



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE BYLIN RODU PLECTRANTUS PRO VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ

CHARACTERIZATION OF THE GENUS PLECTRANTUS FOR USE IN THE FOOD INDUSTRY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Nikola Chmelová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1549/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Nikola Chmelová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Charakterizace bylin rodu *Plectranthus* pro využití v potravinářství

Zadání diplomové práce:

- Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - charakteristika, složení a vlastnosti rostlin rodu *Plectranthus* (rýmovník)
 - účinné látky rýmovníku s antimikrobiálním a antioxidačním potenciálem, jejich význam a možnosti využití v potravinářství, příp. dalších oborech.
 - těkavé (aromatické) látky rýmovníku
 - možnosti získávání extraktů účinných látek z přírodních materiálů (přehled extrakčních metod)
 - možnosti stanovení těkavých látek v extraktech z přírodních materiálů – princip, provedení, přehled aplikací především na rýmovník.
 - možnosti měření antioxidační aktivity extraktů z přírodních materiálů – princip, provedení, přehled aplikací především na rýmovník
 - možnosti stanovení antimikrobiální aktivity extraktů z přírodních materiálů – princip, provedení, přehled aplikací především na rýmovník
- Vyzkoušejte různé systémy získávání extraktů rýmovníku se zaměřením na max. zisk bioaktivních sloučenin.
- Získané extrakty charakterizujte z hlediska obsahu těkavých látek, antioxidační a antimikrobiální aktivity.
- Diskutujte senzoryckou a nutriční hodnotu vyrobeného extraktu, výhody/nevýhody zvoleného optimálního postupu a příp. možné využití v praxi.

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Nikola Chmelová
student(ka)

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo stanovit optimální extrakční podmínky pro získání extraktu z rostliny *Plectranthus amboinicus*.

Plectranthus amboinicus, nazývaný také rýmovník, je aromatická bylina z čeledi hluchavkovitých obsahující velké množství bioaktivních sloučenin. Díky tomu vykazuje celou řadu biologických účinků – antimikrobiální, protizánětlivé, antioxidační, analgetické aj.

Pro zachování maxima senzory a nutričně cenných složek rýmovníku byla jako optimální zvolena jednoduchá macerace čerstvé nasekané byliny za těchto podmínek: 40 minut při 40 °C, rozpouštědlo 40% ethanol, navážka 20 g rýmovníku na 100 ml rozpouštědla.

Extrakt připravený za uvedených optimálních podmínek byl komplexně charakterizován z hlediska obsahu celkových polyfenolů, jejichž koncentrace byla stanovena na $0,08 \pm 0,02 \text{ mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{ml}^{-1}$, což odpovídá $0,40 \pm 0,07 \text{ mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{g}^{-1}$ rostliny. Antioxidační aktivita extraktu byla $241,24 \pm 29,24 \text{ } \mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}$ a zhášení radikálu ABTS^{•+} bylo určeno na $49,29 \pm 5,97 \%$. Antimikrobiální aktivita extraktů byla ověřena difúzní jamkovou metodou. Pro ověření byly vybrány dva druhy bakterií – grampozitivní *Bacillus cereus*, gramnegativní *Escherichia coli* a kvasinka *Candida glabrata*. Z výsledků bylo zjištěno, že extrakty mají nejvyšší antimikrobiální aktivitu proti *B. cereus*. V extraktu bylo identifikováno celkem 64 těkavých aromatických sloučenin, dominantní zastoupení měly monoterpeny a seskviterpeny.

Získané výsledky potvrzují, že rýmovník, resp. jeho připravený extrakt, má dobrý potenciál pro využití jako nová a netradiční příchuť do různých potravin a pochutin, která zároveň může zvýšit jejich nutriční hodnotu.

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was to determine the optimal extraction conditions for obtaining an extract from the plant *Plectranthus amboinicus*.

Plectranthus amboinicus is an aromatic herb of the *Lamiaceae* family containing a large number of bioactive compounds. Because of this, it has a number of biological effects – antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, analgesic, etc.

To maintain the maximum of sensory and nutritionally valuable components of *P. amboinicus*, a simple maceration of fresh chopped herb was chosen. Maceration was performed under the following conditions: 40 minutes at 40 °C, solvent 40% ethanol, weight 20 g of herb per 100 ml of solvent.

The extract prepared under these optimal conditions was comprehensively characterized in terms of the content of total polyphenols, their concentration was determined to $0,08 \pm 0,02 \text{ mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{ml}^{-1}$, which corresponds to $0,40 \pm 0,07 \text{ mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{g}^{-1}$ of the plant. The antioxidant activity of the extract was $241,24 \pm 29,24 \text{ } \mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}$ and the radical scavenging activity of ABTS^{•+} was determined to be $49,29 \pm 5,97 \%$. The antimicrobial activity was verified by the agar well diffusion method. Two types of bacteria were selected for the determination – gram-positive *Bacillus cereus*, gram-negative *Escherichia coli* and yeast *Candida glabrata*. The results showed that the extracts have the highest antimicrobial activity against *B. cereus*. There were 64 volatile aromatic compounds identified in the extract, with monoterpenes and sesquiterpenes dominating.

The obtained results confirm that *P. amboinicus*, or its prepared extract, has a good potential for use as a new and non-traditional flavor in various foods and delicacies, which can also increase their nutritional value.

KLÍČOVÉ SLOVA

rýmovník, aromatické látky, antioxidanty, antimikrobiální aktivita, SPME, GC-MS

KEY WORDS

Plectractus spp., aroma compounds, antioxidants, antimicrobial activity, SPME, GC-MS

CHMELOVÁ, Nikola. *Charakterizace bylin rodu Plectranthus pro využití v potravinářství* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-16]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131335>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí mé diplomové práce paní doc. Ing. Evě Vítové, Ph.D. za veškerou pomoc, vstřícnost, přátelský přístup a podnětné připomínky při zpracování této práce. Moc děkuji také mé rodině za podporu během celého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	Čeleď Hluchavkovité (<i>Lamiaceae</i>).....	11
2.1.1	Rod <i>Plectranthus</i> (<i>Plectranthus</i>)	11
2.2	Chemické složení rostlin	12
2.3	Biologicky aktivní látky	13
2.3.1	Polyfenoly	15
2.3.1.1	Fenolové kyseliny	15
2.3.1.2	Flavonoidy	16
2.3.1.3	Stilbeny	17
2.3.1.4	Lignany	18
2.3.2	Alkaloidy	18
2.3.3	Terpeny.....	18
2.3.4	Saponiny.....	19
2.4	Antioxidanty	20
2.4.1	Klasifikace antioxidantů.....	20
2.4.2	Úrovně antioxidačního účinku	20
2.4.3	Rostliny jako zdroj antioxidantů	21
2.5	Biologicky aktivní látky v rýmovníku.....	21
2.5.1	Těkavé sloučeniny v <i>P. amboinicus</i>	22
2.5.2	Netěkavé sloučeniny v <i>P. amboinicus</i>	23
2.6	Metody používané pro získání a charakterizaci extraktů rostlin	24
2.6.1	Extrakční metody	24
2.6.1.1	Konvenční metody extrakce	24
2.6.1.2	Inovativní metody extrakce.....	27
2.7	Metody stanovení antimikrobiální aktivity.....	29
2.7.1	Difúzní metody – kvalitativní	30
2.7.1.1	Disková difúzní metoda	30
2.7.1.2	Gradientová metoda (E-test).....	30
2.7.2	Diluční metody – kvantitativní.....	31
2.7.3	Antimikrobiální aktivita extraktů z rýmovníku.....	31
2.8	Metody stanovení obsahu celkových polyfenolických látek.....	32
2.8.1	Folin-Ciocalteu metoda	32
2.9	Metody stanovení antioxidační aktivity	34
2.9.1	TEAC metoda – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity	34

2.9.2	DPPH metoda	34
2.9.3	FRAP metoda – Ferric Reducing Ability of Plasma	34
2.9.4	ORAC metoda – Oxygen Radical Absorbance Capacity	34
2.9.5	CUPRAC metoda – Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity	35
2.9.6	Antioxidační aktivita extraktů rýmovníku	35
2.10	Stanovení aromaticky aktivních látek	35
2.10.1	Mikroextrakce tuhou fází	35
2.10.2	Plynová chromatografie	36
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
3.1	Použité přístroje	38
3.2	Chemikálie	38
3.3	Analyzované vzorky	38
3.4	Stanovení vybraných vlastností extraktů	39
3.4.1	Stanovení obsahu celkových polyfenolických látek	39
3.4.1.1	Příprava standardního roztoku kyseliny gallové	39
3.4.1.2	Příprava 7,5% roztoku uhličitanu sodného	39
3.4.1.3	Příprava kalibrační řady	39
3.4.1.4	Příprava vzorků	40
3.4.2	Stanovení aromatických látek	40
3.4.2.1	Příprava vzorků pro měření	40
3.4.3	Stanovení antioxidační aktivity optimalizovaného extraktu	41
3.4.3.1	Příprava ABTS ^{•+}	41
3.4.3.2	Příprava kalibrační řady	42
3.4.3.3	Příprava vzorků	42
3.4.4	Stanovení antimikrobiální aktivity optimalizovaného extraktu	42
3.4.4.1	Příprava kultivačních médií	43
3.4.4.2	Ověření antimikrobiální aktivity	43
3.5	Statistické zpracování výsledků	44
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	45
4.1	Optimalizace podmínek macerace	45
4.1.1	Obsah polyfenolických sloučenin v dílčích extraktech	46
4.1.1.1	Vliv doby extrakce	46
4.1.1.2	Vliv typu rozpouštědla	47
4.1.1.3	Vliv navážky vzorku	48
4.1.1.4	Vliv teploty extrakce	49
4.1.2	Obsah těkavých látek v dílčích extraktech	50
4.1.2.1	Vliv doby extrakce	50

4.1.2.2	Vliv typu rozpouštědla	51
4.1.2.3	Vliv navážky vzorku	51
4.1.2.4	Vliv teploty extrakce	51
4.2	Příprava a charakterizace optimálního extraktu	56
4.2.1	Obsah polyfenolických sloučenin v optimálním extraktu	57
4.2.2	Těkavé (aromaticky aktivní) látky v optimálním extraktu	57
4.2.3	Antioxidační aktivita optimálního extraktu	62
4.2.4	Antimikrobiální aktivita optimálního extraktu	62
5	ZÁVĚR	65
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	66
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	79
8	SEZNAM PŘÍLOH	81
8.1	Příloha A: GC-MS analýza optimalizovaného extraktu	82
8.2	Příloha B: Chromatogram optimalizovaného extraktu	85

1 ÚVOD

V posledních letech se použití přírodních látek v potravinářství a kosmetických přípravcích těší u spotřebitelů velké oblibě. Často potraviny či kosmetické přípravky s přírodními aditivami dostávají na pultech obchodních řetězců přednost před zbožím s přídavkem syntetických aditiv. Důvodem je, že lidé více dbají o vlastní životní styl, což se odráží také ve sledování složení potravin a používané kosmetiky a jejich původu.

Plectranthus amboinicus, nazývaný také rýmovník, molice či kubánské oregano, je aromatická bylina z čeledi hluchavkovitých obsahující velké množství biologicky aktivních látek, díky nimž vykazuje antioxidační a antimikrobiální aktivitu. Od dávných dob byla tato bylina využívána v aromaterapii, v lidovém léčitelství k léčbě nachlazení či astma, při trávících obtížích, kožních onemocněních a v neposlední řadě jako ochucovadlo a konzervant pokrmů zejména v asijské kuchyni.

Proto se v posledním desetiletí vědecký zájem zaměřil na zkoumání biologické aktivity této byliny, na izolaci bioaktivních sloučenin a pochopení farmakologického účinku těchto sloučenin. Mezi významné bioaktivní sloučeniny identifikované v listech rýmovníku patří karvakrol, thymol, γ -terpinen, p-cymen, α -terpineol a β -selinen.

Faktory, které ovlivňují množství a chemický profil bioaktivních látek v rýmovníku, jsou například podnebí, oblast pěstování rostliny, zvolená extrakční metoda a její podmínky, a následné zpracování a uchovávání extraktu.

Cílem této práce byla optimalizace podmínek pro přípravu extraktu z rostliny *P. amboinicus*. Podmínky byly vybírány tak, aby obsah bioaktivních sloučenin, sensoricky a nutričně cenných složek zůstal v připraveném extraktu co nejvyšší. Při výběru podmínek a metody extrakce byla důležitá i časová a finanční náročnost procesu. Hlavním záměrem bylo potvrdit, že připravený extrakt by mohl být po jeho úpravě aplikován jako přídatná látka do potravinářského či kosmetického produktu, kde by vytvořil zajímavou chuť nebo vůni. Z tohoto důvodu byl zhodnocen z hlediska antioxidační a antimikrobiální aktivity, obsahu celkových polyfenolických sloučenin a aromatických látek.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Tato práce je zaměřena na možnosti získávání extraktu z rýmovníku (*Plectrathus* spp.) se zachováním maxima biologicky aktivních látek. V následujících kapitolách je charakterizován rýmovník a jeho účinné látky, především s antimikrobiálním a antioxidačním účinkem; dále jsou popsány metody získávání extraktů z bylin a v neposlední řadě metody vhodné pro stanovení ukazatelů charakterizujících získaný extrakt: těkavých aromatických látek, antioxidační a antimikrobiální aktivity.

