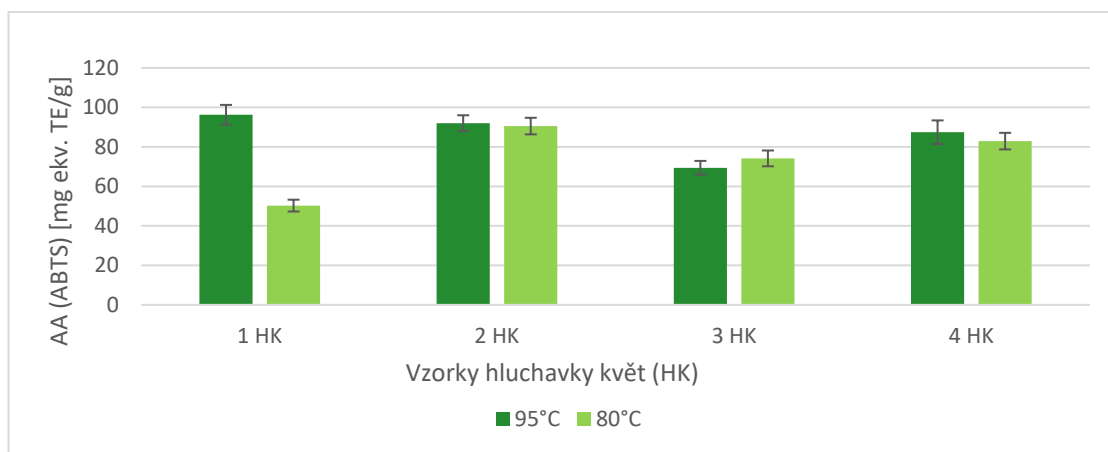
7.1.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS extraktů hluchavky

Antioxidační aktivita metodou ABTS byla provedena celkem u 7 vzorků sušené hluchavky z natě a listů, a 4 vzorků z květů. Na obr. 17 a 18 jsou výsledky stanovení AA.



Obrázek 17 AA stanovené metodou ABTS ze sušených vzorků hluchavky nať a list

Při porovnání působení extrakčních teplot na hodnoty antioxidační aktivity ze sušených vzorků natě a listu hluchavky byla naměřena vyšší AA při využití extrakční teploty 95 °C u 5 vzorků extraktů, u dvou vzorků byla naměřena AA podobná jako hodnota AA při nižší extrakční teplotě. Průměrná AA při teplotě 95 °C je 48,53 mg/g, při teplotě 80 °C 45,15 mg/g, hodnoty se tedy liší jen o 7,5 %. U vzorků získaných extrakcí při 95 °C se AA pohybovala v rozmezí od 35,64 mg/g do 67,55 mg/g. Jako vzorek s nejnižší AA lze označit vzorek 2 HN, kde se opět nacházelo více různých částí příměsí oproti jiným vzorkům. Vzorek pochází z Rumunska a skládá se z celé nadrcené rostliny. Nejvyšší AA byla zjištěna u vzorku 3 HN, který je z ČR a skládá se z části rostliny nať. AA tohoto vzorku se pohybuje nad průměrnou hodnotou AA všech získaných vzorků, a je o 39,2 % vyšší po extrakci při 95 °C, a o 23,1 % vyšší při využití extrakční teploty 80 °C.



Obrázek 18 AA stanovené metodou ABTS ze sušených vzorků hluchavky květ

U AA stanovené metodou ABTS ze sušených vzorků hluchavky květu byla naměřena vyšší AA při extrakční teplotě 95 °C, o 15,9 % více než po extrakci při nižší teplotě. Průměrná AA po extrakci při 95 °C je 86,27 mg/g, a 74,47 mg/g při extrakční teplotě 80 °C. AA všech vzorků se pohybuje kolem průměrné hodnoty, liší se pouze vzorek 1 HK, kde se AA pohybuje pod průměrem, a to o 32,5 % při extrakční teplotě 80 °C.

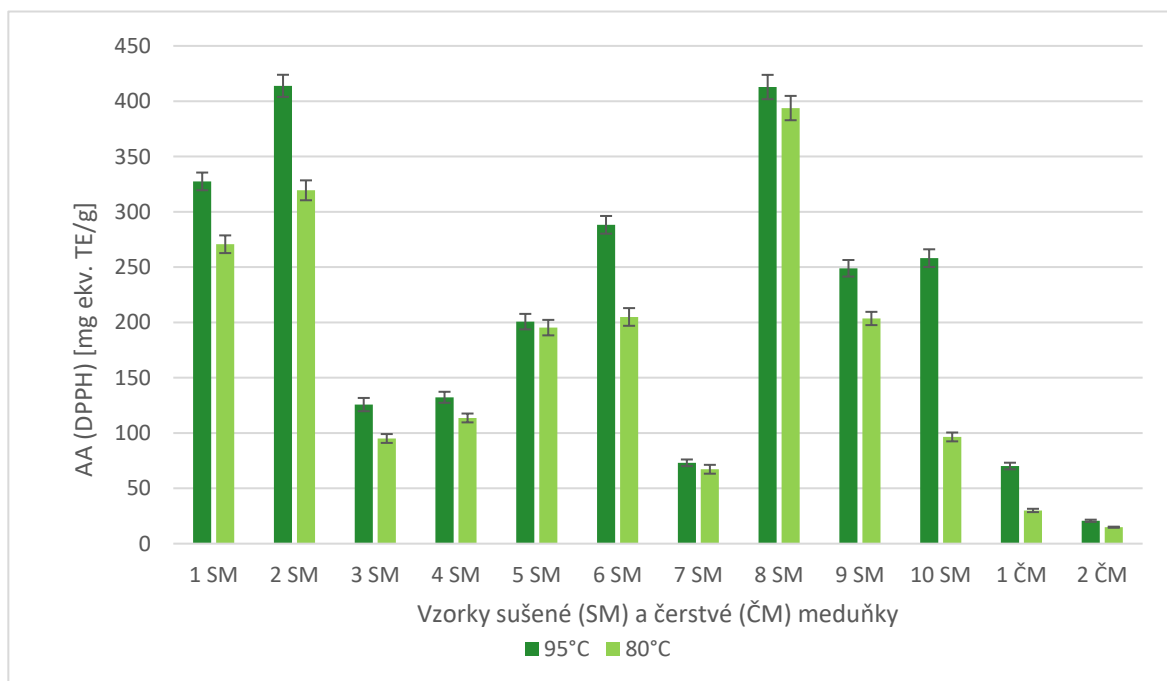
Při porovnání AA extraktů ze všech sušených vzorků hluchavky je patrné, že nejvyšší AA mají vzorky pocházející ze sušené části květu oproti vzorkům z nati nebo listu, přičemž AA byla u květů v průměru o 77,8 % vyšší při vyšší extrakční teplotě, a o 64,9 % vyšší při extrakční teplotě 80 °C.

7.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Antioxidační aktivita metodou DPPH byla stanovena u všech vzorků bylin při dvou extrakčních teplotách, 95 a 80 °C. Vzorky byly připraveny způsobem uvedeným v kapitole 6.1. Stanovení bylo provedeno postupem popsáním v kapitole 6.3. Antioxidační aktivita byla vypočítána postupem uvedeným v kap. 6.3.1. AA byla přepočtena na původní hmotnost a vyjádřena jako ekvivalent troloxu v mg na gram vzorku.

7.2.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH extraktů meduňky

Antioxidační aktivita metodou DPPH byla provedena celkem u 10 vzorků sušené meduňky a u 2 vzorků čerstvé meduňky. Na obr. 19 jsou výsledky stanovení AA.



Obrázek 19 AA stanovené metodou DPPH ze sušených a čerstvých vzorků meduňky

Hodnoty AA stanovené metodou DPPH ze sušených a čerstvých vzorků meduňky byly ovlivněny použitou extrakční teplotou. Bylo zjištěno, že vyšší AA měly ve všech případech vzorky meduňky extrahované při teplotě 95 °C, a to průměrně o 28,1 % více v porovnání s výsledky vzorků po extrakci při nižší teplotě. Průměrná AA u extraktů ze sušených vzorků meduňky byla 248,14 mg/g při extrakční teplotě 95 °C. U extraktů získaných ze sušených vzorků při extrakční teplotě 95 °C se AA pohybovala v rozmezí od 73,11 mg/g do 413,90 mg/g. Jako vzorek s nejnižší AA byl určen vzorek meduňky 7 SM, podobně jako u hodnocení vzorků metodou ABTS. Mezi vzorky byl i vzorek v Bio kvalitě (6 SM) a vzorek z domácího pěstitelství (10 SM). AA vzorku v Bio kvalitě se pohybuje nad průměrem AA všech získaných extraktů při teplotách 95 a 80 °C, a to o 16,2 % při vyšší teplotě, a o 4,6 % při nižší teplotě. AA vzorku z domácího pěstitelství se pohybuje o 4 % vyšší oproti průměru při vyšší extrakční teplotě, přičemž při nižší extrakční teplotě byl o 50,9 % nižší.

U extrakce při nižší teplotě je průměrná AA u sušených vzorků 196,03 mg/g. Průměrná AA u čerstvých vzorků meduňky je několikanásobně nižší, 45,43 mg/g při extrakční teplotě 95 °C, 22,44 mg/g při nižší teplotě. U čerstvých vzorků byla zjištěna nižší AA než u sušených vzorků, i z důvodu vyššího obsahu vody ve těchto vzorcích.

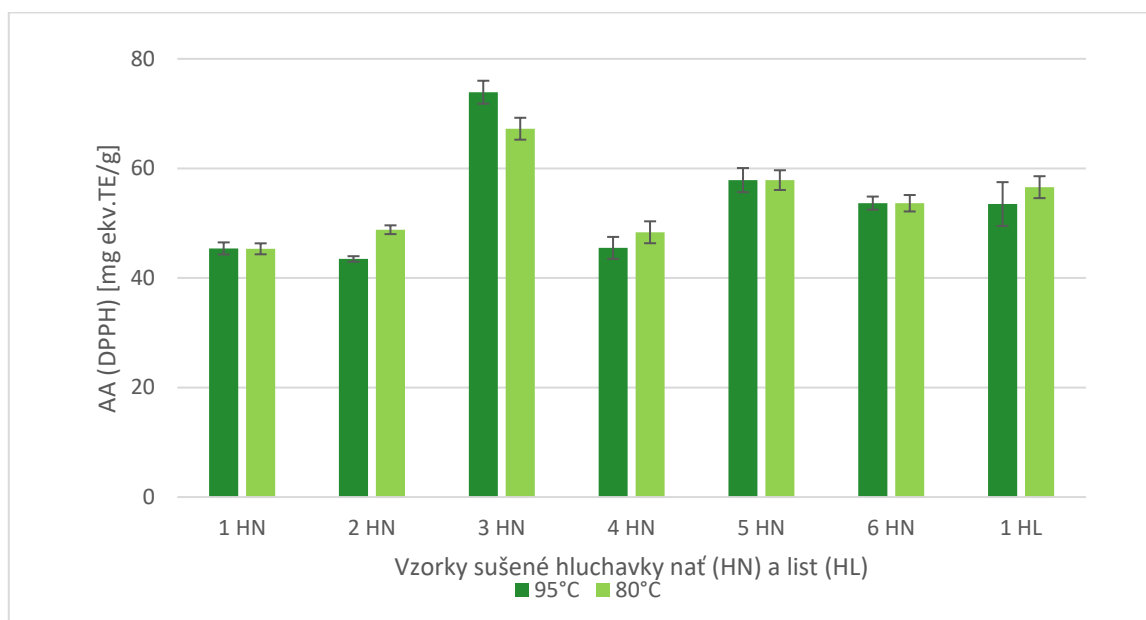
Vzorky sušených rostlin jsou jak z části rostliny natě, tak i listu. Průměrná AA u nati sušené meduňky (1-5 SM) je 240,04 mg/g při extrakční teplotě 95 °C. Průměrná AA u listů ze sušené meduňky (6 SM, 8-10 SM) je 302,04 mg/g při extrakční teplotě 95 °C. Průměrná AA je vyšší u vzorků meduňky obsahujících listy, a to o 25,8 %.

U čerstvých vzorků meduňky byla vyšší AA naměřena u vzorku z domácího pěstitelství (1 ČM), při obou extrakčních teplotách, než u druhého vzorku (2 ČM) zakoupeného v tržní síti

Ve studii Palamuğlu a kol. [36] byla zjišťována antioxidační aktivita sušené meduňky lékařské metodou DPPH. Zkoumán byl vliv teploty a doby extrakce, a to, zda byl nebo nebyl vzorek namletý. Bylo zjištěno, že doba extrakce nebyla statisticky významná pro hodnoty AA vzorků. Hodnoty AA se lišily vzhledem k použitým extrakčním teplotám a namletí vzorku. Nejvyšší AA byla zjištěna při extrakční teplotě 95 °C a u rozemletého vzorku.