2.1 Čeleď Hluchavkovité (*Lamiaceae*)

Hluchavkovité jsou jednou z největších čeledí krytosemenných dvouděložných rostlin. Název je odvozen od morfologie květu, který připomíná jícen. Postaru je tato čeleď někdy nazývána pyskaté. Tato čeleď zahrnuje 236 rodů a 7 534 druhů rostlin. Patří mezi celosvětově rozšířené rostliny, kromě Antarktidy se vyskytují na všech kontinentech. Největší druhovou diverzitu lze pozorovat v tropickém a subtropickém podnebném pásu zejména na jižní polokouli. Rostliny z této čeledi mohou být jednoleté, víceleté nebo vytrvalé byliny. Mnohé druhy jsou pěstovány pro své výrazné aromatické vlastnosti. Mezi největší rody patří *Salvia*, do níž patří běžně se vyskytující rostliny jako je hluchavka, máta, šalvěj nebo levandule, dále rody *Scutellaria*, *Plectranthus*, *Stachys*, *Vitex* a *Tetradenia* [1] [2].

Hluchavkovité jsou zelené, plně autotrofní rostliny. Pro rostliny jsou typické čtyřhranné stonky, čímž jsou snadno odlišitelné od ostatních bylin. Mají dvoustranně souměrné pyskaté pětičlenné oboupohlavné květy produkující nektar a vstřícné, křížmostojné, přeslenité či střídavé listy. Plody hluchavkovitých jsou obvykle suché, nejčastěji tvrdky, výjimečně u tropických druhů peckovice či tobolky. Některé aromatické druhy čeledi hluchavkovitých se používají jako koření. Využívá se například šalvěj, rozmarýn, tymián, bazalka, saturejka či majoránka. Africké druhy rodu *Plectranthus* se pěstují pro hlízy, nať *Plectranthus amboinicus* se přidává do salátů. Semena šalvěje hispánské jsou známá také jako chia a jsou označovány jako superpotravina. Bazalka má široké využití v italské kuchyni na výrobu pesta a přidává se do pokrmů s těstovinami. Rostliny čeledi hluchavkovitých jsou často zdrojem esenciálních olejů a používají se pro kosmetické či farmaceutické účely (zejména šalvěj, levandule, máta, pačule) [3] [4].

2.1.1 Rod *Plectranthus* (*Plectranthus*)

Plectranthus je aromatická léčivá bylina z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Bývá často také označována jako molice nebo rýmovník. Je známá svými terapeutickými a nutričními vlastnostmi, které jsou připisovány přítomnosti monoterpenových a seskviterpenových sloučenin. Mezi známé zástupce patří *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus scutellarioides* a *Plectranthus rotundifolius* [5] [6].

Rod *Plectranthus* obsahuje aromatické byliny i polokeře se sukulentními rysy. Je nazýván také jako mexický eukalyptus nebo kubánské oregano. Přirozeně se vyskytuje v teplých oblastech Afriky, Asie a Austrálie. Tyto rostliny se vyznačují zelenými listy tvaru srdce s vroubkovanými okraji. Dorůstají do výšky 30 až 60 cm. Lodyhy jsou pokryté žláznatými trichomy. Květy jsou uspořádány do hroznů či laty lichopřeslenů a mají namodralou, fialovou nebo žlutou barvu. Čerstvá bylina má pronikavou, lehce kořeněnou chuť a vůni připomínající meduňku. Dochuť má jemně nahořklou [6] [7] [8].

Listy *Plectranthus amboinicus* (viz obrázek 1) se konzumují syrové nebo se používají jako ochucovadla v asijské, především ve vietnamské kuchyni při přípravě polévek, masa

a mořských plodů. V lidové medicíně se používá k léčbě nachlazení, astma, zácpy, horečky, kožních onemocnění a při poštípání hmyzem.



Obrázek 1: *Plectranthus amboinicus* [9]

2.2 Chemické složení rostlin

Chemický profil rostlin se může lišit v závislosti na jednotlivých rodech, čeledích a odrůdách. Dále také na geografickém původu, klimatu a ročním období. Léčivé rostliny obsahují vodu, organické a anorganické látky. Anorganické sloučeniny jsou zejména minerální látky, které se účastní metabolických procesů a enzymatických reakcí v organismu [10] [11].

Mezi organické sloučeniny, které jsou součástí rostlin, patří primární metabolity:

- sacharidy,
- aminokyseliny, peptidy, bílkoviny,
- nukleové kyseliny,
- mastné kyseliny a lipidy,
- steroidy,
- organické kyseliny [11].

Kromě primárních metabolitů se v rostlinách nachází i metabolity sekundární:

- alkaloidy,
- flavonoidy,
- taniny,
- saponiny,
- fytosteroly,
- terpeny,
- vitaminy,
- éterické oleje [11].

Díky velkému množství prospěšných účinků pro rostlinu se tyto látky označují jako biologicky aktivní, tj. mají různé biologické účinky.

2.3 Biologicky aktivní látky

Biologicky aktivní látky jsou bohatá a různorodá skupina látek, které působí na životní funkce organismu. Mohou ovlivňovat biochemické pochody probíhající v organismech, průnik látek buňkami nebo mohou mít vliv na koordinační funkce živých organismů [12].

Sekundární metabolity obsažené v rostlinách jsou bohatým zdrojem bioaktivních sloučenin, které příznivě působí na zdraví lidí a zvířat.

Sekundární metabolismus zahrnuje metabolické dráhy, které umožňují vytvořit velké množství komplexních látek. Primární a sekundární metabolismus využívá v řadě uzlových bodů metabolických drah společné intermediáty. Sekundární metabolity jsou organické látky vznikající v těle organismů, které se přímo nepodílí na procesu růstu, vývoje nebo rozmnožování daného organismu. Nedostatek nezpůsobuje okamžitou smrt, ale může například snižovat odolnost organismu. Sekundární metabolity mohou zvyšovat schopnost přežití, poskytnout ochranu proti predátorům, přispívají k vytvoření barvy, aroma, chuti. Mohou pomáhat rostlinám odolávat stresu nebo ultrafialovému záření. Klíčovými intermediáty, které se podílí na syntéze sekundárních metabolitů, jsou:

- sacharidy,
- šikimová kyselina,
- aromatické kyseliny,
- nearomatické aminokyseliny,
- mastné kyseliny s krátkým řetězcem (kyselina octová a propionová),
- intermediáty citrátového cyklu,
- puriny a pyrimidiny [13].

Díky dnes dostupným analytickým technikám, jako je plynová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetická rezonance, lze identifikovat širokou škálu biologicky aktivních látek v rostlinách. Tyto látky jsou známy jako fytochemikálie a řadí se sem skupiny polyfenolů, alkaloidů, terpenů, saponinů [14].

Farmakologická aktivita léčivých rostlin je způsobena přítomností sekundárních metabolitů. Rostlinné sekundární metabolity jsou obvykle zodpovědné za antimikrobiální vlastnosti rostlin [15].

Mezi významné fytonutrienty patří:

- polyfenoly,
- fenolické kyseliny (hydroxybenzoové, hydroxycinnamové kyseliny),
- terpenoidy,
- resveratrol,
- flavonoidy (flavony, flavonoly, flavanoly, izoflavony),
- karotenoidy,
- fytoestrogeny,
- fytosteroly,
- antokyany,
- omega-3 mastné kyseliny,
- glukosinoláty,
- limonoidy,
- probiotika [16].

Tyto fytonutrienty (viz tabulka 1) mají různé účinky na lidské zdraví, například antimikrobiální, antioxidantní, protizánětlivé, antialergické, antispastické, analgetické, hypotenzní, hepatoprotektivní, neuroprotektivní a další.

Tabulka 1: Vybrané fytonutrienty, jejich zdroje a biologické účinky [16]

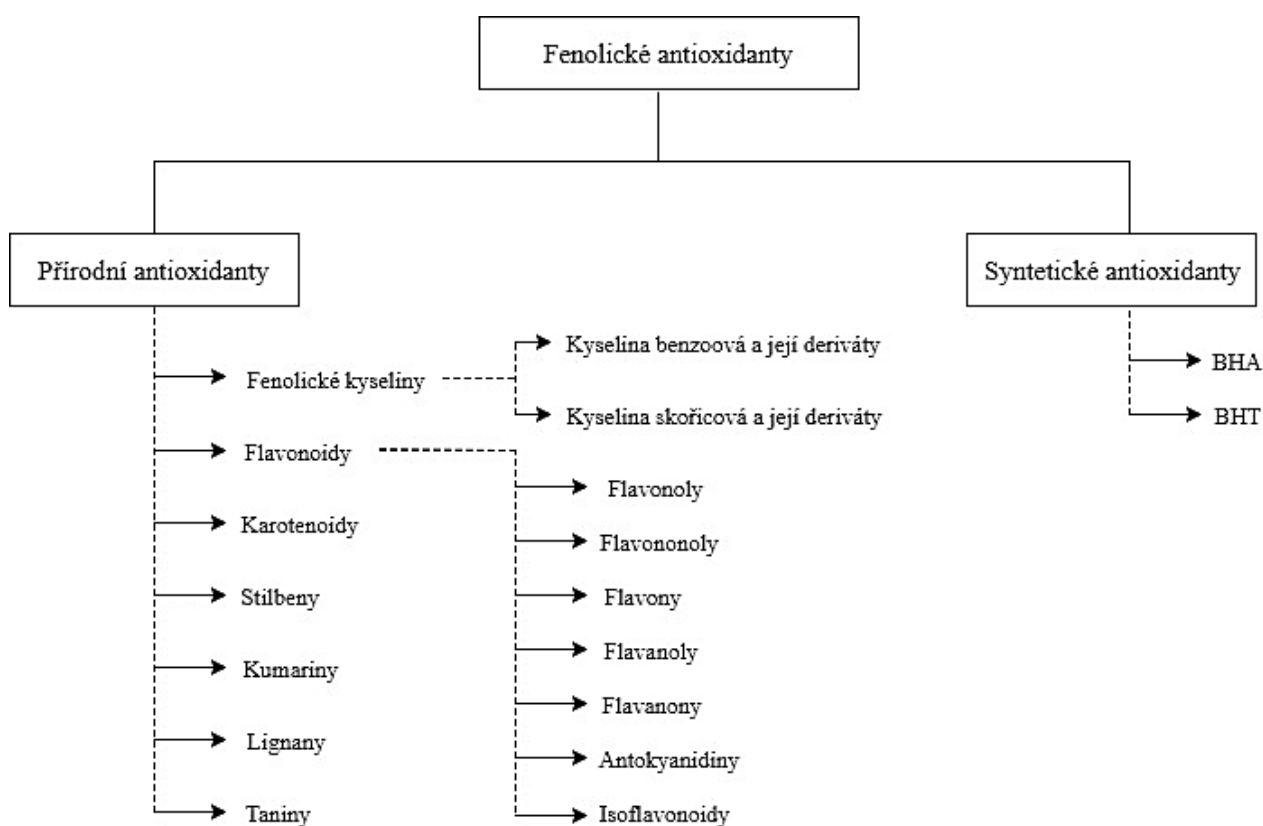
Fytonutrient	Zdroje fytonutrientu	Biologické účinky
Antokyany	Ostružiny, třešně, pomeranče, maliny, červené zelí, švestky, jahody	Antialergické, protizánětlivé, antioxidační, pigmenty
Karoteny	Mrkev, dýně	Antikarcinogenní, poskytují ochranu rohovky proti UV záření, stimulují enzymy pro opravu DNA
Lykopen	Meruňky, papája, rajče, meloun	Snižuje riziko aterosklerózy a rakoviny prostaty
Resveratrol	Borůvky, arašidy, červené hrozny	Antioxidační, antikarcinogenní, snižuje riziko cukrovky a srdečních chorob
Polyfenoly	Pšenice, ječmen, fazole, olivy, řepka, rýže, čaj, káva, víno, pivo	Antioxidační, antikarcinogenní, protizánětlivé, antialergické, antivirové, chrání kůži před účinky UV záření
Fytoestrogeny	Sójové boby, pšenice, ječmen, kukuřice, oves	Antikarcinogenní, snižují riziko srdečních chorob a osteoporózy, snižují příznaky menopauzy
Omega-3 mastné kyseliny	Ryby (losos, pstruh, makrela, sledě, sardinky), řepkový, sójový, lněný olej	Snižují hladinu cholesterolu a vysoký krevní tlak, zmírňují bolesti kloubů, zlepšuje paměť, zmírňují příznaky kožních onemocnění
Limonoidy	Citrusy	Protirakovinné, insekticidní, antibakteriální, antimalarické, antivirové
Flavonoidy	Bobule, luštěniny, čaj, hrozny, olivový olej, kakao, vlašské ořechy, arašidy, cibule, jablka	Antibakteriální, antioxidační, antivirové, analgetické, protizánětlivé, inhibují hydrolytické a oxidační enzymy
Probiotika	Fermentované potraviny – mléko, tvaroh, sýr, fermentovaná zelenina	Antimikrobiální, prevence průjmu a jiných střevních onemocnění, posílení imunity

2.3.1 Polyfenoly

Polyfenoly jsou rozsáhlá skupina látek vyskytujících se v rostlinách. Tyto látky ve své molekule obsahují dvě nebo více hydroxylových skupin, které jsou navázány na aromatické jádro. Polyfenoly jsou nejhojněji se vyskytujícími sekundárními metabolity ve všech cévnatých rostlinách. Jejich funkce v organismu je různá. Obecně působí jako antioxidanty, chrání rostliny před oxidačním stresem, UV zářením, patogeny. Polyfenoly hrají důležitou roli v barvě, chuti a nutričních vlastnostech ovoce, zeleniny, obilovin, kávy, čaje, kakaa, vína a dalších [14].

Klasifikace fenolických antioxidantů je znázorněna na obrázku 2. Mezi přírodní fenolické antioxidanty patří například:

- fenolické kyseliny,
- flavonoidy,
- stilbeny,
- lignany [17].



Obrázek 2: Klasifikace fenolických antioxidantů [18]

2.3.1.1 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny se mohou nacházet ve volné i esterifikované formě. Rozlišují se na dvě třídy:

- kyselina benzoová a její deriváty (kyselina ellagová, kyselina gallová),
- kyselina skořicová a její deriváty (kyselina kávová, kyselina ferulová).

Kyselina ellagová a kyselina gallová se vyskytují v bobulích a ořeších. Kyselina kávová a kyselina ferulová jsou citlivé na teplo a tvoří společně kyselinu chlorogenovou, která se vyskytuje v ovoci, zelenině, slunečnicových semínkách a kávových zrnech [19].

2.3.1.2 Flavonoidy

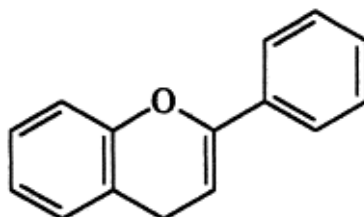
Flavonoidy jsou nízkomolekulární fenolové sloučeniny patřící mezi rostlinné sekundární metabolity. Jejich základní strukturu tvoří flavan (viz obrázek 3). Nacházejí se v ovoci, zelenině, obilí, kůře stromů, stoncích, květinách, také v čaji a víně. Flavonoidy jsou považovány za nepostradatelnou složku mnoha nutričních, farmaceutických a kosmetických produktů kvůli jejich antioxidačním, protizánětlivým a antikarcinogenním vlastnostem. Dokáží ovlivňovat klíčové buněčné enzymatické funkce a jsou silnými inhibitory pro některé enzymy, například xantinoxidázu, cyklooxygenázu a lipoxygenázu. Obvykle se vyskytují navázané na molekulách cukru [20].

Flavonoidy se dělí do dvou základních skupin, antokyanů a antoxantinů. Antokyaniny jsou červené, modré a fialové pigmenty. Antoxantiny, kam patří flavony, flavonoly, flavanoly a isoflavony, jsou bezbarvé, bílé nebo žluté pigmenty [19].

Flavonoidy mají několik podskupin:

- flavony,
- flavonoly,
- flavanony,
- isoflavony,
- flavanoly,
- antokyaniny,
- chalkony [21].

Jednotlivé podskupiny flavonoidů, jejich přírodní zdroje, výskyt a zástupci jsou zmíněny v tabulce 2.



Obrázek 3: Flavan – základní struktura flavonoidů [19]

Tabulka 2: Podskupiny flavonoidů, jejich přírodní zdroje, výskyt a zástupci [19] [20] [21]

Podskupina flavonoidů	Přírodní zdroj	Výskyt	Příklad
Flavony	Listy, květy, ovoce, slupka citrusových plodů	Celer, paprika, heřmánek, máta, ginkgo biloba	Luteolin, apigenin, tangeretin, baicalein
Flavonoly	Ovoce, zelenina, čaj, červené víno	Cibule, kapusta, hlávkový salát, rajčata, jablka, hrozny a bobule	Kaempferol, kvercetin, myricetin, fisetin, rutin

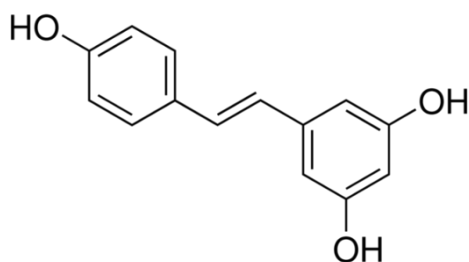
Tabulka 2: Podskupiny flavonoidů, jejich přírodní zdroje, výskyt a zástupci – pokračování [19] [20] [21]

Podskupina flavonoidů	Přírodní zdroj	Výskyt	Příklad
Flavanony	Citrusové plody	Pomeranče, citrony, hrozny	Hesperitin, naringenin a eriodictyol
Isoflavony	Luštěniny	Sója	Genistein, glycitein, daidzein
Flavanoly	Ovoce	Banány, jablka, borůvky, broskve, hrušky	Katechin, epikatechin, epigallokatechin, gallokatechin
Antokyany	Rostliny, květiny, ovoce	Brusinky, černý rybíz, červené hrozny, maliny, jahody, borůvky a ostružiny	Kyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin a peonidin
Chalkony	Ovoce, zelenina, některé pšeničné produkty	Rajčata, hrušky, jahody	Phloridzin, arbutin, phloretin a chalcon naringenin

2.3.1.3 Stilbeny

Stilbeny jsou skupina fenolických sloučenin přirozeně se vyskytujících v různých druzích rostlin. Jsou klasifikovány jako fytoalexiny, což jsou antimikrobiální látky o nízké molekulové hmotnosti, které jsou syntetizovány a akumulovány v rostlinách poté, co jsou napadeny mikroorganismy. Slouží rostlinám jako aktivní obranné látky. Mezi zástupce stilbenů patří resveratrol (viz obrázek 4), pterostilben, gnetol a piceatannol [22].

Zdrojem resveratrolu jsou slupky hroznů, borůvek, malin a moruší. Gnetol je stilben přirozeně se vyskytující ve skupině rostlin rodu *Gnetum*, které se vyskytují jako stromy, keře i liány. Piceatannol se běžně vyskytuje v bobulích, červených hroznech, mučence, rebarboře a v bílém čaji [23] [24].



Obrázek 4: Resveratrol [25]

2.3.1.4 Lignany

Lignany jsou polyfenolické látky přirozeně se vyskytující v rostlinách. Jsou klasifikovány do osmi skupin:

- arylnaftaleny,
- aryltetraliny,
- dibenzocyklooktadeny,
- dibenzylbutany,
- dibenzylbutyrolaktoly,
- dibenzylbutyrolaktony,
- furany,
- furofurany.

Lignany jsou přítomny v olejnatých semenech, obilovinách, luštěninách, ořeších, ovoci a zelenině. Lignany bývají při potravinářském zpracování často odstraněny společně s vlákninou, proto je jich v lidské stravě nedostatek. Spolu s isoflavonoidy tvoří lignany jednu z hlavních skupin fytoestrogenů [26].

2.3.2 Alkaloidy

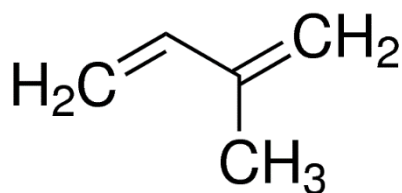
Alkaloidy jsou nízkomolekulární sloučeniny obsahující dusíkatou bázi, obvykle heterocyklus, díky níž mají hořkou chuť a výraznou bioaktivitu. Chemicky jsou často odvozeny od aminokyselin. Alkaloidy je možné izolovat z rostlin, hub, živočichů i bakterií. Dosud bylo objeveno více než 10 000 přirozeně se vyskytujících alkaloidů z více než 300 druhů rostlin. Některé alkaloidy mají využití jako léčiva, stimulanty, ale také jako narkotika nebo jedy. Dělí se do 6 skupin:

- indolové alkaloidy,
- pyrrolidinové alkaloidy,
- tropanové alkaloidy,
- chinolonové alkaloidy,
- izochinolinové alkaloidy,
- izidinové alkaloidy [14].

Mezi známější alkaloidy patří například kofein, který se používá jako stimulant. Podporuje činnost centrální nervové soustavy a srdeční činnost. Při užívání ve větším množství se stává drogou. Dále například Yohimbin používaný jako veterinární lék ke zvrácení sedace u psů a jelenů. V USA byl použit k léčbě erektilní dysfunkce, ale neměl velký úspěch. Dále p-synefrin, používaný jako spalovač tuků v kombinaci s kofeinem. M-synefrin se používá jako léčivo k léčbě šokové reakce nebo dýchacích problémů spojených s astmatem [14].

2.3.3 Terpeny

Terpeny jsou sekundární metabolity, které jsou spojovány s růstem a vývojem rostlin. Jejich základní stavební jednotkou je isopren (viz obrázek 5). Terpeny jsou nejrozmanitější třída metabolitů, existuje více než 55 tisíc různých struktur. Terpeny se vyskytují v květech, listech, plodech a dalších částech rostlin. Hlavní úlohou těchto sloučenin je ochránit rostliny před konzumací býložravci a napadením patogenními mikroorganismy [14] [27] [28].



Obrázek 5: Isopren (C_5H_8)_n [29]

Terpeny se mohou dělit podle struktury na acyklické a cyklické. Podle počtu izoprenových jednotek se dělí na [28]:

- hemiterpeny – 1 molekula isoprenu,
- monoterpeny – 2 molekuly isoprenu,
- seskviterpeny – 3 molekuly isoprenu,
- diterpeny – 4 molekuly isoprenu,
- triterpeny – 6 molekul isoprenu,
- tetraterpeny – 8 molekul isoprenu,
- polyterpeny – více molekul isoprenu.

Terpeny jsou významnou součástí silic neboli éterických olejů, což jsou většinou směsi monoterpenů, seskviterpenů, aldehydů, ketonů, alkoholů a esterů. Mají obvykle nízkou teplotu varu, menší hustotu a vyšší index lomu než voda. Silice mohou sloužit jako lákadla pro opylující hmyz, usměrňovače transpirace nebo mohou mít obrannou funkci jako fytoncidy, tedy že brání růstu mikroorganismů. Obsah silic v rostlinách závisí na životním cyklu rostliny. Vhodně zvolené éterické oleje nebo kombinace těchto olejů mají schopnost ovlivňovat tělesné funkce a psychický stav [30].

Silice se získávají nejčastěji extrakcí nepolárními rozpouštědly z rostlinného materiálu. Jako rozpouštědlo může být použit například ethanol, hexan nebo glycerol. Dalšími možnými způsoby extrakce silic je destilace vodní parou, lisování, extrakce na fluidním loži, extrakce pomocí oxidu uhličitého a další.

2.3.4 Saponiny

Saponiny jsou bioaktivní sloučeniny převážně rostlinného původu. Obvykle se vyskytují jako polycyklické triterpeny nebo steroidy s glykosidy [14].

Triterpenoidní saponiny se nejčastěji nachází v kořenové části rostlin, příkladem je sojasaponin A_a, který je součástí sóji luštinaté a má štiplavou svíravou chuť. Dále jsou součástí například čočky jedlé, špenátu setého, hrachu setého a lékořice lysé. Triterpenoidní saponiny byly objeveny i v těle živočichů, například mořské okurky. Steroidní saponiny jsou specifické pro česnek kuchyňský a pór letní z čeledi česnekovitých [31] [32].

Ve struktuře saponinů se nachází hydrofóbní aglykonový základní řetězec a hydrofilní molekuly cukru. Proto jsou saponiny vysoce amfipatické molekuly, mají pěnové a emulgační vlastnosti. Jsou využívány v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu [33].

Mnoho rostlin syntetizuje a akumuluje saponiny během normálního růstu a vývoje. U některých druhů rostlin je syntéza saponinů indukována jako reakce na stres, například po napadení býložravci a patogeny, dále reakce na vlhkost, nedostatek živin, světlo a teplotu. Saponiny mají tedy důležitou úlohu při ochraně rostlin proti patogenům, škůdcům a býložravcům [33].

2.4 Antioxidanty

Do skupiny sekundárních metabolitů se řadí také antioxidanty. V posledních letech narostl zájem o používání přírodních antioxidantů v potravinářských výrobcích. Mezi přírodní zdroje antioxidantů se řadí mnohé byliny, koření, semena, ovoce i zelenina [34].

Antioxidanty jsou látky, jež mohou zabránit nebo zpomalit poškození buněk, které je způsobeno volnými radikály. Volné radikály jsou nestabilní molekuly, které tělo produkuje jako odpověď na okolní stres. Antioxidant je molekula dostatečně stabilní na to, aby darovala elektron volnému radikálu, a tím ho neutralizovala. Díky schopnosti antioxidantů s nízkou molekulovou hmotností bezpečně interagovat s volnými radikály dojde k ukončení řetězové reakce dříve, než nastane poškození životně důležitých molekul a buněk [35].

Faktory, které zvyšují produkci volných radikálů v těle, mohou být vnitřní, například zánět, nebo vnější, například vystavení UV záření, cigaretový kouř, znečištění. Oxidační stres organismu je spojován se srdečními chorobami, rakovinou, mrtvicí a mnohými zánětlivými stavy. Zdroje antioxidantů mohou být přírodní nebo umělé. Přírodními zdroji antioxidantů jsou některé rostlinné potraviny. Řada antioxidantů je produkována během normálního metabolismu v těle. Je to například glutathion, ubichinol a kyselina močová. Mezi antioxidanty, které si tělo nedokáže vyrobit, patří vitamín E (α -tokoferol), vitamín C (kyselina askorbová) a β -karoten. Tyto mikronutrienty musí být přijímány ve stravě [35] [36].

2.4.1 Klasifikace antioxidantů

Antioxidanty jsou různorodá skupina látek, dělí se podle různých kritérií [37] [38]:

- podle původu: přirozené, syntetické;
- podle rozpustnosti: hydrofilní, lipofilní, amfifilní;
- podle způsobu vstupu do organismu: exogenní vstupující do organismu z vnějšího prostředí; endogenní, které si organismus vytváří sám (enzymy, hormony);
- podle velikosti molekuly: nízkomolekulární (vitamín C, β -karoten), vysokomolekulární (enzym superoxidismutáza);
- podle lokalizace: extracelulární (mimo buňku), intracelulární (uvnitř buňky).