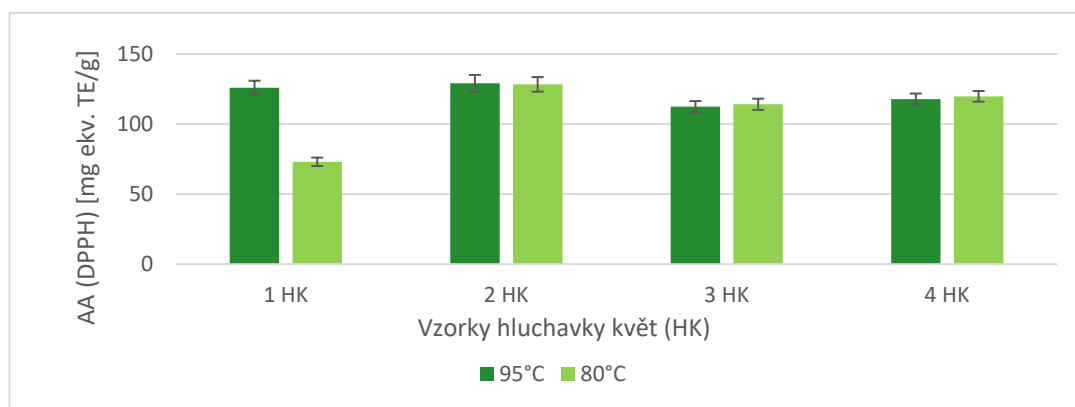
7.2.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH extraktů hluchavky

Měření antioxidační aktivity metodou DPPH bylo provedeno celkem u 7 vzorků sušené hluchavky z části rostliny nat' a list a u 4 vzorků sušené hluchavky z části květ. Na obr. 20 a 21 jsou výsledky stanovení.



Obrázek 20 AA stanovené metodou DPPH ze sušených vzorků hluchavky nat' a list

Průměrná AA extraktů hluchavky louhované při teplotě 95 °C je téměř totožná jako hodnota při extrakční teplotě 80 °C (53,33 a 53,97 mg/g). Mezi průměrnou AA při porovnání působení extrakčních teplot není významný rozdíl. Od ostatních vzorků se liší vzorek 3 HN, kdy jeho AA je o 38,6 % vyšší než průměrná AA všech vzorků při extrakční teplotě 95 °C, a o 24,6 % vyšší než průměrná AA všech vzorků při nižší extrakční teplotě. Jedná se o vzorek hluchavky nať pocházející z České republiky. Analyzován byl i jeden vzorek hluchavky, který pocházel z domácího pěstitelství a byl tvořen pouze sušenými listy, vzorek 1 HL. Jeho AA ale také nevyčnívala nad zjištěnou průměrnou hodnotu ze všech získaných extraktů při obou extrakčních teplotách.



Obrázek 21 AA stanovené metodou DPPH ze sušených vzorků hluchavky květ

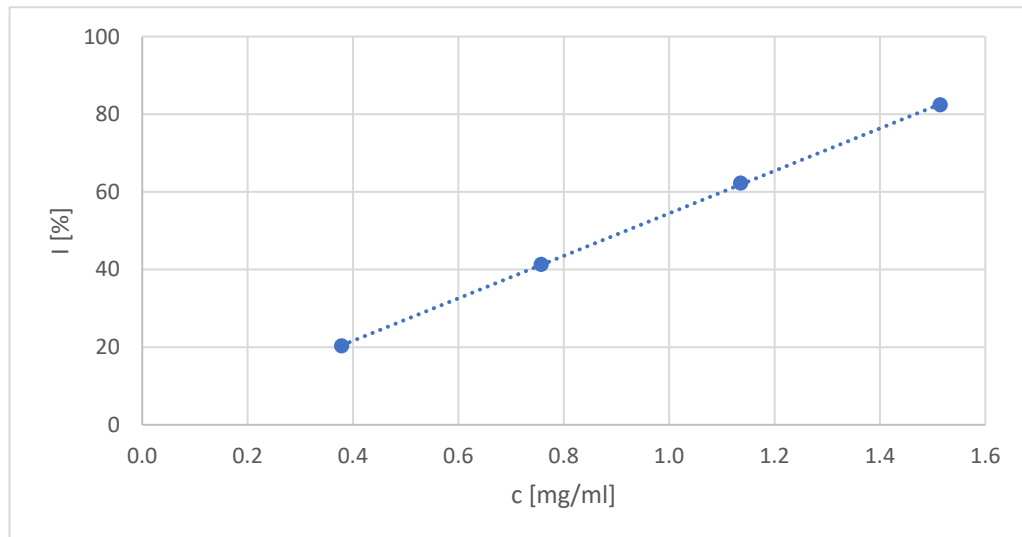
U extraktů z hluchavky květ byla naměřena vyšší AA při extrakční teplotě 95 °C, a to průměrně o 11,5 % více v porovnání s výsledky vzorků po extrakci při nižší teplotě. Průměrná AA je 121,32 mg/g při extrakční teplotě 95 °C, a 108,83 mg/g při extrakční teplotě 80 °C. Od ostatních vzorků se liší pouze vzorek 1 HK, jeho AA při extrakční teplotě 80 °C se pohybuje pod průměrem všech ostatních vzorků, a je o 32,9 % nižší.

Podobně, jako u výsledků ABTS testu, lze konstatovat, že vyšší AA mají vzorky hluchavky pocházející ze sušené části květ než z nati nebo listu, a v průměru je vyšší o 127,5 % při extrakční teplotě 95 °C a o 101,6 % vyšší při nižší extrakční teplotě.

7.2.3 IC50 stanovení

Hodnoty IC50 byly stanoveny u 6 vzorků s nejvyšší antioxidační aktivitou (DPPH test). Jednalo se o vzorky sušené meduňky - 2 SM a 8 SM, o vzorek čerstvé meduňky 1 ČM, dále o vzorky sušené hluchavky z natě 3 HN a 5 HN a vzorek sušené hluchavky květ 2 HK. Vzorky pro toto stanovení byly extrahovány při teplotě 95 °C. Stanovení bylo provedeno

postupem popsaným v kapitole 6.3.2. Grafy zjištěných hodnot inaktivace v závislosti na koncentracích extraktů těchto vzorků jsou zobrazeny na obrázcích 22 - 27.



Obrázek 22 Hodnoty inaktivace extraktů meduňky 2 SM

Rovnice lineární regrese extraktů meduňky 2 SM:

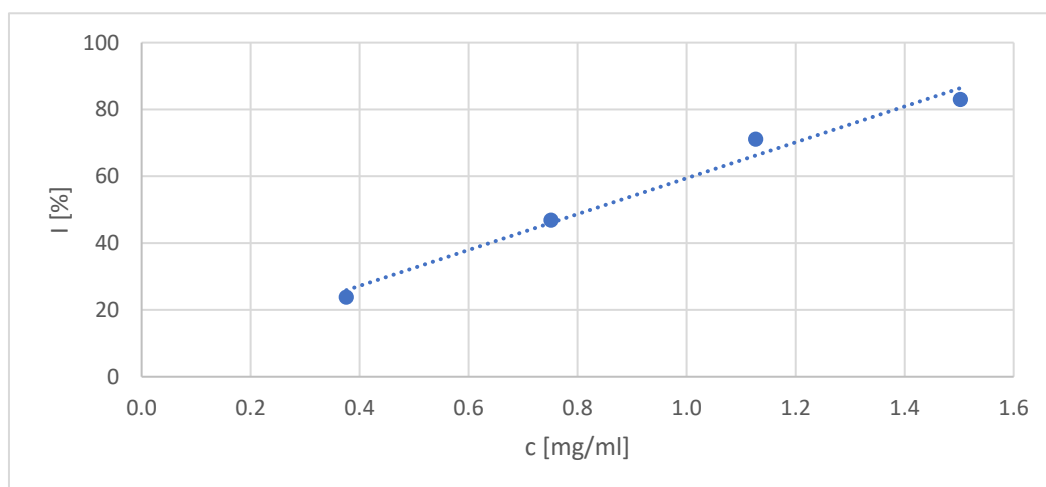
$$y = 54,71 \cdot x - 0,245$$

y – absorbance [1]

x – koncentrace polyfenolů [mg/ml]

Hodnota spolehlivost $R^2 = 0,9999$

Hodnota IC50 pro extrakt meduňky 2 SM byla vypočtena na hodnotu: 0,9184 mg/ml



Obrázek 23 Hodnoty inaktivace extraktů meduňky 8 SM

Rovnice lineární regrese extraktů meduňky 8 SM:

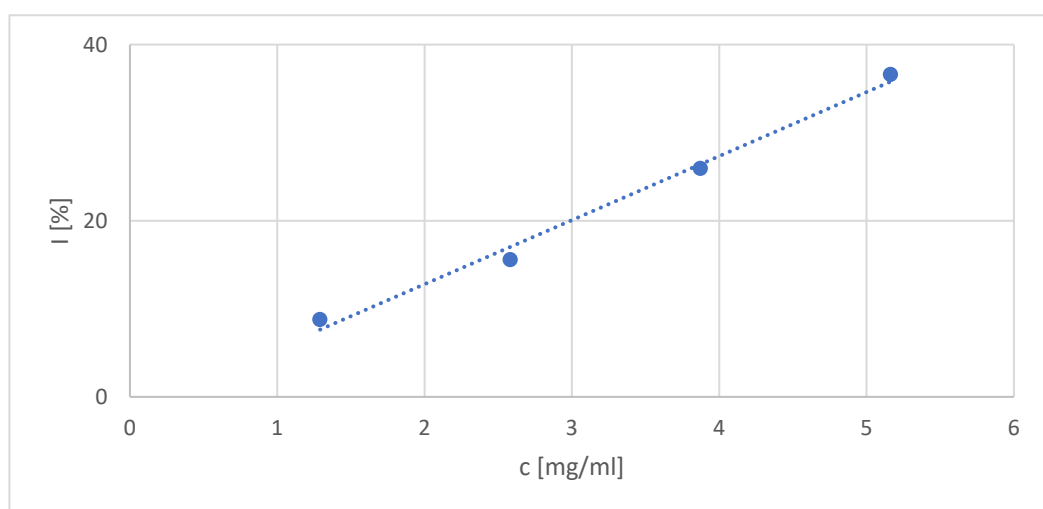
$$y = 53,697 \cdot x + 5,725$$

y – absorbance [1]

x – koncentrace polyfenolů [mg/ml]

Hodnota spolehlivost $R^2 = 0,9806$

Hodnota IC50 pro extrakt meduňky 8 SM byla vypočtena na hodnotu: 0,8245 mg/ml



Obrázek 24 Hodnoty inaktivace extraktů meduňky 1 ČM

Rovnice lineární regrese extraktů meduňky 1 ČM:

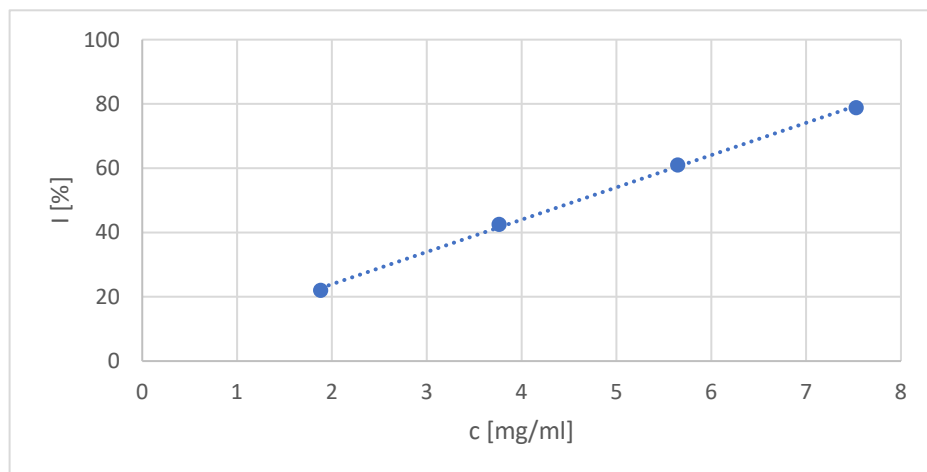
$$y = 7,2717 \cdot x - 1,75$$

y – absorbance [1]

x – koncentrace polyfenolů [mg/ml]

Hodnota spolehlivost $R^2 = 0,9903$

Hodnota IC50 pro extrakt meduňky 1 ČM byla vypočtena na hodnotu: 7,1166 mg/ml



Obrázek 25 Hodnoty inaktivace extraktů hluchavky 3 HN

Rovnice lineární regrese extraktů hluchavky 3 HN:

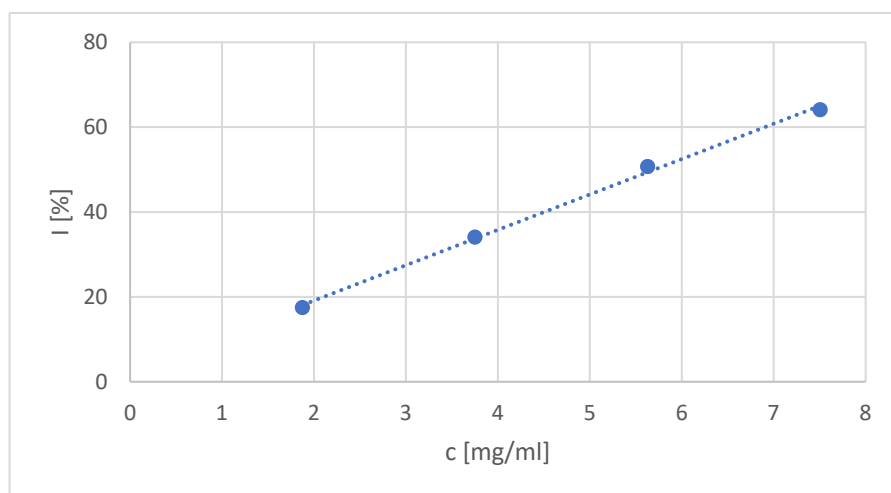
$$y = 10,04 \cdot x + 3,835$$

y – absorbance [1]

x – koncentrace polyfenolů [mg/ml]

Hodnota spolehlivost $R^2 = 0,9989$

Hodnota IC50 pro extrakt hluchavky 3 HN byla vypočtena na hodnotu: 4,5981 mg/ml.