Přirozenými antioxidanty jsou lipofilní vitamín E, karotenoidy a lecitiny. Mezi přirozené hydrofilní antioxidanty patří vitamín C (kyselina askorbová), rostlinné fenolické látky, například flavonoidy a antokyany. Mezi syntetické antioxidanty se řadí fenoly, například galláty (estery kyseliny gallové), dále siričity, které se používají pro zabránění hnědnutí brambor, kdy dochází k oxidaci polyfenolů na chinony [37].

2.4.2 Úrovně antioxidačního účinku

Antioxidanty působí v obranných systémech na různých úrovních. Mohou mít preventivní funkci, obrannou funkci a mohou být účinné k neutralizaci radikálů. Mechanismus působení antioxidantů je schopnost neutralizovat reaktivní částici tak, že dojde k přenosu elektronu a/nebo vodíku na reaktivní částici před tím, než reaktivní částice poškodí funkci lipidů, proteinů, enzymů, sacharidů a DNA v organismu [39].

První obrannou linii tvoří preventivní antioxidanty, které potlačují tvorbu volných radikálů. Pro potlačení takových reakcí je nutné předem snižovat obsah hydroperoxidů v těle a přeměňovat je na alkoholy a vodu, aniž by se uvolňovaly volné radikály. Glutathion peroxidáza je enzym obsahující čtyři selenové kofaktory, které katalyzují rozklad peroxidu vodíku a organických hydroperoxidů. Glutathion-s-transferáza a fosfolipid hydroperoxid glutathion peroxidáza (PHGPx) rozkládají lipidové hydroperoxydy na odpovídající alkoholy [40].

Druhou obrannou linii tvoří antioxidanty, které vychytávají aktivní radikály, aby nedocházelo k řetězovým reakcím. Antioxidanty mohou být hydrofilní nebo lipofilní. Hydrofilní antioxidanty jsou vitamín C, kyselina močová, bilirubin, albumin a thioly. Mezi lipofilní antioxidanty patří vitamín E a ubiquinol. Vitamín E chrání membrány před oxidací tak, že reaguje s lipidovými radikály produkovanými v lipidové peroxidační řetězové reakci [41] [42].

Třetí obrannou linii tvoří antioxidanty, které dokáží rozpoznávat, degradovat a odstraňovat oxidované proteiny a zabraňují hromadění těchto oxidovaných proteinů. Do této skupiny patří proteolytické enzymy, proteinázy, proteázy a peptidázy. Tyto enzymy jsou přítomné v cytosolu a v mitochondriích savčích buněk [41].

2.4.3 Rostliny jako zdroj antioxidantů

Antioxidanty se běžně využívají v potravinářství a v kosmetickém průmyslu. Využívají se přírodní a synteticky připravované antioxidanty, především v potravinách obsahujících oleje a tuky, aby nedošlo k oxidaci. Existuje celá řada syntetických fenolických antioxidantů, příkladem je butylhydroxytoluen (BHT) a butylhydroxyanisol (BHA). Některé fyzikální vlastnosti BHT a BHA, jako je vysoká těkavost a nestabilita při zvýšené teplotě, přísná legislativa týkající se používání syntetických potravinářských přídatných látek a preference spotřebitelů, přesunuly pozornost výrobců ze syntetických na přírodní antioxidanty [43].

V současné době existuje množství studií, které dokazují antioxidační potenciál ovoce. Silná antioxidační aktivita byla prokázána u třešní, citrusových plodů, švestek a oliv. Zelené a černé čaje mají také silné antioxidační vlastnosti, obsahují velké množství fenolických sloučenin [44].

2.5 Biologicky aktivní látky v rýmovníku

V posledním desetiletí se vědecký zájem zaměřil na zkoumání biologické aktivity byliny *Plectranthus amboinicus*, na izolaci bioaktivních sloučenin a na pochopení farmakologického účinku těchto sloučenin. Chemický profil a obsah biologicky aktivních látek v různých částech rostliny je odlišný v závislosti na podnebí, různých fázích sběru rostlinného materiálu a je také geograficky proměnlivý. Mezi bioaktivní sloučeniny identifikované v olejové složce listů rýmovníku patří karvakrol, thymol, β -karyofylen, α -humulen, γ -terpinen, p-cymen, α -terpineol a β -selinen [10].

Extrakty z *P. amboinicus* vykazují celou řadu biologických účinků díky jejich chemickému složení. Obsahují fenolické sloučeniny, například kyselinu kávovou, kyselinu rozmarýnovou, flavonoidy luteolin, kvercetin a rutin. Tyto látky se podílejí na antimikrobiálních, protizánětlivých, antioxidačních a analgetických vlastnostech. Extrakty vykazují antimikrobiální aktivitu proti širokému spektru bakterií, kvasinek, plísní a také antivirovou aktivitu proti viru vezikulární stomatitidy. Rovněž je lze využít k léčbě malárie a jako alternativu k chemickým insekticidům a larvicidům. Použití éterického oleje z *Plectranthus amboinicus* má potenciál fungovat jako pomalé, ale dlouhodobé a ekologické řešení k potlačení populace komárů s malarickými vektory [8] [10] [45] [46].

Listy rostliny při testování na morčatech vykazovaly pozitivní bronchodilatační aktivitu díky obsahu thymolu a karvakrolu. A proto jsou odvary a šťávy z listů rýmovníku používány na karibských ostrovech a v Indii k léčbě chronického kašle, astmatu, bronchitidy a bolesti v krku [47] [48].

Někteří obyvatelé indického venkova konzumují listy *P. amboinicus* v kombinaci s probiotickými potravinami, například s podmáslem nebo jogurty, při zažívacích obtížích vyvolaných patogenními mikroorganismy. V Indonésii a Malajsii je šťáva z rozdrcených listů

používána při léčbě zácpy. V asijských oblastech a v Malajsii jsou listy používány jako obklad po kousnutí stonožky a štíra [49].

Gurgel a kol. [50] v roce 2009 provedli experimentální *in vivo* studii zaměřenou na protizánětlivé a protinádorové účinky listů z *P. amboinicus*. Výsledky ukázaly významnou inhibici růstu nádorů na tlapkách myši, které byly léčeny dávkou 350 mg·kg⁻¹ hexanového extraktu. Bylo také pozorováno výrazné snížení otoku tlapek při dávkách 150, 250 a 350 mg·kg⁻¹ hexanového extraktu. Inhibiční účinky ethylacetátového extraktu na růst rakovinných buněk v prsu byly pozorovány ve studii Hasibuan a kol. [51]. Ramalakshmi a kol. [52] zjistili, že ethanolový extrakt z *P. amboinicus* indukuje apoptózu v buněčné linii A549 lidské rakoviny plic.

Thippeswamy a kol. [53] provedli výzkum, který se zabýval regulací metabolismu sacharidů alkoholovým extraktem z listů *P. amboinicus* u krys trpících diabetem vyvolaným alloxanem. V této studii krysy trpěly hyperglykemií a při léčbě extraktem došlo k postupnému snížení hladiny glukózy v séru, čímž byl prokázán hypoglykemický účinek *P. amboinicus*. Tyto účinky mohou být způsobeny přítomností flavonoidů. Na základě výsledků studie lze předpokládat, že by se *Plectranthus amboinicus* mohl v budoucnu stát součástí fytofarmakologických přípravků pro léčbu diabetu.

V rostlině *P. amboinicus* bylo identifikováno 76 těkavých a 30 netěkavých sloučenin patřících do různých tříd fytochemikálií, jako jsou monoterpenoidy, diterpenoidy, triterpenoidy, seskviterpenoidy, fenoly, flavonoidy, estery, alkoholy a aldehydy [10].

2.5.1 Těkavé sloučeniny v *P. amboinicus*

Éterický olej, který byl získán z listů a stonků rostliny *P. amboinicus*, obsahoval 76 těkavých sloučenin. Ukázka těch nejvíce zastoupených je uvedena v tabulce 3. Nejvíce zastoupeny byly thymol a karvakrol, dále se jednalo o monoterpenoidy obsahující kyslík, monoterpenové uhlovodíky, seskviterpenové uhlovodíky a okysličené seskviterpeny [10] [54].

Pino a kol. [55] provedli extrakci éterického oleje z *P. amboinicus* pomocí hexanu, destilací vodní parou a superkritickou fluidní extrakcí oxidem uhličitým, přičemž zjistili, že jednotlivé metody poskytují odlišný chemický profil sloučenin. Metoda extrakce hexanem poskytla vyšší výtěžek olejnatých sloučenin (6,52 %) ve srovnání s destilací vodní parou (0,55 %) a superkritickou fluidní extrakcí (1,40 %).

Dle studie Asiimwe a kol. [56] jsou v listech *P. amboinicus* nejvíce zastoupeny těkavé složky linalool (50,3 %), geranyl-acetát (11,75 %), nerol-acetát (11,6 %), karvakrol (10,3 %), γ -terpinen (3,2 %), *p*-cymen (2,9 %), nerol (2,3 %), α -4- karenen (1,3 %), karyofylen (1,2 %) a β -myrcen (0,8 %). Složky byly extrahovány pomocí head-space mikroextrakce tuhou fází (HS-SPME) a analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Tabulka 3: Příklady těkavých sloučenin identifikovaných v extraktech z *P. amboinicus* metodou GC-MS [10]

Skupina	Název sloučeniny
Monoterpenové uhlovodíky	δ -3-karenen
	<i>p</i> -cymen
	limonen
	β -myrcen
	ocimen

Tabulka 3: Příklady těkavých sloučenin identifikovaných v extraktech z *P. amboinicus* metodou GC-MS – pokračování [10]

Skupina	Název sloučeniny
Monoterpenové uhlovodíky	α -pinen
	β -pinen
	sabinen
Kyslíkaté monoterpeny	kafr
	karvakrol
	eugenol
	geraniol
	linalool
	thymol
Seskviterpenové uhlovodíky	α -amorphen
	α -bergamoten
	β -bergamoten
	β -karyofylen
	α -kopaen
Kyslíkaté seskviterpeny	karyofylen oxid
	β -cedren epoxid
	β -eudesmol
Jiné (terpeny, estery, mastné kyseliny, alkoholy, aldehydy)	1,2-benzendiol 4-(1,1 dimethylethyl)
	chavikol
	methyl oktanoát
	kyselina olejová
	fytol
	skvalen
	thymol acetát

2.5.2 Netěkavé sloučeniny v *P. amboinicus*

Mezi netěkavé chemické sloučeniny vyskytující se v extraktech *Plectranthus amboinicus* patří fenolové kyseliny a flavonoidy. Příklad těch nejvíce zastoupených je uveden v tabulce 4. V ethylacetátových frakcích stonků a kořenů rýmovníku analyzovaných pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS), byla identifikována přítomnost kyseliny rosmarinové, chrysoeriolu, kyseliny kávové a p-kumarové. Sloučeniny eriodictyol, luteolin a kvercetin byly identifikovány pouze v ethylacetátových frakcích stonků [10].

Tabulka 4: Příklady netěkavých sloučenin identifikovaných v extraktech z *P. amboinicus* různými analytickými metodami [10]

	Název sloučeniny	Použitá analytická metoda
Fenolové kyseliny	kyselina kávová	UV/NMR/UPLC/MS/HPLC
	kyselina gallová	HPLC
	kyselina p-kumarová	UV/NMR/UPLC/MS/HPLC
	kyselina rosmarinová	UV/NMR/UPLC/MS/HPLC
Flavonoidy	chrysoeriol	UV/NMR/UPLC/MS
	luteolin	UV/NMR/UPLC-MS
	rutin	HPLC
	kvercetin	UV/NMR/UPLC/MS/HPLC
	thymochinon	UV/NMR/MS/HPLC

UV – ultrafialové, NMR – nukleární magnetická rezonance, UPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, MS – hmotnostní spektrometrie, HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

2.6 Metody používané pro získání a charakterizaci extraktů rostlin

2.6.1 Extrakční metody

Rostliny obsahují širokou škálu bioaktivních sloučenin. Extrakty z rostlin jsou používány v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Pro stanovení složení a množství biologicky a aromaticky aktivních látek v rostlinách je popsáno mnoho různých metod extrakce. Hlavním faktorem, který zajišťuje kvalitu éterických olejů je použitá extrakční metoda. Nevhodně zvolené extrakční postupy mohou způsobit destrukci a ovlivnit působení a obsah fytochemikálií v esenciálních olejích [57].

Extrakční metody lze rozdělit do dvou skupin [57]:

- Konvenční metody
- Inovativní metody

2.6.1.1 Konvenční metody extrakce

Konvenční metody extrakce, například Soxhletova, jsou obvykle časově velmi náročné a vyžadují velké množství rozpouštědla. Proto roste poptávka po nových extrakčních metodách s kratší dobou extrakce a sníženou spotřebou organických rozpouštědel. Nové extrakční techniky pracují při zvýšené teplotě a/nebo tlaku, což výrazně zkrátí dobu extrakce [58].

Hydrodestilace

Hydrodestilace je nejstarší a nejjednodušší metoda pro získávání éterických olejů. Velkou výhodou této extrakční techniky je schopnost izolace aromatických látek z rostlinného materiálu teplotou nižší než 100 °C. Tato metoda není vhodná pro termolabilní látky. Voda používaná v průběhu hydrodestilace je nemísitelná s většinou terpenických molekul éterického oleje, proto je možné tyto dvě složky jednoduše oddělit dekantací. Nevýhodou je časová náročnost této metody, a proto není vhodné ji používat pro velké množství vzorků [57] [59].

Princip je založen na azeotropní destilaci. Při hydrodestilaci je rostlinný materiál ponořen do vroucí vody. Rostlinný materiál absorbuje část vody. Při atmosférickém tlaku

vzniká heterogenní směs éterického oleje a vody. Tato směs je odpařena při teplotě varu nižší než 100 °C. V chladiči dojde ke kondenzaci par. V separační části destilační aparatury dojde k oddělení organické fáze (éterického oleje) od vodné fáze [60] [61].

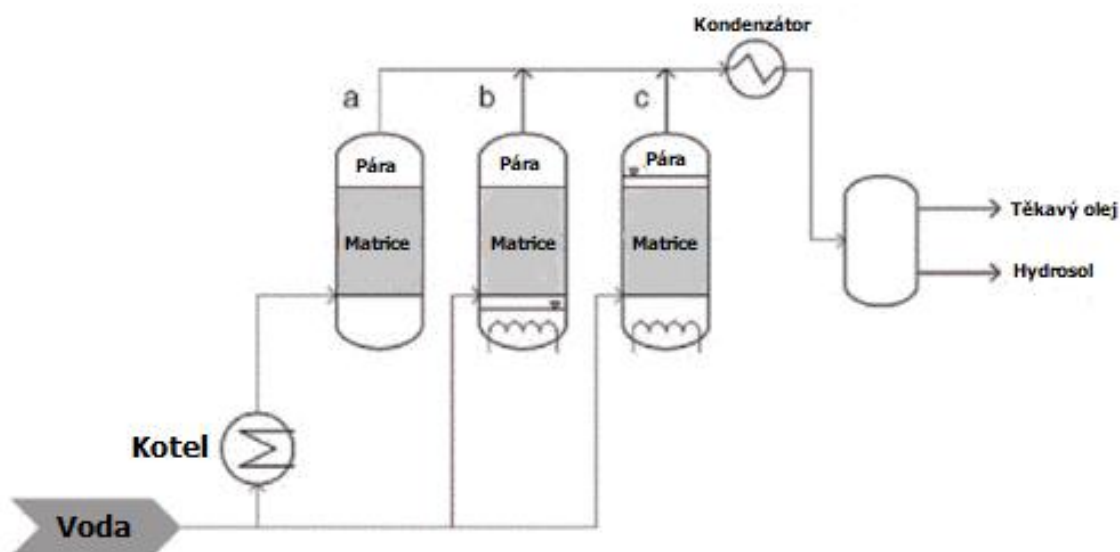
Hydrodestilaci pro přípravu éterických olejů z *P. amboinicus* použili například Manjamalai a Berlin Grace [62], Vasconcelos a kol. [63], Hsu a Ho [64]. Dao a kol. [65] pro extrakci éterického oleje použili kombinaci hydrodestilace a mikrovlnné extrakce.

Parní destilace

Parní destilace je proces používaný pro izolaci termolabilních látek nerozpustných ve vodě, jako jsou například éterické oleje z rostlin. Podstatou parní destilace je destilace sloučenin nebo jejich směsi při teplotě nižší, než je skutečná teplota varu samotné sloučeniny. Díky smísení éterického oleje s vroucí vodou nebo vodní párou dojde k těkání sloučenin z éterického oleje už při teplotách kolem 100 °C při atmosférickém tlaku [66].

Voda a/nebo pára slouží jako extrakční činidlo k odpařování nebo uvolňování těkavých sloučenin z rostlinného materiálu. Vznikající sloučeniny absorbují teplo z páry a stanou se těkavými, poté jsou transportovány do páry, kde jsou rozptýleny. Výsledná parní fáze je ochlazená, čímž těkavé látky zkondenzují. V tomto procesu jsou získány dva produkty: těkavý olej a hydrosol. Těkavý olej se nachází v horní fázi a hydrosol, který se skládá z vody a hydrolyzovaných sloučenin, je ve spodní fázi. Podle typu interakce mezi rostlinnou maticí a vodou a/nebo párou, existují tři možné varianty (viz obrázek 6): suchá parní destilace (a), přímá parní destilace (b) a hydrodestilace (c) [67].

Extrakci listů *P. amboinicus* parní destilací použili Bezerra a kol. [68], Lopes a kol. [69] a Pino a kol. [55].



Obrázek 6: Schéma různých typů destilace vodní parou [67]

Macerace

Macerace je nejjednodušší způsob extrakce rostlinného materiálu. Při maceraci se rostlinný materiál upraví na malé části krájením či drcením, smíchá se v nádobě s rozpouštědlem a nechá se určitou dobu stát při laboratorní teplotě. Po ukončení procesu se oddělí rozpouštědlo od pevné matrice filtrací [70].

Maceraci jako extrakční techniku použili Taher a kol. [71] ve výzkumu antimalarické aktivity *Plectranthus amboinicus* proti *Plasmodium berghei*. Tuto techniku použili také Patel a kol. [72] při výzkumu fyzikálně-chemického složení listů.

Extrakce rozpouštědlem

Rozpouštědlo používané k extrakci léčivých rostlin se označuje také jako menstruum. Volba vhodného rozpouštědla závisí především na typu rostliny, části rostliny, která se má extrahovat, dále také na povaze bioaktivních sloučenin a dostupnosti rozpouštědla. Obecně platí, že se pro extrakci polárních sloučenin používají polární rozpouštědla jako je voda, methanol, ethanol. Při extrakci nepolárních sloučenin se používají nepolární rozpouštědla, například hexan a dichlormethan. Při výběru rozpouštědla je nutné vzít v úvahu různé faktory [73]:

- selektivitu – schopnost rozpouštědla extrahovat aktivní složku,
- bezpečnost – ideální rozpouštědlo by mělo být netoxické a nehořlavé,
- náklady – co nejnižší cena rozpouštědla,
- reaktivita – vhodné extrakční rozpouštědlo by nemělo reagovat s extraktem,
- teplota varu – měla by být co nejnižší, aby nedošlo k degradaci termolabilních sloučenin.

Při extrakci rozpouštědlem se vzorek rostliny smísí s rozpouštědlem, připravená směs se extrahuje buď při pokojové teplotě, nebo se směs mírně zahřeje. Poté následuje filtrace a odpaření rozpouštědla.

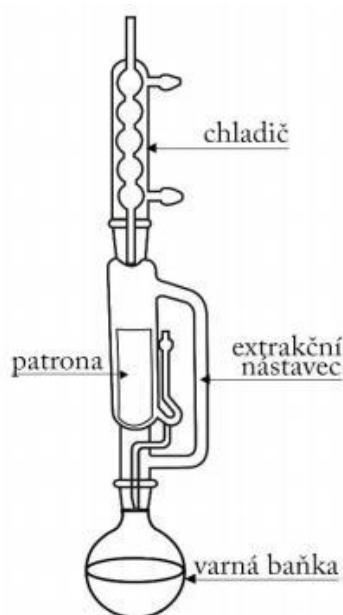
Extrakci vodou, ethanolem, hexanem nebo jejich směsí v různých poměrech používali Wibisono a kol. [74] pro optimalizaci celkového množství extrahovaných flavonoidů a inhibiční aktivity α -glukosidázy z listů *P. amboinicus*.

Soxhletova extrakce

Jedním z možných způsobů je extrakce v Soxhletově extraktoru (viz obrázek 7). Soxhletova extrakce je metoda automatické kontinuální extrakce s vysokou účinností. Postup spočívá v navážení jemně mletého vzorku do patrony, která je umístěna v aparatuře. Extrakční rozpouštědlo je zahříváno ve varné baňce, odkud se odpařuje do patrony se vzorkem, vymývá rozpustné komponenty z tuhé matrice vzorku, kondenzuje v chladiči. Rozpouštědlo obsahující rozpouštěné analyty je poté vráceno do varné baňky a proces je opakován, dokud nejsou požadované komponenty ze vzorku izolovány v dostatečném množství. Výhodou této metody jsou nižší pořizovací náklady, malé nároky na obsluhu, jednoduchá obsluha přístroje a kontakt vzorku s rozpouštědlem po celou dobu procesu. Nevýhodou je časová náročnost extrakce (až 20 hodin) a velká spotřeba organických rozpouštědel. Moderní extrakční techniky (například systém Soxtherm, Soxtec) jsou založeny na tom, že vzorek je během procesu ponořen přímo v organickém rozpouštědle, čímž dojde k dočasnému zvýšení teploty extrakce. Dočasným zvýšením teploty může však dojít k degradaci méně stabilních sloučenin [70] [75].

Důležitým parametrem pro správné provedení Soxhletovy extrakce je volba vhodného rozpouštědla. Nejčastěji používaným rozpouštědlem je hexan, jehož hlavní složka *n*-hexan byl označen Agenturou pro ochranu životního prostředí v USA jako látka znečišťující životní prostředí. Proto se z důvodu ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti začala používat alternativní rozpouštědla jako je isopropanol, ethanol, a dokonce i voda [76].

Chong a Wahida [77] použili Soxhletovu metodu pro optimalizaci extrakce thymolu z listů *P. amboinicus* metodou plochy odezvy (RSM). Jako rozpouštědlo byl použit ethanol, *n*-hexan a diethylether. Doba extrakce byla nastavena na 4 až 6 hodin.



Obrázek 7: Soxhletův extraktor [78]

2.6.1.2 Inovativní metody extrakce

Důvody, proč se začaly rozvíjet nové extrakční metody jsou zejména ty, že v konvenčních metodách extrakce éterické oleje podléhaly různým chemickým změnám, především oxidaci a izomeraci. V konvenčních metodách jsou často také používány vysoké teploty, které ovlivňují kvalitu éterických olejů. Proto jsou v inovativních extrakčních technikách zohledněny následující parametry: kratší doba a nižší teplota extrakce, spotřeba energie, použité rozpouštědlo [57].

Superkritická fluidní extrakce

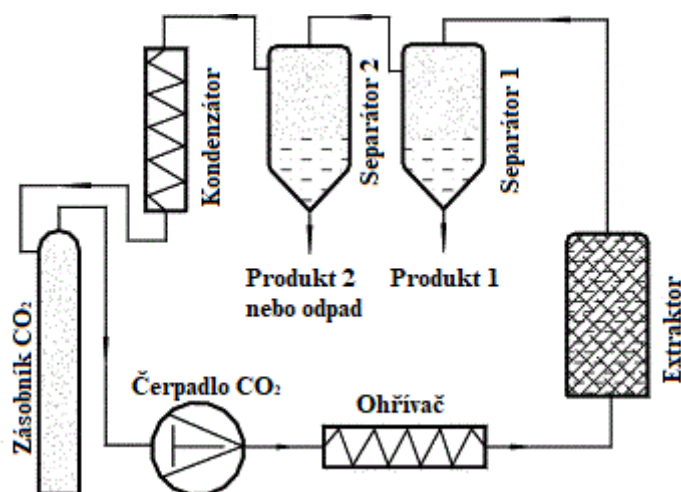
Superkritická fluidní extrakce (*Supercritical Fluid Extraction – SFE*) je metoda, která pro extrakci analytů z matrice používá superkritickou kapalinu. Tato metoda umožňuje zpracování rostlinného materiálu při nízkých teplotách, čímž omezuje degradaci termolabilních látek, a vyhýbá se použití toxických rozpouštědel [34].

Jako rozpouštědlo se používá oxid uhličitý v superkritickém stavu, kdy má oxid uhličitý nízkou kritickou teplotu 31 °C a kritický tlak větší než 73 atm. Výhodou použití oxidu uhličitého jako rozpouštědla je jeho chemická inertnost, nehořlavost, je snadno odstranitelný a lehce dostupný za relativně nízkou cenu. Oxid uhličitý má nízkou polaritu, a proto je vhodný pro extrakci nepolárních látek, kterými jsou i éterické oleje. Pomocí této metody nelze extrahovat fenoly, alkaloidy a glykosidové sloučeniny, jelikož jsou špatně rozpustné v oxidu uhličitém [34] [58].

Instrumentace superkritické fluidní extrakce je na obrázku 8. Rostlinný materiál je vložen do extrakční nádoby vybavené teplotními regulátory a tlakovými ventily pro dodržení požadovaných podmínek extrakce. Oxid uhličitý je pod tlakem čerpán v podobě superkritické kapaliny do extrakční nádoby. Superkritická kapalina je spolu s rozpuštěnými sloučeninami z rostlinného materiálu transportována do separátorů, kde dojde k usazování extraktu. Extrakt se shromažďuje ventilem ve spodní části separátorů. Superkritický oxid uhličitý se oddělí od extraktu, regeneruje se a znovu se používá [58].

Superkritickou fluidní extrakci oxidem uhličitým v rámci studie chemického složení těkavých látek z *P. amboinicus* provedli Pino a kol. [55]. Jako další srovnávací metody ve studii

byly použity: parní destilace a extrakce rozpouštědlem. Matias a kol. [79] při zkoumání cytotoxické aktivity diterpenů z *Plectranthus madagascariensis* použili taktéž superkritickou fluidní extrakci.



Obrázek 8: Instrumentace superkritické fluidní extrakce [58]

Mikrovlnná extrakce

Mikrovlnná extrakce (*Microwave-Assisted Extraction – MAE*) je extrakční technika, která kombinuje mikrovlnnou energii a tradiční extrakci rozpouštědlem. Používání MAE začalo na konci 80. let, kdy se tato technika stala velmi efektivní a populární díky technologickému vývoji. Princip mikrovlnné extrakce spočívá v aplikaci mikrovln pro ohřev extrakčních rozpouštědel, čímž dochází ke zvýšení kinetiky reakce. Mikrovlny mohou pronikat biomateriálem, interagovat s polárními molekulami a vytvářet tak teplo. Voda obsažená v rostlinné matici absorbuje mikrovlnnou energii, čímž dojde k přehřátí buněk a jejich narušení. V důsledku narušení buněk dojde k uvolnění chemických látek z matrice a zvýšení výtěžku extrahovatelných látek. Výhody MAE spočívají v kratší době extrakce, menším množství použitého rozpouštědla, vyšší rychlosti extrakce a v nižších nákladech. S postupem času se rozvinuly i další variace této techniky jako je tlaková mikrovlnná extrakce (PMAE) a mikrovlnná extrakce bez rozpouštědla (SFMAE) [58] [80].