Obrázek 26 Hodnoty inaktivace extraktů hluchavky 5 HN

Rovnice lineární regrese extraktů hluchavky 5 HN:

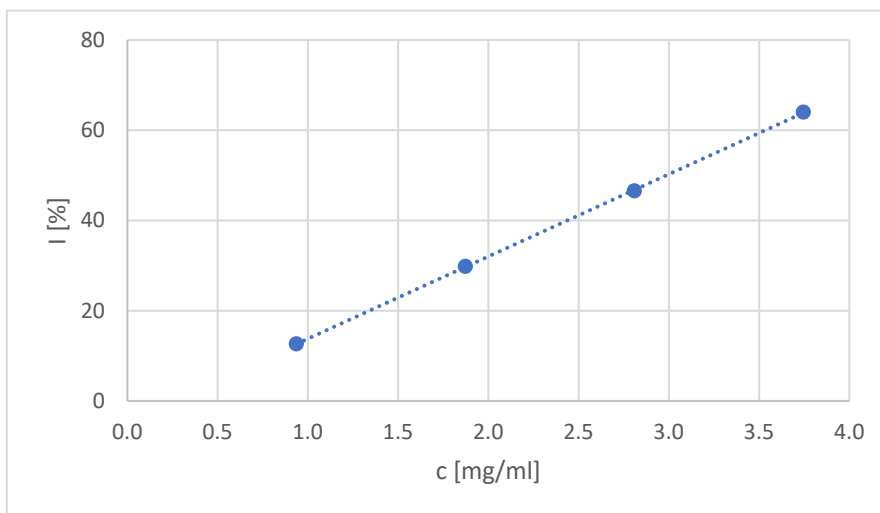
$$y = 8,3368 \cdot x + 2,45$$

y – absorbance [1]

x – koncentrace polyfenolů [mg/ml]

Hodnota spolehlivost $R^2 = 0,9974$

Hodnota IC_{50} pro extrakt hluchavky 5 HN byla vypočtena na hodnotu: 5,7036 mg/ml.



Obrázek 27 Hodnoty inaktivace extraktů hluchavky 2 HK

Rovnice lineární regrese extraktů hluchavky 2 HK:

$$y = 18,235 \cdot x - 4,45$$

y – absorbance [1]

x – koncentrace polyfenolů [mg/ml]

Hodnota spolehlivost $R^2 = 0,9999$

Hodnota IC_{50} pro extrakt hluchavky 2 HK byla vypočtena na hodnotu: 2,9860 mg/ml.

Tabulka 5 Hodnoty IC_{50} vybraných vzorků meduňky a hluchavky ve vzestupném pořadí

Název vzorku	Rovnice lineární regrese	IC_{50} [mg/ml]
8 SM	$y = 53,697 x + 5,725$	0,8245
2 SM	$y = 54,71 x - 0,245$	0,9184
2 HK	$y = 18,235 x - 4,45$	2,9860
3 HN	$y = 10,04 x + 3,835$	4,5981
5 HN	$y = 8,3368 x + 2,45$	5,7036
1 ČM	$y = 7,2717 x - 1,75$	7,1166

Hodnoty IC_{50} jsou uvedeny v tabulce 5. Nejmenší hodnota IC_{50} byla zjištěna u sušených vzorků meduňky, tyto vzorky mají tedy nejvyšší AA. Celkově nejvyšší AA byla zjištěna u vzorku 8 SM. U tohoto vzorku byla stanovena nejvyšší antioxidační aktivita i u metody s ABTS. U stanovení pomocí činidla DPPH byla zjištěna nejvyšší AA u vzorku 2 SM. Tento vzorek má druhou nejvyšší AA u metod IC_{50} a ABTS. Vyšší hodnota IC_{50} byla zjištěna u vzorků sušené hluchavky z částí květ a také nať. Nejvyšší hodnota IC_{50} a tedy nejnížší AA byla zjištěna u extraktu z čerstvého vzorku meduňky. Celkově toto pořadí AA, od nejvyšší po nejnížší, je shodné s výsledky stanovení AA s činidlem ABTS, při stanovení AA s DPPH činidlem jsou v pořadí jen malé odchylky.

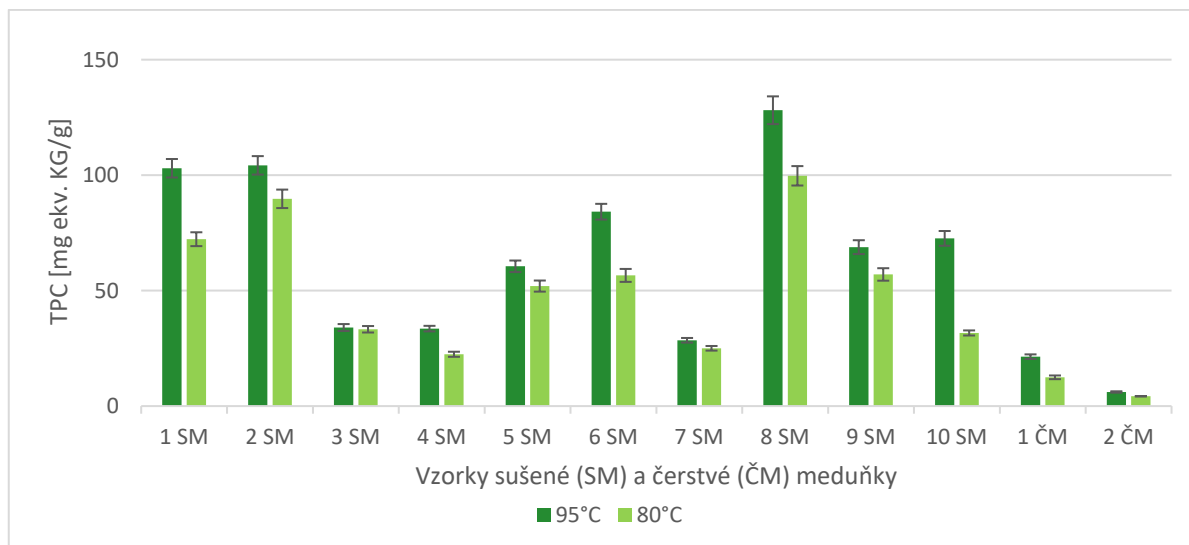
Při porovnání AA u jiných druhů rostlin z čeledi hluchavkovité, ve studii Matkowski A. a kol. [37] byla zjišťována reakce DPPH činidla a metanolového extraktu z hluchavky bílé a dalších rostlin z čeledi hluchavkovité (srdečník obecný, jablečník obecný, bukvice lékařská, hluchavka nachová, konopnice velkokvětá. Z výsledků byla vypočtena hodnota IC_{50} . Nejmenší hodnota IC_{50} a tedy nejvyšší AA byla zjištěna u srdečníku obecného, hluchavky bílé a jablečníku obecného. Nejnížší AA byla zjištěna u bukvice lékařské, hluchavky nachové a konopnici velkokvěté.

7.3 Stanovení celkového obsahu polyfenolů s Folin-Ciocalteuovým činidlem

Celkový obsah polyfenolů s Folin-Ciocalteuovým činidlem byl stanoven u všech vzorků rostlin při dvou extrakčních teplotách, 95 a 80 °C. Vzorky byly připraveny způsobem uvedeným v kapitole 6.1. Stanovení bylo provedeno postupem popsáním v kapitole 6.4. Celkový obsah polyfenolů (TPC) byl vypočítán postupem uvedeným v kapitole 6.4.1. TPC je vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové (KG) v miligramech na gram vzorku.

7.3.1 Stanovení celkového obsahu polyfenolů extraktů meduňky

Celkový obsah polyfenolů s Folin-Ciocalteuovým činidlem extraktů z meduňky byl stanoven celkem u 10 vzorků sušené meduňky a 2 vzorků čerstvé meduňky. Na obr. 28 jsou výsledky stanovení celkového počtu polyfenolů.



Obrázek 28 TPC sušených a čerstvých vzorků meduňky

Vyšší celkový obsah polyfenolů sušených vzorků meduňky byl zjištěn po působení vyšší extrakční teploty, a to o 32,9 %. Průměrný TPC extraktů sušených vzorků meduňky je 71,75 mg kyseliny gallové na gram vzorku při extrakční teplotě 95 °C. U extrakce při nižší teplotě je průměrný obsah TPC u sušených vzorků 53,97 mg/g. Nejmenší TPC byl zjištěn u sušeného vzorku meduňky 7 SM, v porovnání s průměrem ostatních vzorků je tato hodnota o 60,3 % menší při vyšší extrakční teplotě, a o 53,6 % menší při nižší extrakční teplotě. V tomto vzorku pocházejícím z Polska, vyrobeném z celé nadrcené rostliny, bylo zjištěno větší množství různých částí dané rostliny. Mnohem nižší TPC byl zjištěn u čerstvých vzorků, a to průměrně 13,75 mg/g při vyšší extrakční teplotě, přičemž tato hodnota je o 80,8 % nižší než u sušených vzorků. Při nižší extrakční teplotě byla průměrná hodnota 8,35 mg/g, což je o 84,5 % nižší než u sušených vzorků, a to i z důvodu obsahu vyššího množství vody v těchto vzorcích. V rámci hodnocení TPC této rostliny byl i vzorek sušené meduňky 6 SM, v Bio kvalitě. TPC vzorku se pohybovala nad průměrem všech vzorků sušené meduňky, a to o 17,3 % více při vyšší extrakční teplotě, a o 4,9 % více při nižší extrakční teplotě. Další vzorek sušené meduňky, 10 SM, na rozdíl od zbývajících, pochází z domácího pěstitelství. TPC vzorku se pohybuje u hodnoty průměru TPC všech získaných extraktů při teplotě 95 °C. Naopak při extraktech získaných při nižší teplotě 80 °C se TPC tohoto vzorku pohybuje pod průměrem TPC všech získaných vzorků, a to o 41,3 %.

Vzorky sušených rostlin meduňky pocházejí z dvou částí rostlin, z natě (1-5 SM) a listu (6, 8-10 SM). Průměrný TPC u sušených rostlin z části natě je 67,06 mg/g při extrakční teplotě 95 °C, z části list je 88,43 mg/g. Průměrná AA je tedy vyšší u vzorků obsahujících listy rostliny, a to o 31,9 %.

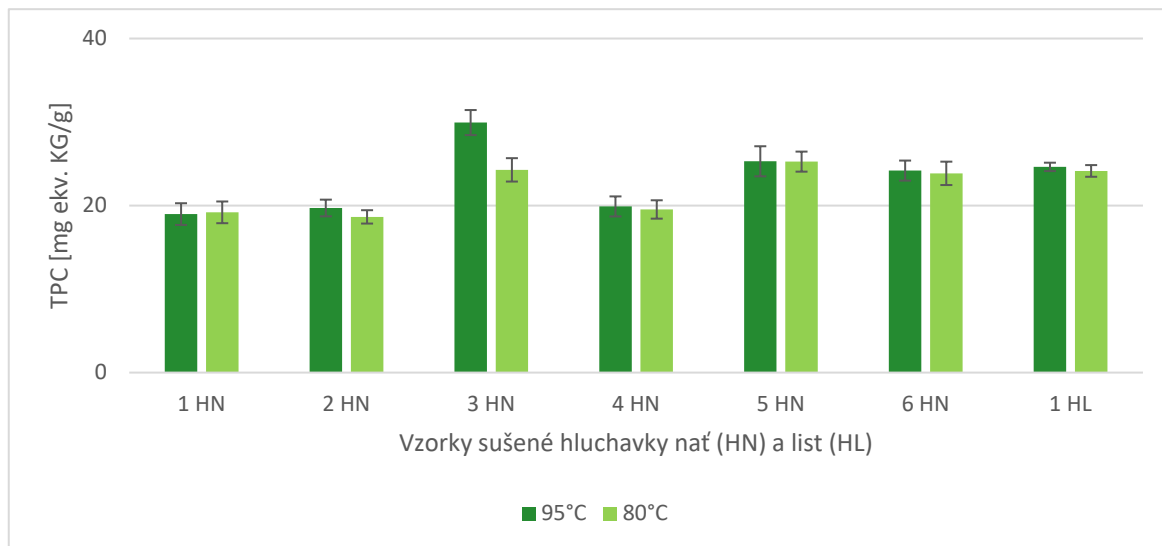
Vyšší celkový obsah polyfenolů čerstvých vzorků meduňky byl zjištěn u vzorku z domácího pěstitelství (1 ČM), a to při obou extrakčních teplotách než u vzorku z tržní sítě. TPC tohoto vzorku byl o 250,7 % vyšší při vyšší extrakční teplotě, a o 193,2 % vyšší při nižší extrakční teplotě, oproti druhému vzorku čerstvé meduňky.

Ve studii Palamuğlu a kol. [36] byl zjišťován celkový obsah polyfenolů ve vodných extraktech meduňky lékařské, které byly získány při různých extrakčních teplotách. Nejvyšší obsah TPC byl zaznamenán v extraktech připravených při 95 °C, při nejdelším extrakčním čase 4 minuty. Dále bylo pozorováno, že vyšší množství TPC bylo u sušených vzorků meduňky mající jemnější texturu z důvodu mletí vzorků než u vzorků bez mletí. Dle Carvalho a kol. [4] bylo zjištěno že esenciální olej prokázal lepší antimikrobiální účinek než vodný nebo ethanolový extrakt z meduňky. Výjimkou jsou pouze bakterie *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*, u kterých byl pozorován vyšší antimikrobiální účinek u vodných extraktů než u ethanolových. V rámci studie s využitím superkritické extrakce v publikaci Ribeiro a kol. [10] byla zjištěna nejvyšší množství fenolových sloučenin u extraktů při 10 MPa, teplotě 50 °C a čase 30 min.

Dle článku De Oliveira a kol. [38] mohou agronomické postupy výrazně ovlivnit chemický profil a bioaktivitu extraktů z meduňky lékařské. Při zkoumání celkového obsahu fenolických látek byl zjištěn vyšší obsah u rostlin s vodním deficitem. Tato studie nepotvrdila vyšší obsah celkových fenolických látek u ekologicky pěstovaných rostlin.

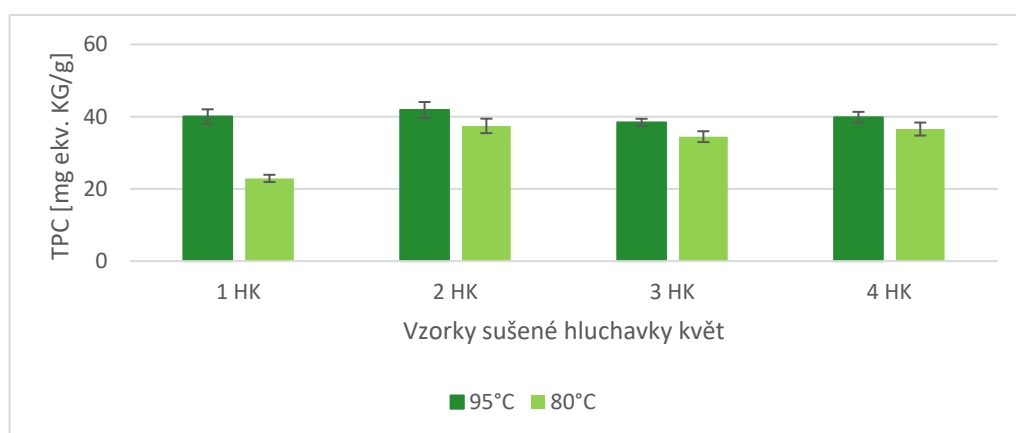
7.3.2 Stanovení celkového obsahu polyfenolů extraktů hluchavky

Celkový obsah polyfenolů metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem byl zjišťován celkem u 7 vzorků sušené hluchavky z části rostliny nať a list a u 4 vzorků sušené hluchavky z části květ. Na obr. 29 a 30 jsou výsledky stanovení.



Obrázek 29 TPC sušených vzorků hluchavky nať a list

Průměrný celkový obsah polyfenolů u sušených vzorků hluchavky při vyšší a nižší extrakční teplotě se od sebe téměř neliší. Od ostatních vzorků se liší vzorek 3 HN, kdy jeho TPC je o 23,4 % vyšší než průměrná hodnota TPC všech vzorků při extrakční teplotě 95 °C. Jedná se o vzorek hluchavky z nati původem z České republiky. Z domácího pěstitelství pochází vzorek 1 HL, přičemž jeho AA se také pohybuje okolo průměru hodnot ze všech získaných extraktů při obou extrakčních teplotách.



Obrázek 30 TPC sušených vzorků hluchavky květ

U extraktů z hluchavky květ byl naměřen vyšší obsah polyfenolů při extrakční teplotě 95 °C, a to průměrně o 25 % více v porovnání s výsledky vzorků po extrakci při nižší teplotě.

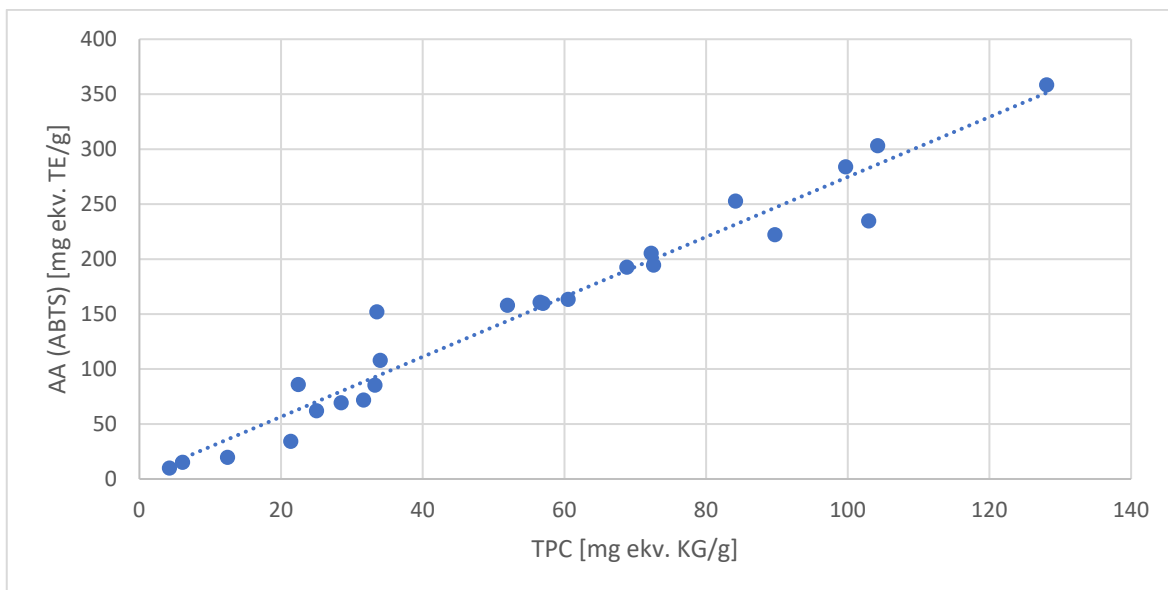
Průměrná AA je 40,04 mg/g při extrakční teplotě 95 °C a 32,84 mg/g při extrakční teplotě 80 °C. Od ostatních vzorků se liší vzorek 1 HK, jeho TPC se pohybuje pod průměrem všech ostatních vzorků, a to o 29,5 % méně při extrakční teplotě 80 °C.

Lze konstatovat, že vyšší obsah polyfenolů mají vzorky pocházející ze sušené části květ, v průměru mají hodnoty vyšší o 72,4 % při extrakční teplotě 95 °C, a o 48,4 % vyšší při nižší extrakční teplotě.

Pereira O. a kol. [13] prováděli stanovení TPC u etalonových extraktů hluchavky bílé. Stanovení bylo provedeno ze sušené rostliny, a to ze směsi částí nať, list a květ. Výsledky jsou uvedeny jako ekvivalent kyseliny gallové na gram sušené hmotnosti rostlinného materiálu. Celkový obsah polyfenolů je 24,24 mg/g vzorku. Průměr našeho stanovení TPC ze všech částí hluchavky je 29,34 mg/g při vyšší extrakční teplotě. Ve článku Matkowski A. a kol. [37] byl zjištěn u etanolových extraktů TPC 32,8 mg/g. Odlišnost může být způsobena jiným postupem extrakce a jiným extrakčním činidlem, dále jinými agronomickými podmínkami.

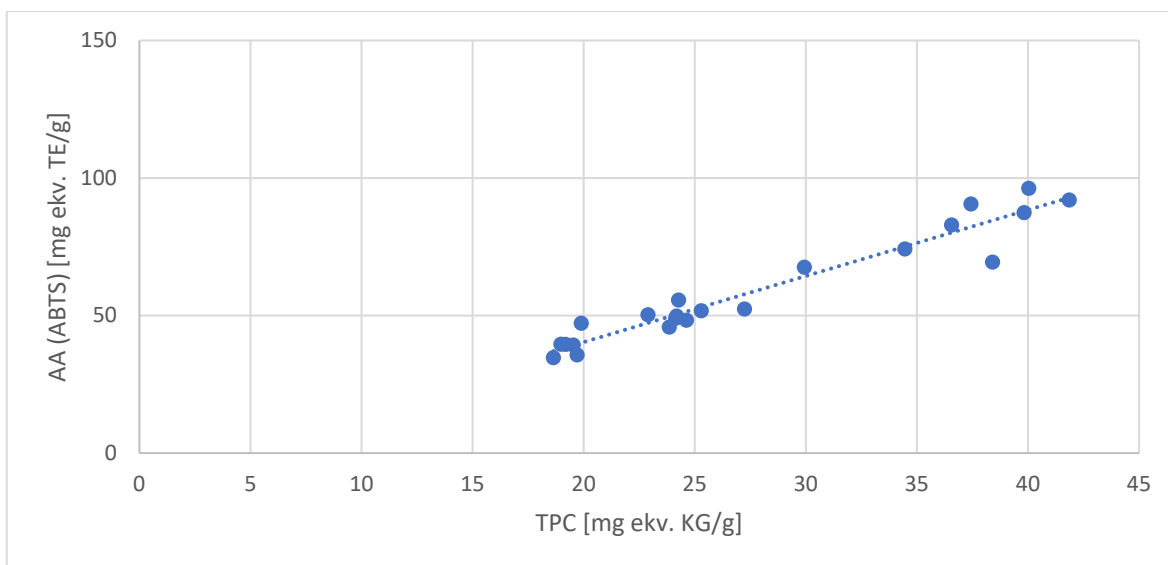
7.4 Korelační analýza

Pro zjištění vzájemných vztahů mezi antioxidační aktivitou (AA) a celkovým obsahem polyfenolů (TPC) u obou metod stanovení, s činidly ABTS a DPPH, byla provedena korelační analýza s určením hodnot korelačních koeficientů. Na obr. 31 – 34 jsou znázorněny závislosti vytvořené z hodnot AA a TPC u všech extraktů bylin. Hodnoty všech určených korelačních koeficientů jsou uvedeny v tab. 6.