Mikrovlnnou extrakcí se ve studii zabývali Nabilah a kol. [81]. Cílem bylo určit optimální provozní podmínky extrakčního procesu *P. amboinicus* změnou doby ozařování, koncentrace rozpouštědla a poměru rozpouštědla k rostlinnému materiálu.

Ultrazvuková extrakce

Ultrazvuková extrakce (*Ultrasonic-Assisted Extraction – UAE*) využívá zvukové vlny s vyšší frekvencí, než je zvuk slyšitelný lidským uchem. Podle intenzity a frekvence ultrazvukové vlny rozlišujeme vysokofrekvenční ultrazvuk a silový ultrazvuk. Vysokofrekvenční ultrazvuk má frekvenci 2 až 20 MHz a využívá se pro lékařské zobrazování a analýzu kvality potravin. Silový ultrazvuk pracuje na nižších frekvencích než vysokofrekvenční, a to 20 až 100 kHz. Tento typ ultrazvuku se využívá pro extrakce bioaktivních sloučenin, extrakce olejů, povrchovou dekontaminaci, mikrobiální inaktivaci a inaktivaci enzymů [82].

Ultrazvukem asistovaná extrakce je založena na principu akustické nebo ultrazvukové kavitace. V důsledku kavitace se zvyšuje kontakt mezi použitým rozpouštědlem a vzorkem, dochází ke vzniku tlakových rozdílů a k vysokým smykovým silám. Tím dojde k narušení částic, rostlinných buněk nebo tkání a ke zvýšení transportu rozpouštědla do buněk [70].

Faktorů, které ovlivňují průběh ultrazvukové extrakce, je více. Je to frekvence ultrazvuku, tlak, teplota, doba působení ultrazvuku, rozpouštědlo, dále pak vlastnosti používaného rostlinného materiálu, například vlhkost a velikost částic. Výhodou tohoto typu extrakce je zejména její kratší extrakční čas a nižší spotřeba rozpouštědla. Pokud však během ultrazvukové extrakce bude použita frekvence vyšší než 20 kHz, může to mít negativní vliv na aktivní fytochemikálie a dojde ke vzniku volných radikálů [58] [70].

Ukázalo se, že UAE je ve srovnání s macerací a mikrovlnnou extrakcí efektivnější metoda používaná pro extrakci například propolisu z hlediska vysokého extrakčního výtěžku, doby extrakce a celkového obsahu fenolických látek [83].

Metodu ultrazvukové extrakce pro zjištění koncentrace thymolu z listů *Plectranthus amboinicus* použili Zahari a kol. [84]. Z kinetické analýzy extrakce bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace thymolu (5,51 %) lze dosáhnout při teplotě 25 °C.

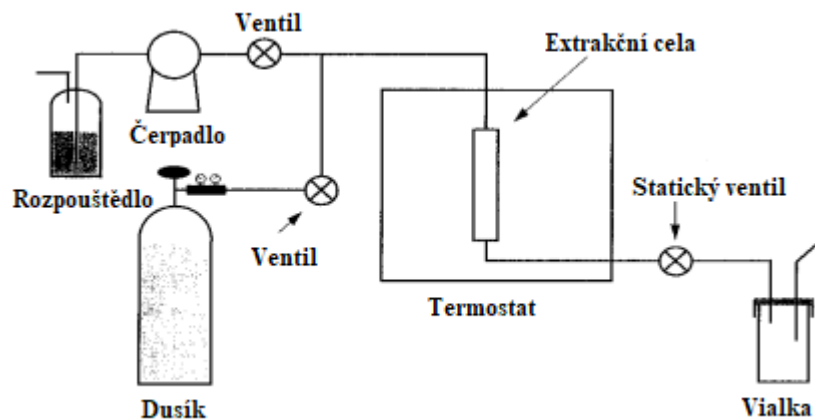
Extrakce za zvýšeného tlaku a teploty

Extrakce za zvýšeného tlaku a teploty (*Accelerated Solvent Extraction – ASE, Pressurised Fluid Extraction – PFE, Pressurised Solvent Extraction – PSE*) probíhá při tlacích 10 až 15 MPa a teplotách 50 až 200 °C. Extrakce se provádí při vysokém tlaku, aby rozpouštědlo bylo v kapalném skupenství, tedy v kritickém stavu. Zvýšená teplota urychluje kinetiku reakce [58].

V porovnání se Soxhletovou extrakcí je u ASE mnohem menší spotřeba rozpouštědla a kratší extrakční doba. Pokud však bude použita v průběhu ASE vysoká extrakční teplota, může dojít k degradaci termolabilních sloučenin. Extrakce za zvýšeného tlaku a teploty je vhodná pro extrakci stabilních organických sloučenin z matrice [85].

ASE byla původně vyvinuta pro rychlou extrakci kokainu a benzoylecgoninu z listů koky za použití methanolu jako rozpouštědla [86].

Vysokotlakou extrakci rozpouštědlem použili Laila a kol. [87] při identifikaci fytochemických sloučenin v *P. amboinicus*. Instrumentace extrakce je znázorněna na obrázku 9.



Obrázek 9: Instrumentace extrakce za zvýšeného tlaku a teploty [85]

2.7 Metody stanovení antimikrobiální aktivity

Rostliny obsahují obrovské množství strukturně rozmanitých sloučenin. Proto byl výzkum v posledních letech zaměřen na zkoumání rostlinných extraktů, éterických olejů a sekundárních metabolitů také jako potenciálních antimikrobiálních látek. Metody pro stanovení antimikrobiální aktivity se dělí na difúzní a diluční [88].

2.7.1 Difúzní metody – kvalitativní

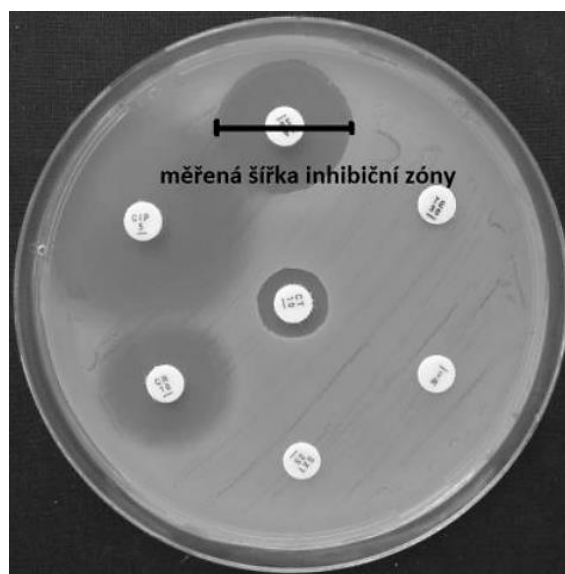
Mezi kvalitativní metody stanovení antimikrobiální aktivity patří disková difúzní metoda a gradientová metoda E-test. Jedná se o techniky používané pro stanovení citlivosti daného mikroorganismu na antimikrobiální látku.

2.7.1.1 Disková difúzní metoda

Disková difúzní metoda (viz obrázek 10) byla vyvinuta v roce 1940. Je to jednoduchá a často používaná metoda pro rutinní testování antimikrobiální aktivity v mikrobiologických laboratořích [89].

Princip spočívá v naočkování agarových ploten testovaným mikroorganismem. Poté se na povrch agaru umístí papírové disky o průměru přibližně 6 mm, které jsou napuštěny antimikrobiální látkou v požadované koncentraci. Antimikrobiální látka z papírového disku během kultivace difunduje do agaru a inhibuje růst testovaného organismu z kultivačního média, přičemž vznikají inhibiční zóny. Vyhodnocení výsledků se provádí měřením inhibičních zón. Dle velikosti vzniklé inhibiční zóny jsou mikroorganismy rozdělovány na citlivé, středně citlivé nebo rezistentní vůči použité antimikrobiální látce [88] [90].

Tato metoda není vhodná pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), není totiž možné kvantifikovat množství antimikrobiální látky, která difunduje do média. Výhodou difúzní diskové metody je její jednoduché provedení, nízká cena, možnost testovat širokou škálu mikroorganismů a snadná interpretace výsledků [88].

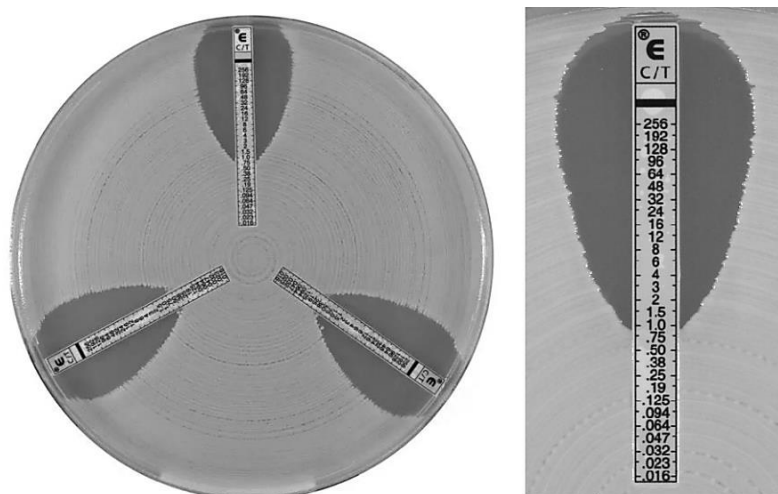


Obrázek 10: Disková difúzní metoda [91]

2.7.1.2 Gradientová metoda (E-test)

Metoda antimikrobiálního gradientu kombinuje princip difúzní (kvalitativní) a diluční (kvantitativní) metody za účelem stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotika (MIC). E-test (viz obrázek 11) je založený na vytvoření koncentračního gradientu v okolí antimikrobiálního činidla testovaného na agarovém médiu. Antimikrobiálního činidlo má podobu diagnostického proužku, ve kterém se logaritmicky snižuje koncentrace léčiva. Vzniklá inhibiční zóna má tvar kapky. V místě, kde kapka protíná diagnostický proužek, je možné odečíst hodnotu MIC [88].

Tato metoda se používá pro stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik a antimykotik. E-test je možné použít také ke studiu kombinovaného účinku dvou antibiotik. Výhodou je jednoduché použití, nevýhodou E-testu je vyšší cena [88] [92].



Obrázek 11: Gradientová metoda (E-test) [93]

2.7.2 Diluční metody – kvantitativní

Diluční metody jsou kvantitativní, používají se ke zjištění míry citlivosti nebo rezistence. K základním metodám pro stanovení citlivosti patří agarová diluční metoda, diluční mikrometoda a již zmíněný E-test. Diluční metody se používají ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) nebo minimální baktericidní koncentrace (MIB) antibiotika na agarových či bujonových půdách, která bude potřebná pro inhibici růstu sledované bakterie. Používaná antibiotika jsou ředěna geometrickou řadou. Agarová diluční metoda je používána jako referenční metoda hodnotící citlivost jiných metod k antimikrobiálním látkám [91].

2.7.3 Antimikrobiální aktivita extraktů z rýmovníku

Rostlinný extrakt z *P. amboinicus* vykazoval například antibakteriální aktivitu proti methicilin-rezistentnímu *Staphylococcus aureus* (MRSA) na myším modelu [94] a bylo prokázáno, že extrakty jsou účinné také proti infekcím reprodukčního traktu způsobeným kmeny *Candida albicans*, *Proteus vulgaris* a *Klebsiella pneumoniae* [95].

Extrakt vykazuje inhibiční aktivitu proti parazitu *Plasmodium berghei* vyvolávajícímu malárii. Éterické oleje z *P. amboinicus* obsahují velké množství monoterpenů, jako je limonen, linalool, α -pinen, β -pinen, cymen, α -terpinen, dominantními jsou thymol a karvakrol. Tyto složky mají potenciál být poměrně levným a šetrným prostředkem ke kontrole a redukci populace komárů přenášejících malárii a další infekce, jako je virus zika, žlutá zimnice a horečka dengue [8] [96].

Swamy a kol. [97] hodnotili antimikrobiální aktivitu extraktů z listů *P. amboinicus* difúzní diskovou metodou. Test zahrnoval čtyři bakteriální druhy, jmenovitě *Bacillus subtilis*, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, a kvasinku *Candida albicans*. Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla pozorována v methanolovém extraktu pro *B. subtilis* a *S. aureus*. Hexanové ani acetonové extrakty však nedokázaly inhibovat růst *E. coli*.

Antibakteriální aktivitou hexanových, ethylacetátových, acetonových, methanolových extraktů z listů *P. amboinicus* agarovou diluční metodou se zabývali Bhatt a Negi [98]. Pro studii byly použity čtyři mikroorganismy: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia*

coli a *Yersinia enterocolitica*. Ze všech extraktů vykazoval acetonový extrakt nejnižší hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (MIC) oproti testovaným kulturám. Ačkoli acetonový extrakt obsahoval menší množství fenolických složek než ethylacetátový, vykazoval vyšší antibakteriální aktivitu. Ve studii byla také prokázána vyšší rezistence gramnegativních bakterií ve srovnání s grampozitivními u všech extraktů, což je přičítáno rozdílu ve složení buněčné stěny.