Obrázek 31 Závislost AA (ABTS) na TPC pro extrakty meduňky při teplotách 80 a 95 °C

Korelační koeficient $R=0,9770$



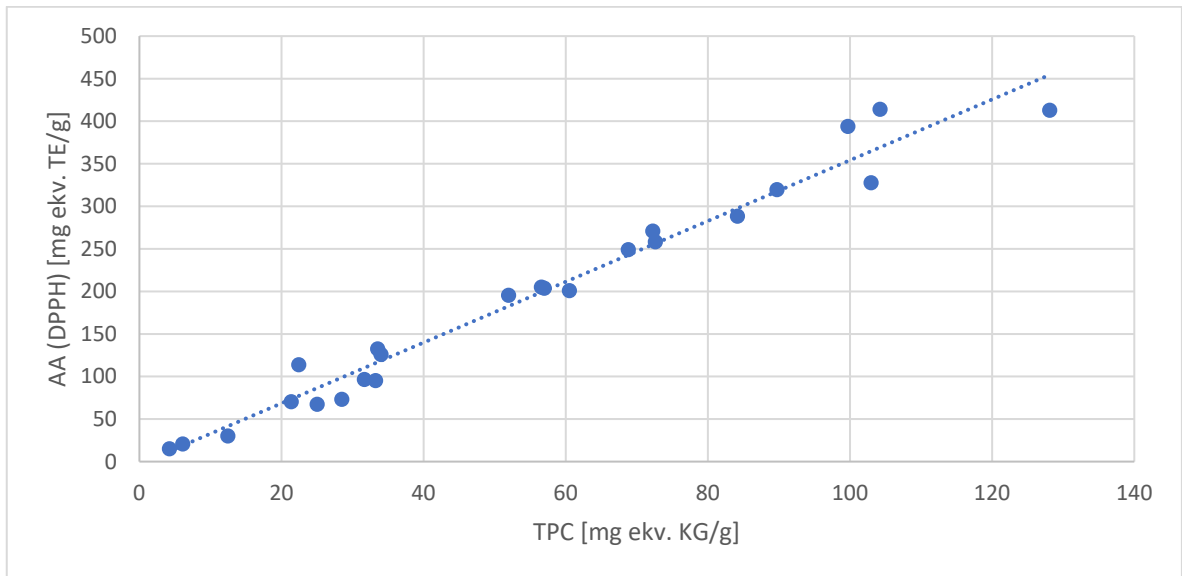
Obrázek 32 Závislost AA (ABTS) na TPC pro extrakty hluchavky při teplotách 80 a 95 °C

Korelační koeficient $R=0,9666$

Při porovnání korelací mezi výsledky AA (ABTS) a TPC u všech vzorků meduňky byla zjištěna vysoká hodnota korelačního koeficientu, 0,9770. Tato hodnota je kladná, jde tedy o kladnou lineární závislost. Podobný výsledek byl stanoven i při výpočtu korelačního koeficientu mezi AA, stanovenou pomocí ABTS, a TPC u všech vzorků hluchavky, kde je

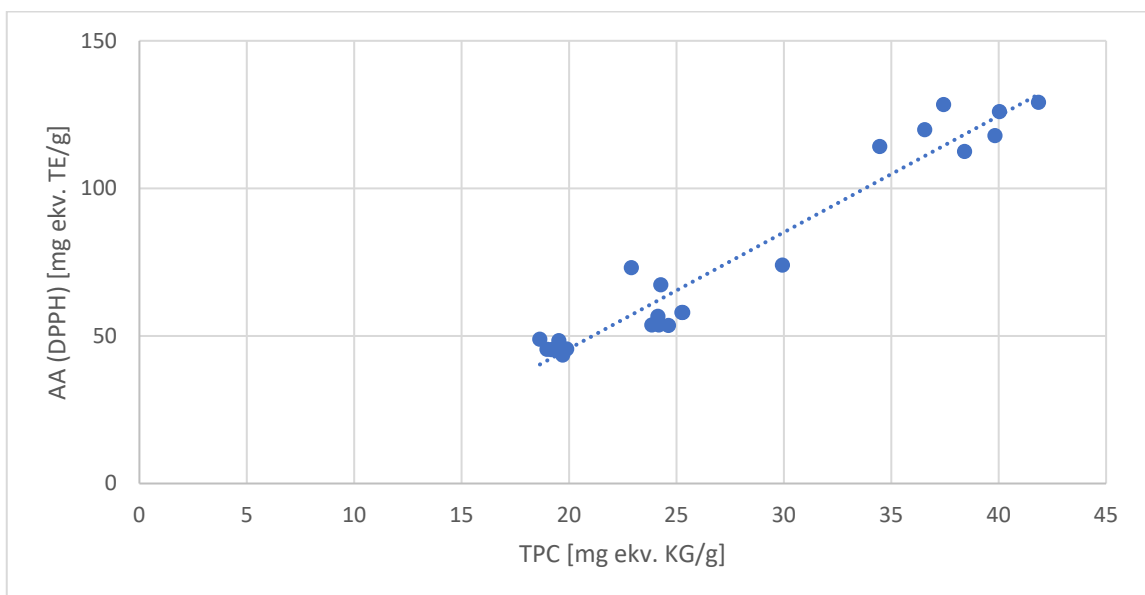
hodnota tohoto koeficientu 0,9666. I tato hodnota je kladná a vysoká, i v tomto případě se jedná o kladnou lineární závislost.

Lze tedy konstatovat, že AA (měřená metodou ABTS) těchto vzorků je ve velké míře závislá na přítomném množství polyfenolických látek.



Obrázek 33 Závislost AA (DPPH) na TPC pro extrakty meduňky při teplotách 80 a 95 °C

Korelační koeficient $R=0,9847$



Obrázek 34 Závislost AA (DPPH) na TPC pro extrakty hluchavky při teplotách 80 a 95 °C

Korelační koeficient $R=0,9638$

Hodnoty korelačních koeficientů jsou uvedeny v tabulce 6. Korelace mezi výsledky AA, stanovené metodou DPPH a TPC, u všech vzorků meduňky byl zjištěn korelační koeficient 0,9847. Tato hodnota je vysoká a kladná, jde tedy o kladnou lineární závislost. Při porovnání korelace mezi výsledky AA (DPPH) a TPC u všech vzorků hluchavky byly podobné jako u meduňky. Korelační koeficient je 0,9638 i v tomto případě se jedná o kladnou lineární závislost.

Z vysokých korelačních koeficientů těchto vzorků lze konstatovat, že AA měřena metodou DPPH je závislá na přítomném množství polyfenolických látek.

Tabulka 6 Hodnoty korelačních koeficientů v sestupném pořadí

Korelace	Vzorky	Korelační koeficient
DPPH a TPC	Meduňka	0,9847
ABTS a TPC	Meduňka	0,9770
ABTS a TPC	Hluchavka	0,9666
DPPH a TPC	Hluchavka	0,9638

Z velikostí korelačních koeficientů lze usoudit, že vyšší závislost AA na přítomném množství polyfenolických látek je u extraktů z meduňky než u extraktů z hluchavky.

Miraj a kol. [3] zkoumali korelaci mezi antioxidační aktivitou a celkovým obsahem polyfenolů meduňky lékařské, kde bylo zjištěno, že AA sušených vzorků meduňky je přisuzována také hlavně polyfenolům. Ke stejnému závěru došli i Zheng a kol. [20]. V této studii byly zkoumány extrakty z čerstvých vzorků meduňky.

7.5 Stanovení vybraných fenolických látek metodou HPLC/DAD

U 6 extraktů vzorků rostlin s nejvyšší nebo nejnižší antioxidační aktivitou (sušená meduňka - 2 SM a 8 SM, čerstvá meduňky 1 ČM, sušená hluchavka list 3 HL a 5 HL, sušená hluchavka květ 2 HL), které byly extrahovány při teplotě 95 °C, bylo stanoveno 22 vybraných významných fenolických látek. Vzorky byly připraveny způsobem uvedeným v kapitole 6.1. Stanovení bylo provedeno postupem popsáním v kapitole 6.3. Obsah fenolických látek byl vypočítán postupem uvedeným v kap 6.5.1. a byl uveden jako obsah látky v µg na gram vzorku. Výsledky obsahu fenolických látek jsou uvedeny v tabulce 7. Ukázka chromatogramu je na obr. 35.

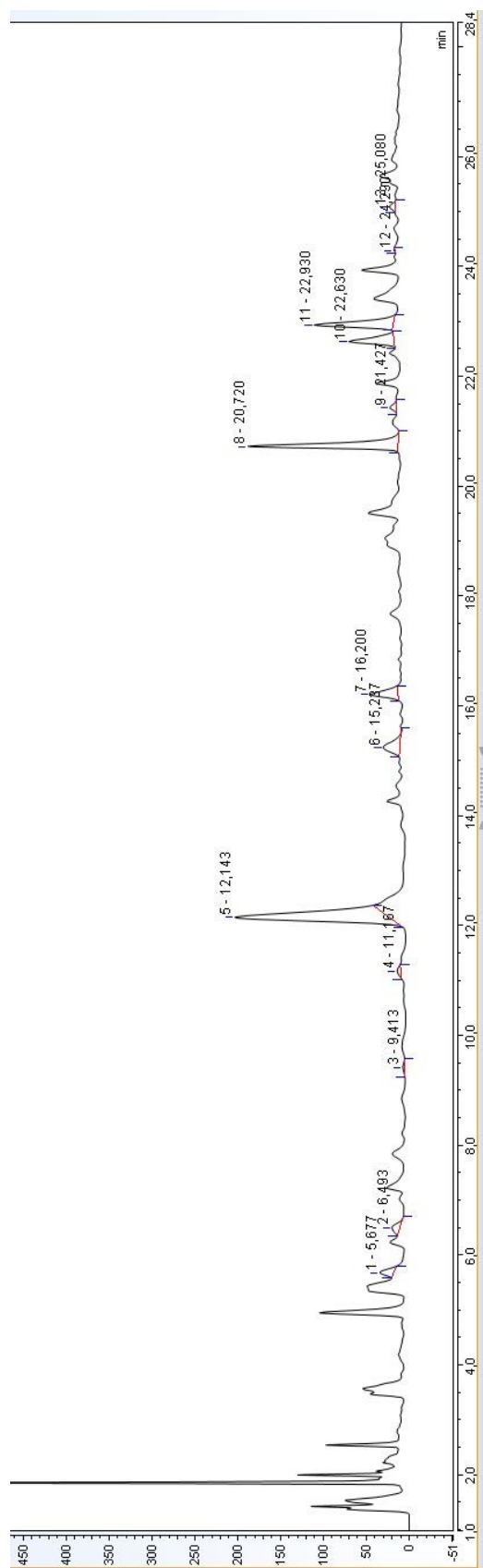
Mezi fenolické látky, které nebyly detekovány v žádném ze vzorků patří: epigallocatechin, kyselina chlorogenová a kaempferol. V malém množství nebo v minimálním množství byly detekovány: kyselina gallová, kávová, *trans-p*-kumarová a *trans*-skořicová. Nejvíce zjištěných fenolických látek bylo ve vzorcích sušené meduňky 8 SM (15 fenolických látek) a sušené hluchavky z části nať 3 HN (13 fenolických látek). U těchto vzorků byla také, v souladu s těmito výsledky, stanovena nejvyšší AA oběma metodami s činidly ABTS a DPPH. Nejméně zjištěných fenolických látek bylo ve vzorcích sušené meduňky 7 SM (9 fenolických látek), sušené hluchavky z části list 1 HL (11 fenolických látek) a sušené hluchavky z části květ 2 HK (11 fenolických látek). U extraktu z čerstvé meduňky pocházející z domácího pěstitelství (1 ČM) byly detekovány 3 fenolické látky. Tento vzorek obsahoval nejvíce epikatechinu. V extraktech ze sušených vzorků meduňky (7 SM a 8 SM) byla nejvíce detekována kyselina sinapová, etylester kyseliny *trans*-hydroxyskořicové, resveratrol a rutin. Vzorek 8 SM obsahoval o 3,6 % více fenolických látek než vzorek 7 SM. V extraktech ze sušených vzorků hluchavek z části nať a list (3 HN a 1 HL) bylo nejvíce detekováno kyseliny protokatechové, neochlorogenové, vanilové, syringové, ferrulové sinapové a elagové, dále pak katechinu, epikatechinu a rutinu. Vzorek 3 HN obsahoval o 24,78 % více fenolických látek, nejvíce bylo detekováno katechinu, a to v množství 1601,9 µg/g. Extrakt ze sušené hluchavky květ neobsahoval oproti extraktu z natě a listu epikatechin a kyselinu ferrulovou. Vzorek obsahoval velké množství kyseliny vanilové (529,6 µg/g) a rutinu (1150,4 µg/g).

V rámci porovnání mezi sušenými vzorky meduňky a hluchavky bylo v extraktech hluchavky detekováno větší množství vybraných fenolických látek.

V publikaci Pereira a kol. [35] byly v meduňce analyzovány fenolické látky metodou HPLC. Vodné extrakty byly získány vylouhováním v horké vodě. Zjištěny byly především kyselina gallová, chlorogenová, kávová, ellagová, katechin, epikatechin, kvercetin a rutin. Ve vodných extraktech meduňky byly detekovány všechny uvedené fenolické látky, v nejvyšším množství kyselina kávová a gallová, poté kyselina ellagová, kvercetin a kyselina chlorogenová. Při porovnání s námi získanými výsledky byly zjištěny podobné, v extraktech sušené meduňky byly stanoveny všechny fenolické látky kromě kyseliny chlorogenové. Ve studii Sulborska a kol. [12] bylo metodou HPLC v květu hluchavky bílé detekováno několik fenolických látek, a to kyselina protokatechová, vanilová, kávová, syringová, gallová, gentisová, *trans-p*-kumarová a chlorogenová, ve stopovém množství pak kyselina ferulová.

Tyto výsledky se téměř shodují s výsledky získanými z našich vzorků. Ve vzorku 2 HK nebyla zjištěna kyselina kávová, *trans-p*-kumarová, chlorogenová, gentisová a ferulová.

Jako vzorový chromatogram (obr. 36) je uvedeno stanovení fenolických látek ve vzorku hluchavky nat' (3 HN), kde bylo detekováno 13 fenolických látek (viz. obr.xx) s retenčními časy: kyselina protokatechová (5,98 min.), kyselina neochlorogenová (6,49 min.), kyselina 4-hydroxybenzoová (9,41 min.), Katechin (11,17 min.), kyselina vanilová (12,29 min.), kyselina syringová (15,29 min.), epikatechin (16,20 min.), kyselina ferulová (20,72 min.), kyselina sinapová (21,43 min.), kyselina elagová (22,63 min.), rutin (22,63 min.), kyselina t-hydroxyskořicová (24,29 min.), etylester kyseliny protokatechové (25,08 min.).



Obrázek 35 Chromatogram stanovení fenolických látek pomocí HPLC/DAD u vzorku 3 HN

Tabulka 7 Obsah vybraných fenolických látek ve vzorcích meduňky a hluchavky stanovených metodou HPLC/DAD

	Fenolické látky	Obsah fenolických látek [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]													
		7 SM	S	8 SM	S	1 ČM	S	3 HN	S	1 HL	S	2 HK	S		
1	Kyselina gallová	N.D.	-	1,2	0,2	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	5,3	0,0
2	Kyselina protokatechová	2,1	0,1	13,2	4,4	N.D.	-	53,8	0,9	63,56	5,14	24,0	1,9		
3	Kyselina neochlorogenová	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	68,1	1,6	120,84	2,07	40,3	0,8		
4	Kyselina 4-hydroxybenzoová	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	5,0	0,0	12,79	0,64	N.D.	-		
5	Epigallokatechin	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-		
6	Katechin	N.D.	-	14,6	2,1	N.D.	-	45,1	0,0	178,63	1,77	N.D.	-		
7	Kyselina vanilová	2,7	0,2	7,6	1,0	N.D.	-	491,6	5,9	57,40	0,27	529,6	3,5		
8	Kyselina chlorogenová	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-		
9	Kyselina kávová	0,9	0,1	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-		
10	Kyselina syringová	N.D.	-	4,4	0,2	N.D.	-	57,8	-	594,29	5,70	16,3	0,9		
11	Epikatechin	N.D.	-	9,7	0,9	47,3	1,3	205,2	2,1	1601,9	7,1	N.D.	-		
12	Kyselina <i>t-p</i> -kumarová	N.D.	-	1,5	0,0	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-		
13	Kyselina ferrulová	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	323,9	3,7	166,8	3,6	N.D.	-		
14	Kyselina sinapová	239,7	4,4	8,3	0,1	N.D.	-	31,3	1,2	48,6	3,8	15,2	0,1		
15	Kyselina elagová	ND	-	1,5	0,1	1,1	0,1	212,4	5,1	N.D.	-	13,3	0,3		
16	Rutin	0,8	0,0	20,2	0,5	N.D.	-	434,1	2,8	271,0	0,0	1150,4	2,3		
17	Kyselina <i>t</i> -hydroxykoičová	0,7	0,0	64,5	0,0	0,4	0,0	0,4	0,0	N.D.	-	5,1	0,1		
18	Etylester	0,9	0,1	75,3	2,0	N.D.	-	20,4	0,2	8,20	0,05	3,2	0,1		
19	Resferatrol	0,7	0,1	24,5	0,7	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-		
20	Kyselina <i>t</i> -skořicová	N.D.	-	4,1	0,1	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-		
21	Kaempferol	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-		
22	Kvercetin	2,6	0,3	9,9	0,3	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	4,8	2,2		

N.D – nedetekováno, s – směrodatná odchylka

8 ZÁVĚR

Meduňka lékařská (*Melissa officinalis*) a hluchavka bílá (*Lamium album*) jsou rostliny obsahující velké množství biologicky aktivních látek, které působí antimikrobiálně, antioxidačně a mají i další významné účinky. Díky přítomným antioxidantům dochází k redukci volných radikálů způsobující poškození tkáně a ochraně před některými onemocněními. Tyto rostliny vykazují antioxidační účinky především díky přítomnosti fenolických sloučenin.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit antioxidační aktivitu a polyfenolické látky v extraktech ze vzorků meduňky lékařské a hluchavky bílé. Extrakty byly připraveny celkem ze 23 vzorků, sušených i čerstvých rostlin, z částí nať, list a květ, při dvou teplotách extrakce, 80 °C a 95 °C

Bylo zjištěno, že extrakty připravené při vyšší extrakční teplotě mají všeobecně vyšší antioxidační aktivitu i celkový obsah polyfenolů. U extraktů z meduňky byly tyto hodnoty vyšší v průměru o 32,3 %. U extraktů z hluchavky z části nať a list jsou tyto rozdíly mezi teplotami nevýznamné. Naopak u extraktů z hluchavky z části květ jsou tyto hodnoty o 17,5 % vyšší při extrakční teplotě 95 °C.

Extrakty pocházející ze sušených vzorků meduňky z ekologického zemědělství vykazovaly vyšší antioxidační aktivitu při obou metodách měření, i vyšší celkový obsah polyfenolů oproti průměru AA i TPC ze všech získaných vzorků sušené meduňky, a to v průměru až o 19,4 %. Extrakty získané z čerstvé meduňky měly nižší AA i TPC oproti sušeným vzorkům i z důvodu obsahu vyššího množství vody. Vzorky sušené meduňky pocházely ze dvou částí rostliny, a to nať a list. Při měření AA i TPC byly stanoveny vyšší hodnoty u části list, a to v průměru o 29 % více než extrakty připravené z natě. Vyšší antioxidační aktivita a vyšší celkový obsah polyfenolů byly naměřeny u extraktů ze sušené hluchavky z části květ v porovnání s extrakty ze sušené hluchavky z částí nať a list.

Mezi AA a TPC byla zjištěna vysoká korelace u všech extraktů. Ze zjištěných výsledků lze konstatovat, že AA (měřená metodou ABTS i DPPH) vzorků je z velké části závislá na přítomném množství polyfenolických látek.

V rámci analýzy fenolických látek metodou HPLC/DAD bylo zjištěno, že v extraktech pocházejících ze sušené meduňky se nachází nejvíce kyseliny sinapové, etylesteru kyseliny protokatechové a kyseliny *trans*-hydroxyskořicové. Při porovnání mezi extrakty ze sušené meduňky a hluchavky (nať, list a květ) je zastoupení nejvíce obsažených kyselin odlišné.

Extrakty ze sušené hluchavky z částí nať a list obsahují epikatechin, kyselinu syringovou a rutin, na rozdíl extrakty ze sušené hluchavky z části květ obsahují rutin, kyselinu vanilovou a protokatechovou.

Zjištěné výsledky u extraktů meduňky a hluchavky mohou být ovlivněny několika faktory zahrnujícími jejich přípravu, například extrakční teplotu, dále odrůdou, podmínkami pěstování i použitou částí rostliny vzorků. Agronomické postupy mohou také výrazně ovlivnit chemický profil a bioaktivitu extraktů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SALEHI, Bahare; ARMSTRONG, Lorene; RESCIGNO, Antonio; YESKALIYEVA, Balakyz; SEITIMOVA, Gulnaz et al., 2019. Lamium Plants—A Comprehensive Review on Health Benefits and Biological Activities: Anatomical, Histochemical, and Phytochemical Study. Online. *Molecules*. Roč. 24, č. 10, s. 5165-5170. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24101913>.
- [2] ALOSAIMI, Areej A., 2023. Petiole anatomy of selected species in family Lamiaceae and its systematic relevance. Online. *Flora*. Roč. 306. ISSN 03672530. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2023.152367>.
- [3] MIRAJ, Sepide; RAFIEIAN-KOPAEI, Shiow Y. a KIANI, Sara, 2017. Melissa officinalis L: A Review Study With an Antioxidant Prospective. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Roč. 22, č. 3, s. 385-394. ISSN 2156-5872. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/2156587216663433>.
- [4] CARVALHO, Filomena; DUARTE, Ana P. a FERREIRA, Susana, 2021. Antimicrobial activity of Melissa officinalis and its potential use in food preservation. Online. *Food Bioscience*. Roč. 44. ISSN 22124292. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101437>.
- [5] SHAKERI, Abolfazl; SAHEBKAR, Amirhossein a JAVADI, Behjat, 2016. Melissa officinalis L. – A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Online. *Journal of Ethnopharmacology*. Roč. 188, s. 204-228. ISSN 03788741. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010>.
- [6] *Ipavelvana: Meduňka lékařská*. Online. In: Dostupné z: <https://www.ipavelvana.eu/cs/content/41-medunka-lekarska>.
- [7] LOBACH, Alexandra R.; SCHMIDT, Florian; FEDRIZZI, Davide a MÜLLER, Severin, 2024. Toxicological safety evaluation of an aqueous lemon balm (Melissa officinalis) extract: A Review Study With an Antioxidant Prospective. Online. *Food and Chemical Toxicology*. Roč. 187, č. 3, s. 385-394. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.114565>.
- [8] MOHASSELI, Vahid; FARBOOD, Farzad; MORADI, Abolfath a MÜLLER, Severin, 2020. Antioxidant defense and metabolic responses of lemon balm (Melissa officinalis L.)

to Fe-nano-particles under reduced irrigation regimes. Online. *Industrial Crops and Products*. Roč. 149. ISSN 09266690.

[9] DASTMALCHI, Keyvan; DAMIEN DORMAN, H.J.; OINONEN, Päivi P.; DARWIS, Yusrida; LAAKSO, Into et al., 2008. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. Online. *LWT - Food Science and Technology*. Roč. 41, č. 3, s. 391-400. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.007>.

[10] RIBEIRO, M.A; BERNARDO-GIL, M.G a ESQUÍVEL, M.M, 2001. *Melissa officinalis*, L: study of antioxidant activity in supercritical residues. Online. *The Journal of Supercritical Fluids*. Roč. 21, č. 1, s. 51-60. ISSN 08968446. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(01\)00078-X](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(01)00078-X).

[11] GHALKHANI, Atieh; MORADKHANI, Shirin; SOLEIMANI, Meysam a DASTAN, Dara, 2021. Functional components, antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities of *Lamium garganicum* L. ssp. *pictum* as a novel natural agents from lamiaceae family. Online. *Food Bioscience*. Roč. 43. ISSN 22124292. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101265>.

[12] SULBORSKA, Aneta; KONARSKA, Agata; MATYSIK-WOŹNIAK, Anna; DMITRUK, Marta; WERYSZKO-CHMIELEWSKA, Elżbieta et al., 2020. Phenolic Constituents of *Lamium album* L. subsp. *album* Flowers: Anatomical, Histochemical, and Phytochemical Study. Online. *Molecules*. Roč. 25, č. 24, s. 385-394. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25246025>.

[13] PEREIRA, Olívia R.; DOMINGUES, Maria R.M.; SILVA, Artur M.S. a CARDOSO, Susana M., 2012. Phenolic constituents of *Lamium album*: Focus on isoscutellarein derivatives. Online. *Food Research International*. Roč. 48, č. 1, s. 330-335. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.04.009>.

[14] Český rozhlas: *Hluchavka bílá*. Online. In:. Dostupné z: <https://temata.rozhlas.cz/hluchavka-bila-7948193>.

[15] PADUCH, Roman; WÓJCIAK-KOSIOR, Magdalena a MATYSIK, Grażyna, 2007. Investigation of biological activity of *Lamii albi* flos extracts: an overview. Online. *Journal of Ethnopharmacology*. Roč. 110, č. 1, s. 69-75. ISSN 03788741. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.004>.

- [16] YASHIN, Alexander; YASHIN, Yakov; XIA, Xiaoyan a NEMZER, Boris, 2017. Antioxidant Activity of Spices and Their Impact on Human Health: A Review. Online. *Antioxidants*. Roč. 6, č. 3. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox6030070>.
- [17] ROJAS, Janne a BUITRAGO, Alexis, 2019. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship With Prevention of Neurodegenerative Diseases. Online. *Bioactive Compounds*. S. 3-31. ISBN 9780128147740. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00001-3>.
- [18] BALASUNDRAM, Nagendran; SUNDRAM, Kalyana a SAMMAN, Samir, 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Online. *Food Chemistry*. Roč. 99, č. 1, s. 191-203. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>.
- [19] SHI, Linghong; ZHAO, Wanrong; YANG, Zihong; SUBBIAH, Vignasini a SULERIA, Hafiz Ansar Rasul, 2022. Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. Online. *Environmental Science and Pollution Research*. Roč. 29, č. 54, s. 81112-81129. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23337-6>.
- [20] ZHENG, Wei a WANG, Shiow Y., 2001. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001-11-01, roč. 49, č. 11, s. 5165-5170. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf010697n>.
- [21] VELÍŠEK, Jan, 1999. *Chemie potravin* 3. 1. OSSIS. ISBN 80-902391-5-6.
- [22] SHEIKHIAN, Leila a JAMALIFARD, Yasaman, 2022. Multi-walled carbon nanotube-based dispersive solid phase extraction with following back-extraction for HPLC/UV determination of Rosmarinic acid in lemon balm and Rosemary plant samples. Online. *Journal of the Indian Chemical Society*. Roč. 99, č. 8. ISSN 00194522. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100595>.
- [23] AKHLAGHIPOUR, Iman; NASIMI SHAD, Arya; ASKARI, Vahid Reza; MAHARATI, Amirhosein a BARADARAN RAHIMI, Vafa, 2023. How caffeic acid and its derivatives combat diabetes and its complications: A systematic review. Online. *Journal of Functional Foods*. Roč. 110, č. 8. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105862>.