V práci Hassani a kol. [99] byla zjišťována antimikrobiální aktivita éterického oleje z *P. amboinicus*, izolovaného pomocí hydrodestilace, za použití difúzních testů na agarovém gelu. Výsledky ukázaly, že éterický olej z *P. amboinicus* i zde vykazoval vyšší antimikrobiální aktivitu proti grampozitivním bakteriím (*Staphylococcus aureus*) než proti gramnegativním bakteriím (*Escherichia coli*). Minimální inhibiční koncentrace byla 0,2 % pro *E. coli* a 0,1 % pro *S. aureus*.

Sivaranjani a kol. [100] testovali methanolové a chloroformové extrakty z listů *Plectranthus amboinicus* v koncentracích 50 mg·ml⁻¹ a 100 mg·ml⁻¹ proti devíti bakteriím, tj. *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus*, kvasince *Candida albicans*, a plísním *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* a *Aspergillus flavus*. Methanolový extrakt vykazoval nejvyšší antimikrobiální aktivitu proti *K. pneumoniae* (MIC = 35 mm při koncentraci extraktu 100 mg·ml⁻¹) a *C. albicans* (MIC = 40 mm v 100 mg·ml⁻¹). Naopak *S. flexneri* nevykazovala žádnou inhibici působením methanolového extraktu. V případě chloroformového extraktu byla nejvyšší antibakteriální aktivita pozorována proti *E. faecalis* (MIC = 17 mm v 100 mg·ml⁻¹) a *B. cereus* (MIC = 17 mm v 100 mg·ml⁻¹). Chloroformový extrakt taktéž nebyl účinný proti *S. flexneri* a *P. aeruginosa*. Ve studii bylo také prokázáno, že ani jeden z extraktů nebyl účinný proti plísním rodu *Aspergillus*, u nichž nebyla zaznamenána žádná zóna inhibice.

2.8 Metody stanovení obsahu celkových polyfenolických látek

Metody pro stanovení obsahu celkových polyfenolických látek jsou většinou založeny na oxidačně-redukčních reakcích. Používají se tři spektrofotometrické metody [101]:

- Folin-Ciocalteu (FCM),
- Price a Butler (PBM),
- metoda s 4-aminoantipyrinem (AAPM).

V metodě Price a Butlera (PBM) dochází k oxidaci fenolátového aniontu na fenolátový radikál a současně je hexakyanoželezitan redukován na hexakyanoželeznatan za vzniku pruské modři. Někdy je tato metoda nazývána také jako metoda pruská modř. Je možné ji použít například pro kvantifikaci tříslovin ve víně [102].

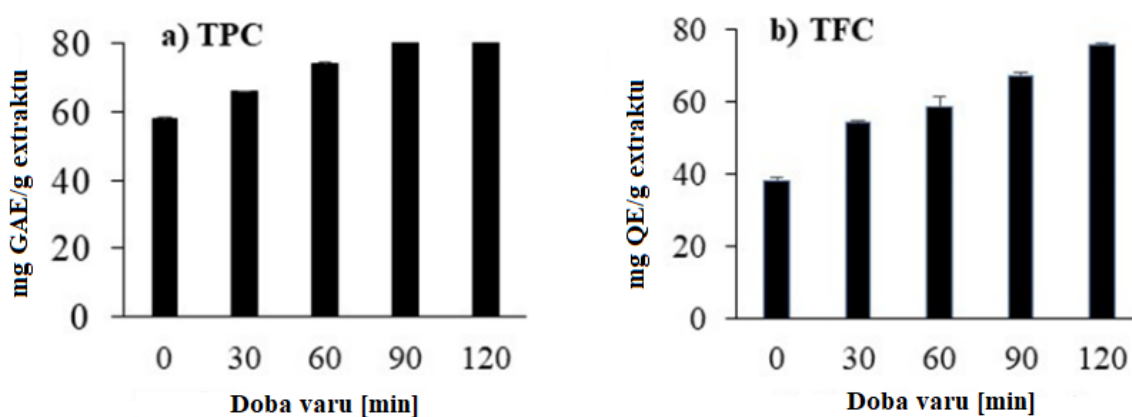
Metoda stanovení s 4-aminoantipyrinem (AAPM) je založena na reakci fenolů reagujících za určitých podmínek za vzniku barevných komplexů.

2.8.1 Folin-Ciocalteu metoda

Při Folin-Ciocalteu metodě (FCM) dochází k redukci směsi fosfomolybdenanu a fosfowolframanu fenolickými sloučeninami za vzniku modrých produktů. Fenolické sloučeniny reagují s Folin-Ciocalteu činidlem pouze za bazických podmínek (za použití roztoku uhličitanu sodného při pH kolem 10). Vzniklé modré komplexy jsou sledovány spektrofotometricky při 750 až 765 nm. Výsledné naměřené koncentrace fenolových sloučenin ve vzorku jsou vyjádřeny jako ekvivalentní množství kyseliny gallové dle kalibrační křivky, i proto je tato metoda někdy nazývána jako GAE (*Gallic Acid Equivalent method*). FCM je

běžně používána pro stanovení obsahu celkových polyfenolických látek v rostlinných extraktech a šťávách [101] [102].

Shamsul a Siti Fatimah Zahrah [103] se zabývali vlivem varu na antioxidační aktivitu, celkový obsah polyfenolických látek (TPC) a celkový obsah flavonoidů (TFC) v ethanolových extraktech z listů *Plectranthus amboinicus*. Vzorky byly vařeny po dobu 30, 60, 90 a 120 minut. TPC v ethanolových extraktech byl stanoven Folin-Ciocalteu metodou. Jako standard byla použita kyselina gallová. Optická hustota byla odečtena spektrofotometricky při 765 nm. Obsah celkových polyfenolických látek ve vzorcích byl vyjádřen jako miligram ekvivalentu kyseliny gallové na gram extraktu ($\text{mg GAE} \cdot \text{g}^{-1}$). TFC ve vzorcích byl stanoven kolorimetrickou metodou pomocí chloridu hlinitého, kdy dochází k tvorbě barevného komplexu, jehož absorbance se odečítá spektrofotometricky při 506 nm. Jako standard byl použit kvercetin. Celkový obsah flavonoidů ve vzorcích byl vyjádřen jako miligram ekvivalentu kvercetinu na gram vzorku ($\text{mg QE} \cdot \text{g}^{-1}$). Zvýšení TPC a TFC v ethanolových extraktech během varu silně korelovalo s antioxidační aktivitou stanovenou metodami TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), DPPH a FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma). Existují dva možné důvody, proč došlo ke zvýšení antioxidační aktivity po tepelném zpracování. První je, že nastala inaktivace enzymu polyfenoloxidázy, čímž došlo k inhibici degradace polyfenolů. Druhým důvodem mohla být Maillardova reakce, probíhající jako následek tepelného zpracování, při níž se rozkládají polyfenolické látky a tvoří se látky nové s vyšší antioxidační aktivitou.



Obrázek 12: Celkový obsah polyfenolických látek (TPC) a celkový obsah flavonoidů (TFC) v ethanolových extraktech z listů *Plectranthus amboinicus* – převzato z [103]

Ve studii Shamsul a Siti Fatimah Zahrah [103] zjistili, že TPC v extraktech z vařených vzorků po dobu 30, 60, 90 a 120 minut byl vyšší o 13,09 %, 27,65 %, 47,51 % a 67,13 %, v tomto pořadí, než v extraktech z nevařených vzorků na hladině významnosti 0,05. Podobný vzorec byl také zaznamenán pro množství TFC, kdy v extraktech z vařených vzorků po dobu 30, 60, 90 a 120 minut byl vyšší o 42,85 %, 53,89 %, 75,99 % a 99,06 %, v tomto pořadí, než v extraktech z nevařených vzorků na hladině významnosti 0,05 (viz obrázek 12).

El-Hawary a kol. [104] studovali obsah fenolů a taninů v listech, stoncích a kořenech *P. amboinicus* pomocí činidel Folin-Ciocalteu a Folin-Denis.

2.9 Metody stanovení antioxidační aktivity

Analytické metody pro stanovení antioxidační kapacity jsou rozlišovány do tří kategorií – metody spektrofotometrické, elektrochemické a chromatografické. Nejznámější a nejrozšířenější spektrofotometrické metody jsou popsány v následujících kapitolách.

2.9.1 TEAC metoda – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

Metoda TEAC je založena na schopnosti vzorku zhaset kation-radikál ABTS^{•+} ((2,2'-azino-bis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). ABTS je peroxidázový substrát, který při oxidaci peroxylovými radikály za přítomnosti peroxidu vodíku vytváří intenzivně zbarvený kation-radikál ABTS^{•+}. Výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu. V důsledku zhasení radikálu dochází ke změnám v absorpčním spektru ABTS^{•+} a měří se absorbance při vlnové délce v rozmezí 600 až 750 nm, nejčastěji však při 734 nm [105] [106].

Pro oxidaci ABTS je možné použít také chemickou látku, například peroxidisíran draselný nebo oxid manganičitý. Pro stanovení je možno používat dva postupy. První postup je, že se antioxidant přidává do reakční směsi, ve které je radikál ABTS^{•+} již přítomen. Druhou možností je generování radikálu v reakční směsi za přítomnosti antioxidantu [105].

Tato metoda je používána nejčastěji pro snadné provedení a možnost měření v širokém rozmezí pH. Umožňuje stanovení hydrofilních i lipofilních antioxidantů, například karotenoidů a tokoferolů [106].

2.9.2 DPPH metoda

Principem metody DPPH je reakce testované látky se stabilním radikálem difenylpicrylhydrazylem DPPH ((1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Během reakce dochází k redukci radikálu na DPPH-H. Intenzivní fialové zbarvení je způsobeno přítomností nepárového elektronu na dusíku hydrazylu. Působením antioxidačních látek se intenzita fialového zbarvení snižuje. Průběh reakce je sledován spektrofotometricky poklesem absorbance při vlnové délce 517 nm nebo metodou elektronové spinové rezonance [105].

Výhodou metody využívající DPPH je jednoduché a rychlé provedení. Nevýhodou je, že se DPPH rozpouští pouze v organických rozpouštědlech. Není vhodná pro stanovení hydrofilních antioxidantů. Interference absorbance sloučenin ze vzorku může komplikovat kvantitativní analýzu [106] [107].

2.9.3 FRAP metoda – Ferric Reducing Ability of Plasma

FRAP se řadí mezi chemické metody stanovení antioxidační kapacity. Metoda je založena na schopnosti antioxidačních látek redukovat žlutý tripyridyltriazin železitý (Fe³⁺-TPTZ) na modrý železnatý komplex (Fe²⁺-TPTZ). Vzniklý modrý komplex je stanovován spektrofotometricky při vlnové délce 593 nm a při kyselém pH = 3,6 pro udržení rozpustnosti železa. Metoda FRAP odráží schopnost látek redukovat iont Fe³⁺, což nemusí pozitivně korelovat s celkovou antioxidační aktivitou vzorku [105] [106].

2.9.4 ORAC metoda – Oxygen Radical Absorbance Capacity

ORAC metoda je široce používána pro měření antioxidační aktivity vitamínů, fytochemikálií a dalších organických i anorganických sloučenin. Je to fluorescenční metoda, jejímž principem je vychytávání peroxylového radikálu antioxidanty ve vzorku. Peroxylový radikál je indukován 2,2-azobis-2-amidinopropan hydrochloridem při 37 °C. Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence β-fykoerytrinu po ataku radikály. ORAC metoda se vyznačuje vysokou

citlivostí a možností měřit antioxidační aktivitu u hydrofilních i lipofilních látek. Limity metody spočívají v citlivosti na změny teplot a pH [105] [106] [108].

2.9.5 CUPRAC metoda – Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity

CUPRAC metoda je založena na redukci Cu^{2+} na Cu^+ antioxidanty přítomnými ve vzorku. Pro stanovení se používá chromogenní oxidační činidlo komplex neokuproin s měďnatými ionty. Vzniká oranžovo-žlutý komplex, který je stanovován spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 450 nm. Chromogenní oxidační činidlo je stabilnější než jiná činidla, například ABTS, DPPH. Stanovení probíhá při neutrálním pH, je vhodné pro hydrofilní i lipofilní látky [106].

2.9.6 Antioxidační aktivita extraktů rýmovníku

Základním složením éterického oleje z listů *P. amboinicus* a jeho antioxidační aktivitou v závislosti na ročním období se zabývali Bezerra a kol. [68]. Jako extrakční techniky byly použity hydrodestilace a destilace vodní parou. Ve studii bylo ověřeno, že éterické oleje získané hydrodestilací vykazovaly lepší antioxidační aktivitu. Antioxidační aktivita byla stanovena metodou DPPH. Vzorky sbírané v dubnu 2014 a v říjnu 2014 vykazovaly nejlepší hodnoty inhibičních koncentrací (IC_{50}) $132,6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a $125,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, což bylo pravděpodobně způsobeno vysokou koncentrací karvakrolu. Ve vzorku rostliny sebraném v červenci 2014 nebyla pozorována významná antioxidační aktivita. Vzorky získané v lednu 2015 vykazovaly nejhorší hodnoty $\text{IC}_{50} = 352,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ při hydrodestilaci a $\text{IC}_{50} = 595,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ při destilaci vodní parou.

Hasibuan a kol. [109] se zabývali antioxidačními vlastnostmi ethylacetátových frakcí z listů *Plectranthus amboinicus*. Pro stanovení antioxidační aktivity byla použita metoda DPPH. Jednotlivé frakce vykazovaly hodnoty antioxidační aktivity v rozmezí od 124 do $137 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Shamsul a Siti Fatimah Zahrah [103] se zabývali vlivem varu na antioxidační aktivitu v ethanolových extraktech z listů *Plectranthus amboinicus*, pro jejíž stanovení použili metody TEAC, DPPH a FRAP. Více informací je popsáno v kapitole 2.8.1.