- [24] DEUCHANDE, Teresa; FUNDO, Joana F.; PINTADO, Manuela E.; AMARO, Ana L. a BARADARAN RAHIMI, Vafa, 2024. Protocatechuic acid as an inhibitor of lipid oxidation in meat: A systematic review. Online. *Meat Science*. Roč. 213, č. 8. ISSN 03091740. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2024.109519>.
- [25] PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D. a CHANDRA, S. R., 2016. Flavonoids: an overview. Online. *Journal of Nutritional Science*. Roč. 5. ISSN 2048-6790. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.
- [26] YIN, Yuanqin; LI, Wenqi; SON, Young-Ok; SUN, Lijuan; LU, Jian et al., 2013. Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage. Online. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Roč. 269, č. 2, s. 89-99. ISSN 0041008X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.03.015>.
- [27] *P-lab: Kvercetin*. Online. In: Dostupné z: <https://www.p-lab.cz/kvercetin>.
- [28] RAUF, Abdur; WILAIRATANA, Polrat; JOSHI, Payal B.; AHMAD, Zubair; OLATUNDE, Ahmed et al., 2024. Revisiting luteolin: An updated review on its anticancer potential. Online. *Heliyon*. Roč. 10, č. 5. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26701>.
- [29] LEE, Yunho; YOON, Jeyong a VON GUNTEN, Urs, 2005. Spectrophotometric determination of ferrate (Fe(VI)) in water by ABTS. Online. *Water Research*. Roč. 39, č. 10, s. 1946-1953. ISSN 00431354. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.03.005>.
- [30] PAULOVÁ, Hana; BOCHOŘÁKOVÁ, Hana a TÁBORSKÁ, Eva, 2004. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. Roč. 98, č. 4, s. 174-179. ISSN 0009-2770.
- [31] *Chimactive: Determination of the activity of an antioxidant by the DPPH° assay*. Online. In: Dostupné z: <https://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe/1>.
- [32] WILLARD, Hobart H.; MERRITT, JR., Lynne L.; DEAN, John A. a SETTLE, JR., Frank A., 1986. *Instrumental methods of analysis*. 7. New Delhi. ISBN 81-239-0943-8.
- [33] KLOUDA, Pavel, 2003. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda. ISBN 80-863-6907-2.
- [34] FATIHA, Brahmi; DIDIER, Hauchard; NAIMA, Guendouze; KHODIR, Madani; MARTIN, Kiendrebeogo et al., 2015. Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and

tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). Online. *Industrial Crops and Products*. Roč. 74, s. 722-730. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.038>.

[35] PEREIRA, Romaiana Picada; BOLIGON, Aline Augusti; APPEL, André Storti; FACHINETTO, Roselei; CERON, Carla Speroni et al., 2014. Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activity of *Melissa officinalis*. Online. *Industrial Crops and Products*. Roč. 53, s. 34-45. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.007>.

[36] PALAMUTOĞLU, Recep; KASNAK, Cemal; DURSUN, Muhammed; ÜNALDI, Rabia Nur a ÖZKAPLAN, Nihat. Determination of phenolic contents and antioxidant activities of infusions prepared from lemongrass (*Melissa officinalis*). Online. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*. S. 98-109. ISSN 2066-6845.

[37] MATKOWSKI, Adam; PIOTROWSKA, Magdalena a CHANDRA, S. R., 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae: an overview. Online. *Fitoterapia*. Roč. 77, č. 5, s. 346-353. ISSN 0367326X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.04.004>.

[38] DE OLIVEIRA, Izamara; CHRYSARGYRIS, Antonios; HELENO, Sandrina A.; CAROCHO, Márcio; CALHELHA, Ricardo C. et al., 2023. Determination of phenolic contents and antioxidant activities of infusions prepared from lemongrass (*Melissa officinalis*): A Review Study With an Antioxidant Prospective. Online. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*. Roč. 170, č. 3, s. 98-109. ISSN 2066-6845. Dostupné z: <https://doi.org/10.34302/crpjfst/2022.14.1.8>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA	Antioxidační aktivita
ABTS	Kyseliny 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová)
ABTS ^{·+}	Kationtový radikál kyseliny 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové)
ArOH	Fenolové sloučeniny
DAD	Detektor s diodovým polem
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
PDA	Detektor fotodiodového pole
R-H	Oxidace lipidů
ROO [·]	Hydroxyperoxidový radikál
ROS	Reaktivní forma kyslíku
UV-VIS	Ultrafialovo-viditelná spektrofotometrie
TE	Trolox
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TG	Kyselina gallová
TPC	Celkový obsah polyfenolů

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Rostlina Meduňka lékařská [6]	12
Obrázek 2 Rostlina Hluchavka bílá [14].....	14
Obrázek 3 Kyselina rozmarýnová [21].....	16
Obrázek 4 Kyselina kávová [18]	17
Obrázek 5 Kyselina protokatechová [18]	17
Obrázek 6 Reakce volného radikálu antioxidantu s volným radikálem oxidované linolové kyseliny [21]	18
Obrázek 7 Obecná struktura flavonoidů [21]	19
Obrázek 8 Kvercetin [27]	20
Obrázek 9 Luteolin [28].....	20
Obrázek 10 Reakce s ABTS činidlem [29].....	22
Obrázek 11 Reakce s DPPH činidlem [31].....	22
Obrázek 12 Princip metody s Folin-Ciocalteuovým činidlem [19].....	23
Obrázek 13 Kalibrační křivka troloxu (ABTS)	31
Obrázek 14 Kalibrační křivka troloxu (DPPH)	33
Obrázek 15 Kalibrační křivka kyseliny gallové	35
Obrázek 16 AA stanovené metodou ABTS ze sušených a čerstvých vzorků meduňky.....	38
Obrázek 17 AA stanovené metodou ABTS ze sušených vzorků hluchavky nať a list.....	40
Obrázek 18 AA stanovené metodou ABTS ze sušených vzorků hluchavky květ.....	41
Obrázek 19 AA stanovené metodou DPPH ze sušených a čerstvých vzorků meduňky.....	42
Obrázek 20 AA stanovené metodou DPPH ze sušených vzorků hluchavky nať a list.....	43
Obrázek 21 AA stanovené metodou DPPH ze sušených vzorků hluchavky květ.....	44
Obrázek 22 Hodnoty inaktivace extraktů meduňky 2 SM.....	45
Obrázek 23 Hodnoty inaktivace extraktů meduňky 8 SM.....	45
Obrázek 24 Hodnoty inaktivace extraktů meduňky 1 ČM	46
Obrázek 25 Hodnoty inaktivace extraktů hluchavky 3 HN	47
Obrázek 26 Hodnoty inaktivace extraktů hluchavky 5 HN	47
Obrázek 27 Hodnoty inaktivace extraktů hluchavky 2 HK	48
Obrázek 28 TPC sušených a čerstvých vzorků meduňky	50
Obrázek 29 TPC sušených vzorků hluchavky nať a list	52
Obrázek 30 TPC sušených vzorků hluchavky květ	52
Obrázek 31 Závislost AA (ABTS) na TPC pro extrakty meduňky při teplotách 80 a 95 °C	54
Obrázek 32 Závislost AA (ABTS) na TPC pro extrakty hluchavky při teplotách 80 a 95 °C	54

Obrázek 33 Závislost AA (DPPH) na TPC pro extrakty meduňky při teplotách 80 a 95 °C	55
Obrázek 34 Závislost AA (DPPH) na TPC pro extrakty hluchavky při teplotách 80 a 95 °C	55
Obrázek 35 Chromatogram stanovení fenolických látek pomocí HPLC/DAD u vzorku 3 HN	59
Obrázek 36 Chromatogram stanovení fenolických látek pomocí HPLC/DAD u vzorku 7 SM	73
Obrázek 37 Chromatogram stanovení fenolických látek pomocí HPLC/DAD u vzorku 8 SM	73
Obrázek 38 Chromatogram stanovení fenolických látek pomocí HPLC/DAD u vzorku 1 ČM	73
Obrázek 39 Chromatogram stanovení fenolických látek pomocí HPLC/DAD u vzorku 1 HL	73
Obrázek 40 Chromatogram stanovení fenolických látek pomocí HPLC/DAD u vzorku 2 HK	73

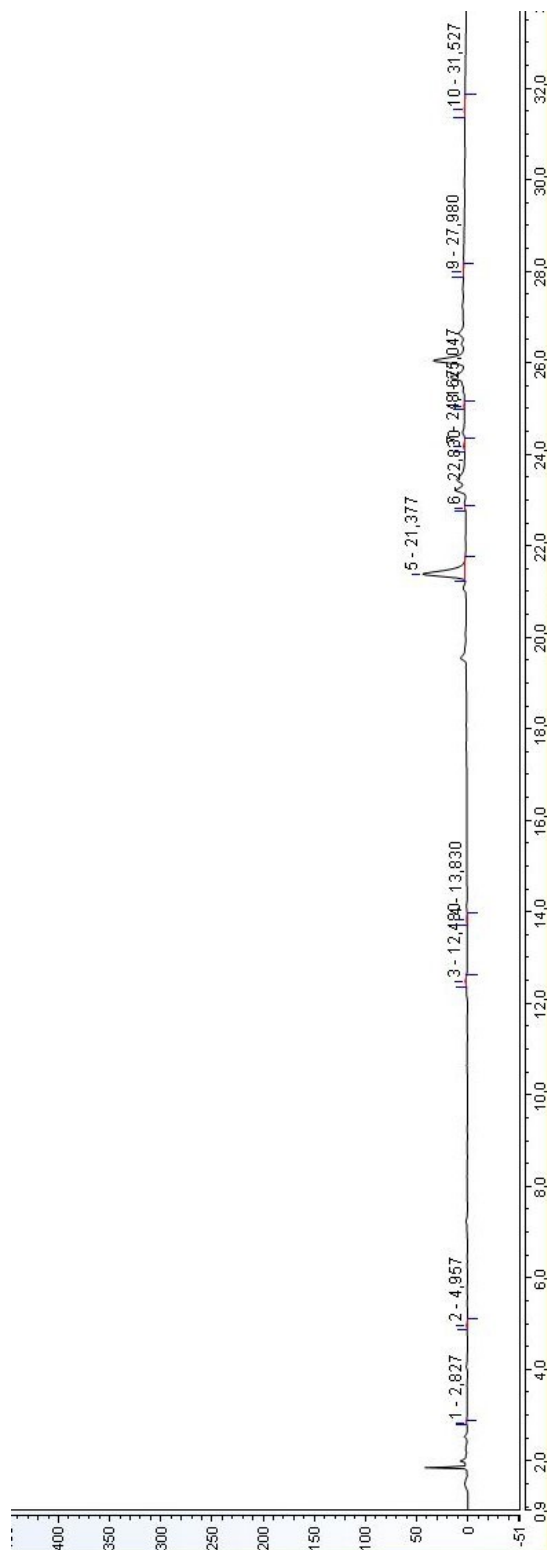
SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Třídy fenolických sloučenin v rostlinách [18].....	16
Tabulka 2 Vzorčky bylin	27
Tabulka 3 Složení mobilních fází během gradientové eluce	36
Tabulka 4 Rovnice lineární regrese fenolických látek.....	37
Tabulka 5 Hodnoty IC ₅₀ vybraných vzorků meduňky a hluchavky ve vzestupném pořadí.	48
Tabulka 6 Hodnoty korelačních koeficientů v sestupném pořadí.....	56
Tabulka 7 Obsah vybraných fenolických látek ve vzorcích meduňky a hluchavky stanovených metodou HPLC/DAD	60

SEZNAM PŘÍLOH

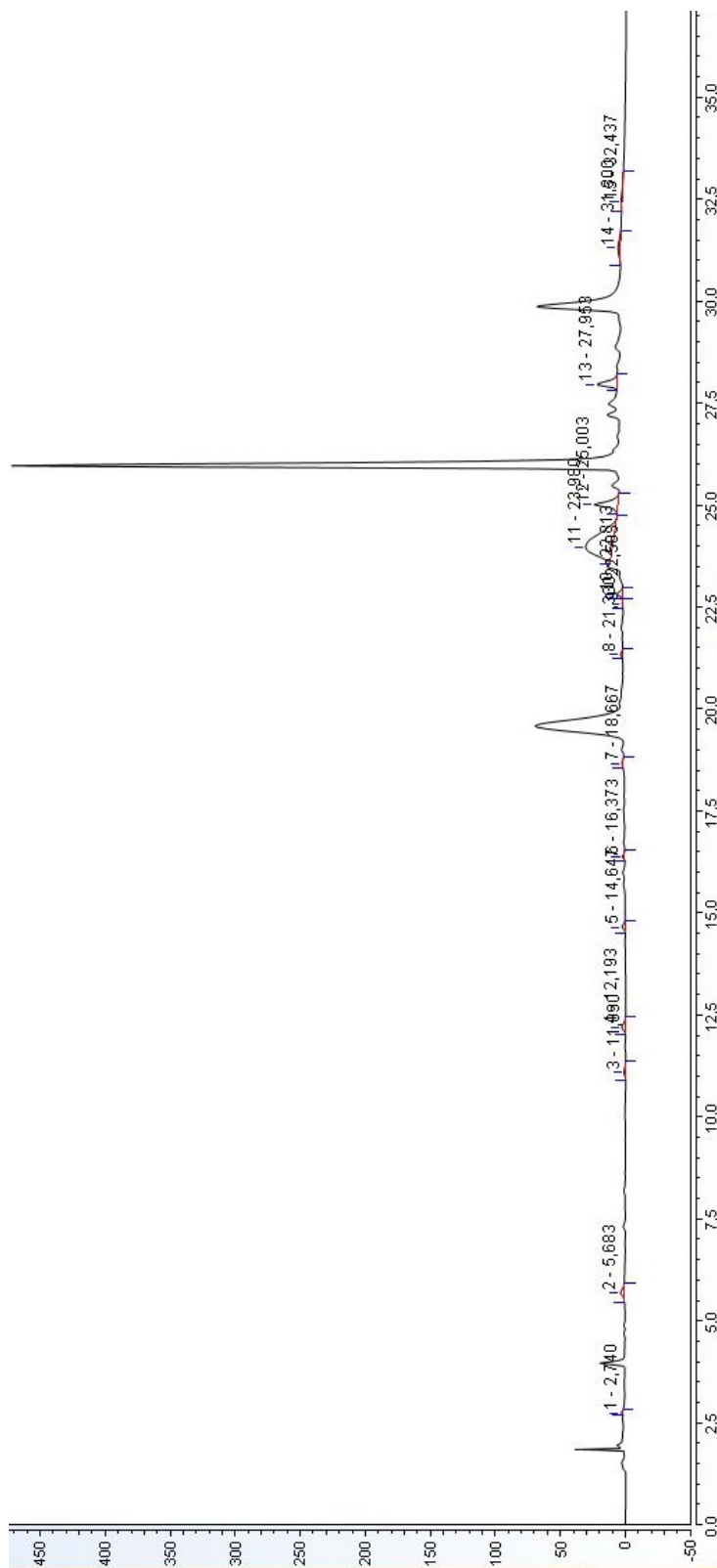
- Příloha P I: Chromatogram stanovení vybraných fenolických látek stanovené metodou HPLC/DAD u vzorku sušené meduňky (7 SM)
- Příloha P II: Chromatogram stanovení vybraných fenolických látek stanovené metodou HPLC/DAD u vzorku sušené meduňky (8 SM)
- Příloha P III: Chromatogram stanovení vybraných fenolických látek stanovené metodou HPLC/DAD u vzorku čerstvé meduňky (1 ČM)
- Příloha P IV: Chromatogram stanovení vybraných fenolických látek stanovené metodou HPLC/DAD u vzorku sušené hluchavky z části list (1 HL)
- Příloha P V: Chromatogram stanovení vybraných fenolických látek stanovené metodou HPLC/DAD u vzorku sušené hluchavky z části květ (2 HK)

PŘÍLOHA P I: CHROMATOGRAM STANOVENÍ VYBRANÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK STANOVENÉ METODOU HPLC/DAD U VZORKU SUŠENÉ MEDUŇKY (7 SM)



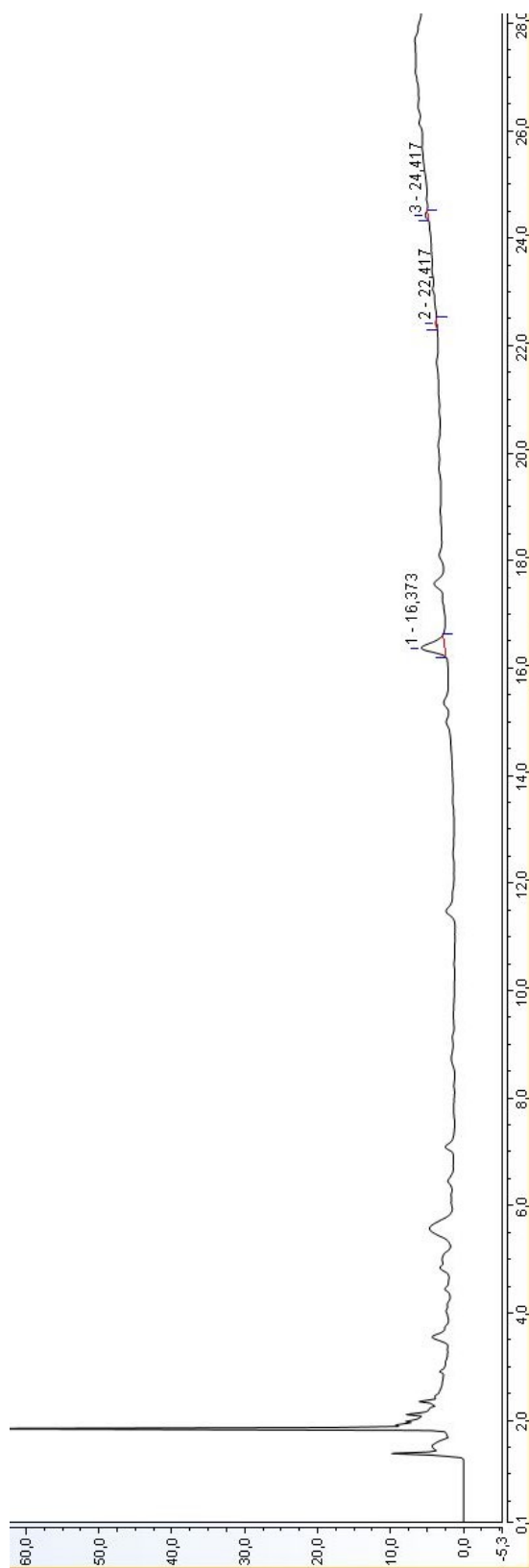
Obrázek 36 Chromatogram stanovení fenolických látek pomocí HPLC/DAD u vzorku 7 SM

PŘÍLOHA P II: CHROMATOGRAM STANOVENÍ VYBRANÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK STANOVENÉ METODOU HPLC/DAD U VZORKU SUŠENÉ MEDUŇKY (8 SM)



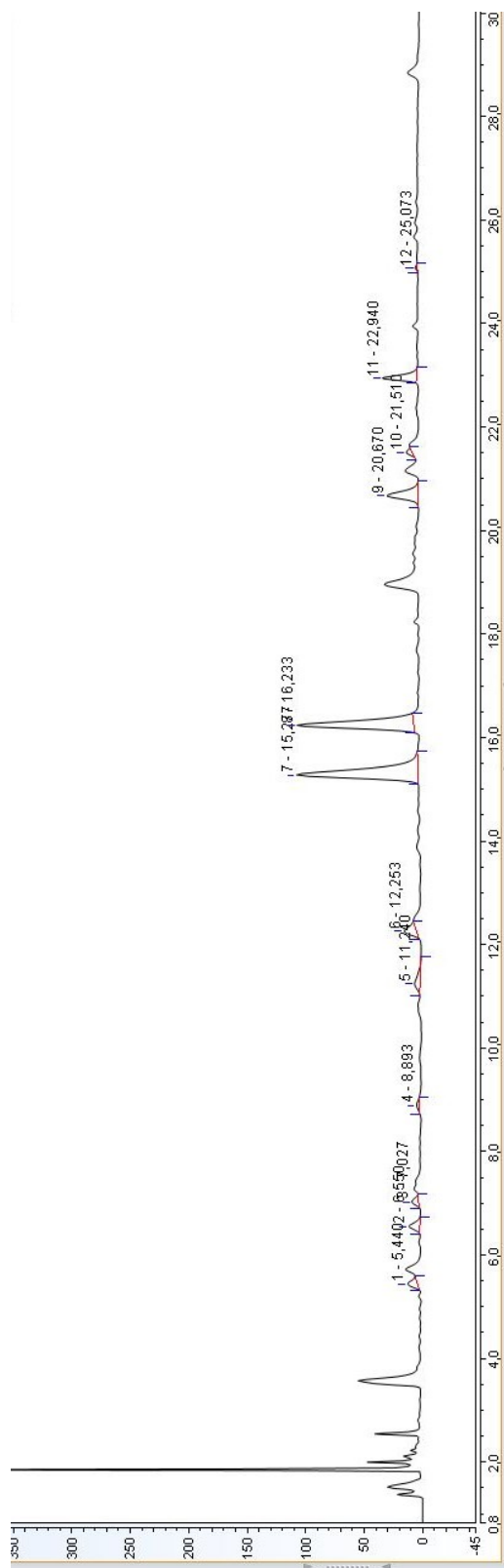
Obrázek 37 Chromatogram stanovení fenolických látek pomocí HPLC/DAD u vzorku 8 SM

PŘÍLOHA P III: CHROMATOGRAM STANOVENÍ VYBRANÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK STANOVENÉ METODOU HPLC/DAD U VZORKU ČERSTVÉ MEDUŇKY (1 ČM)



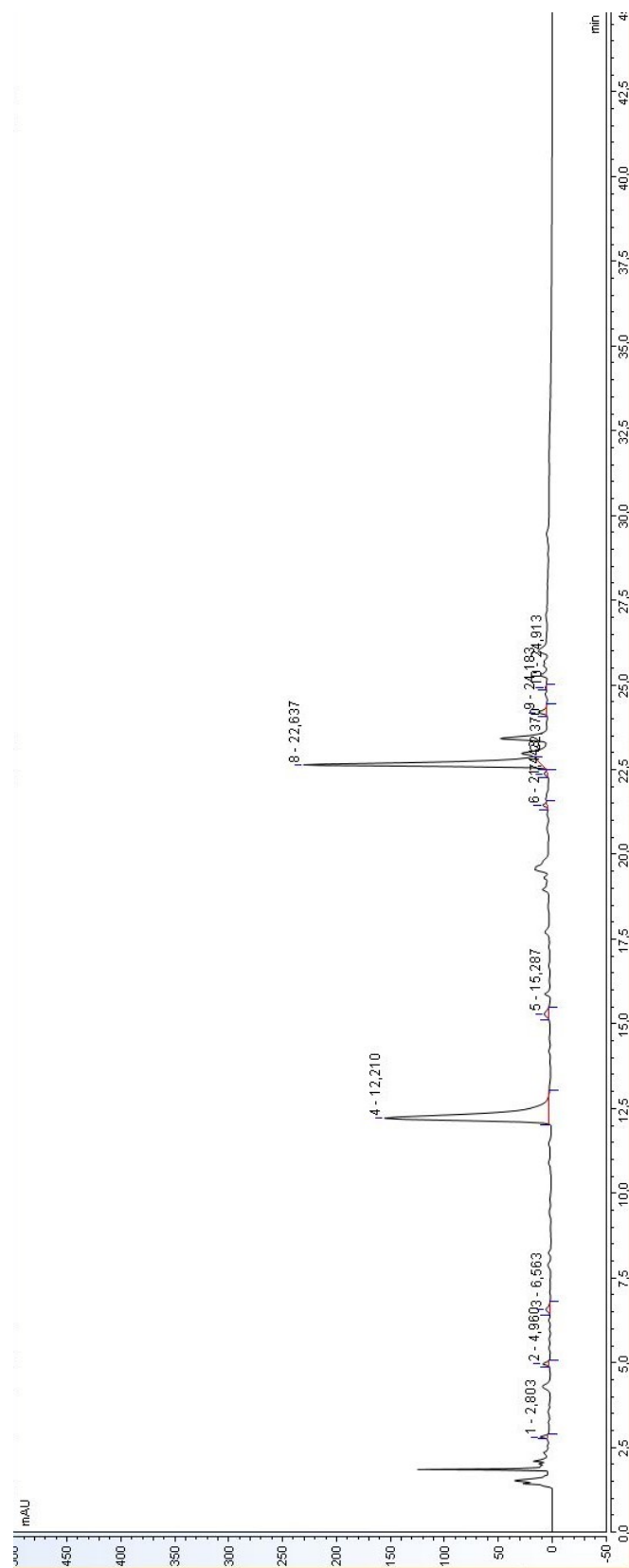
Obrázek 38 Chromatogram stanovení fenolických látek pomocí HPLC/DAD u vzorku 1 ČM

PŘÍLOHA P IV: CHROMATOGRAM STANOVENÍ VYBRANÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK STANOVENÉ METODOU HPLC/DAD U VZORKU SUŠENÉ HLUCHAVKY Z ČÁSTI LIST (1 HL)



Obrázek 39 Chromatogram stanovení fenolických látek pomocí HPLC/DAD u vzorku 1 HL

PŘÍLOHA P V: CHROMATOGRAM STANOVENÍ VYBRANÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK STANOVENÉ METODOU HPLC/DAD U VZORKU SUŠENÉ HLUCHAVKY Z ČÁSTI KVĚT (2 HK)



Obrázek 40 Chromatogram stanovení fenolických látek pomocí HPLC/DAD u vzorku 2 HK