2.10 Stanovení aromaticky aktivních látek

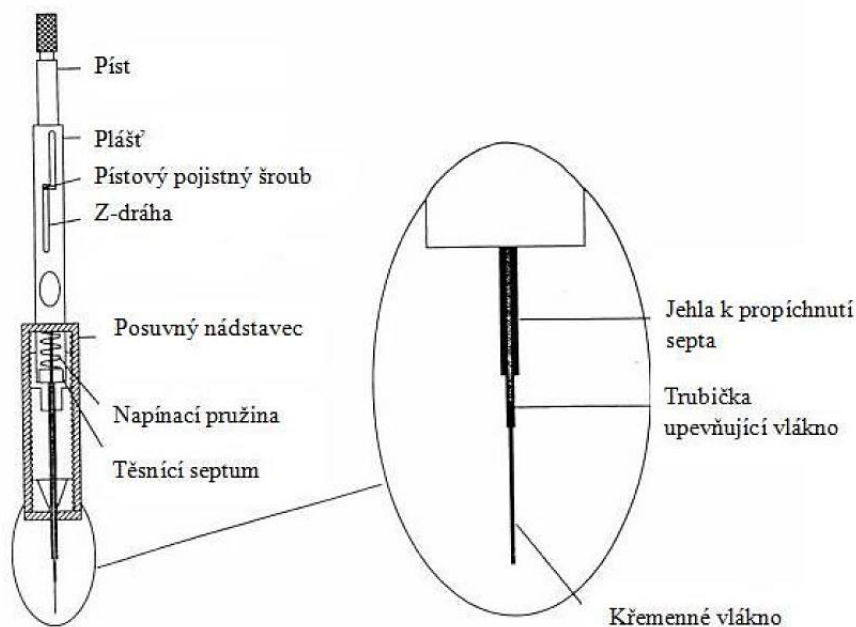
Těkavé aromatické látky je možné stanovit buď analytickými technikami, například plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií, nebo olfaktometrickými technikami. Olfaktometrie je založena na hodnocení intenzity pachu jednotlivých složek směsi a je prováděna skupinou odborníků. Na rozdíl od chemické analýzy touto metodou nelze identifikovat přesné chemické složení [110].

2.10.1 Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází (*Solid Phase Micro Extraction – SPME*) je izolační metoda, která byla vyvinuta v roce 1989 Arthurem a Pawliszynem. Vzhledem k jednoduchosti, spolehlivosti, rychlosti a přesnosti je SPME často používána v kombinaci s plynovou a kapalinovou chromatografií s hmotnostní nebo UV detekcí. Odběr, extrakce a zakoncentrování vzorku je sjednoceno do jediného kroku bez přítomnosti rozpouštědel. Principem je sorpce složky vzorku na stacionární fázi, která pokrývá křemenné vlákno nacházející se uvnitř kovové jehly. Vlákno dokáže zachytit těkavé i netěkavé složky z plynných, kapalných a pevných vzorků [111] [112].

Proces je rozdělen do dvou částí. V první je analyt extrahován na křemenné vlákno, a následně dochází k desorpci ve chromatografu. Jehla s vláknem (viz obrázek 13) je zasunuta do vzorku, po ustavení sorpční rovnováhy se vlákno zatáhne zpět do jehly, a nakonec je vloženo

do nástřikového prostoru v chromatografu. Výsledky získané touto metodou mohou být ovlivněny polaritou a tloušťkou vrstvy na povrchu vlákna, vzorkovací metodou, iontovou silou roztoku, pH a mícháním vzorku. Jehla může být potažena různými materiály, například polydimethylsiloxanem, carboxenem, divinylbenzenem, polyakrylonitrilem nebo carbowaxem v různých tloušťkách [113].



Obrázek 13: SPME vlákno [113]

2.10.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (*Gas Chromatography – GC*) je fyzikálně-chemická technika separace směsi látek, založená na distribuci látek mezi mobilní a stacionární fází. Mobilní fází je inertní nosný plyn, jako je dusík, helium nebo vodík. Při vstřikování směsi látek na vstup kolony je každá složka směsi nosným plynem nesena směrem k detektoru. Aby došlo k oddělení, musí být součástí kolony stacionární fáze. V závislosti na tom, zda je stacionární fáze při své pracovní teplotě pevná nebo kapalná, je možno rozlišit plynovou absorpční chromatografii (*Gas-solid Chromatography – GSC*) a plynovou rozdělovací chromatografii (*Gas-liquid Chromatography – GLC*). Jedním z prvních použití plynové chromatografie ve forenzní vědě byla analýza drog. Aby bylo možné provést analýzu, musí mít sloučeniny relativně vysoký tlak par. Mnoho sloučenin lze analyzovat v jejich přirozené formě, jiné je třeba derivatizovat, aby byly dostatečně těkavé, méně polární a/nebo tepelně stabilnější. Distribuce molekul mezi stacionární a mobilní fází je definována distribučními konstantami [114] [115].

Plynová chromatografie je používána v kombinaci se specifickými a citlivými detektory, například s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) nebo detektorem plameno-ionizačním (GC-FID). Lze analyzovat tepelně stabilní látky, jejichž molekulová hmotnost je menší než 1000 Da a teplota varu nepřesahuje 500 °C. Je to metoda vhodná pro stanovení plynů, nedisociovaných kapalin, pevných organických molekul a organokovových látek. Naopak není vhodná pro stanovení makromolekulárních látek, organických a anorganických solí [116] [117].

Plynová chromatografie dokáže oddělit mnoho těkavých a polotěkavých sloučenin, ale ne vždy je detekuje, zatímco hmotnostní spektrometrie může detekovat mnoho sloučenin, ale

ne vždy je odděluje. Počáteční obavou při spojení těchto dvou technik byly významné rozdíly v tlacích, protože plyn opouštějící plynový chromatograf má tlak kolem jedné atmosféry (101 325 Pa), zatímco hmotnostní spektrometrie pracuje ve vakuu [118].

Způsob ionizace ve hmotnostní spektrometrii (MS) je volen podle skupenství analyzované látky:

- elektronová (EI) nebo chemická ionizace (CI) pro plynné vzorky,
- elektrosprej (ESI), chemická ionizace (APCI) nebo fotoionizace (APPI) za atmosférického tlaku pro kapalné vzorky,
- laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI) pro vzorky v pevném skupenství.

Vzniklé ionty jsou v hmotnostním spektrometru analyzovány iontovou pastí, kvadrupólovým analyzátozem nebo analyzátozem doby letu. Detektor poskytne pro každou složku hmotnostní spektrum, které je možné identifikovat porovnáním s knihovnou spekter v počítači [119].

Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí je často používána v biochemických analýzách ke stanovení mastných kyselin, aminokyselin a organických kyselin v moči, séru nebo plazmě [120]. GC-MS lze využívat také pro kvalitativní a kvantitativní analýzu kontaminujících látek a reziduí. Uplatnění má i při odhalování falšování potravin, což potvrdili Tsimidou a kol. [121], kteří touto metodou identifikovali přidání diethylenglykolu do vína a ethylenoxidu do koření.

Aplikace na analýzu rýmovníku a těkavé látky v něm identifikované jsou uvedeny v kapitole 2.5.1.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje

- Analytické digitální váhy HELAGO, GR–202–EC, Itálie
- Plynový chromatograf TraceTM 1310 se split/splitless injektorem, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Hmotnostní detektor ISQTM LT Single Quadropole, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Gaithersburg, Maryland, USA
- Vyhodnocovací systém Xcalibur 2.2 Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 µm, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA
- Vortex Vitrum Heidolph Reax Top, USA
- Sušárna Memmert, Německo
- Spektrofotometr Helios Gamma & Delta Spectronic Unicam, USA
- Autokláv Vaposteri, BMT, ČR
- Inkubátor LTE Scientific Ltd, Velká Británie
- Inkubátor Binder BD 115, USA
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2 Chemikálie

- Ethanol 96% p.a, Penta chemicals unlimited, ČR
- Uhličitan sodný bezvodý p.a, Central chem, SR
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich, USA
- Folin-Ciocalteuovo činidlo, Sigma-Aldrich, USA
- Peroxodisíran draselný p.a, Lach-ner, ČR
- ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)), Sigma-Aldrich, USA
- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), Sigma-Aldrich, USA

3.3 Analyzované vzorky

V experimentální části diplomové práce byly analyzovány vzorky byliny rýmovníku (*Plectranthus amboinicus*) z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Bylina byla vypěstována v laboratorních podmínkách. Pro experiment byly použity čerstvé listy i stonky rýmovníku nasekané nožem na částice o velikosti 3 až 5 mm (viz obrázek 14).



Obrázek 14: Nasekaný vzorek rýmovníku pro maceraci

Extrakty z rýmovníku byly připraveny metodou macerace. Zvolené množství nasekaného rýmovníku bylo společně s rozpouštědlem umístěno do Erlenmayerových baněk, přikryto alobalem a ponecháno při laboratorní teplotě či vyšších teplotách v sušárně po zvolenou dobu. Po ukončení macerace byly rýmovníkové extrakty zfiltrány a uchovány v lednici.

S ohledem na maximální zisk bioaktivních sloučenin, sensoricky a nutričně cenných složek byla provedena optimalizace podmínek macerace (viz kapitola 4.1).

3.4 Stanovení vybraných vlastností extraktů

U dílčích extraktů byl v rámci optimalizace stanoven vždy profil aromatických látek a obsah celkových polyfenolických látek. Na základě těchto vlastností byly vyhodnoceny podmínky, za kterých byl připraven optimální extrakt, u něhož byla navíc stanovena také antioxidační aktivita metodou TEAC a antimikrobiální aktivita.

3.4.1 Stanovení obsahu celkových polyfenolických látek

Celkový obsah polyfenolických látek byl stanoven Folin-Ciocalteu metodou spektrofotometricky při vlnové délce 750 nm.

3.4.1.1 Příprava standardního roztoku kyseliny gallové

Byl připraven standardní roztok kyseliny gallové o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Na analytických vahách bylo naváženo 0,025 g kyseliny gallové. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 25 ml. Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

3.4.1.2 Příprava 7,5% roztoku uhličitanu sodného

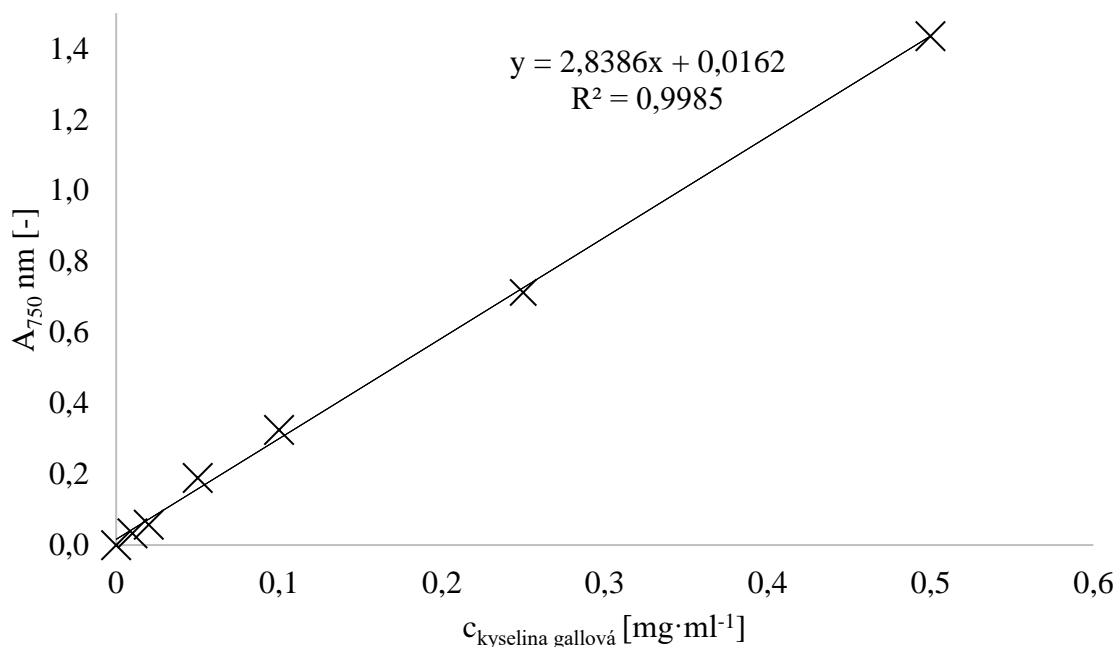
Byl připraven 7,5% roztok uhličitanu sodného. Na analytických vahách bylo naváženo 7,5 g uhličitanu sodného. Navážka byla rozpuštěna v 95 ml destilované vody a kvantitativně převedena do odměrné baňky na 100 ml. Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

3.4.1.3 Příprava kalibrační řady

Pro přípravu kalibrační řady byl použit standardní roztok kyseliny gallové o koncentracích: 0,01; 0,02; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Absorbance byla měřena při 750 nm proti slepému vzorku. Před stanovením byl připraven zředěný roztok Folin-Ciocalteu činidla v poměru 1 : 9.

Do zkumavek bylo napipetováno 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteu činidla, 1 ml destilované vody a 100 μl kalibračního standardu. Roztoky byly promíchány na vortexu. Po pěti

minutách byl do každé zkumavky napipetován 1 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného a obsah byl promíchán. Vzorky byly ponechány 45 minut v temnu, následně byly opět promíchány a byla proměřena jejich absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 750 nm oproti slepému vzorku. Slepý vzorek byl připraven stejným způsobem jako kalibrační řada, avšak místo kalibračního standardu bylo přidáno 100 µl destilované vody.



Graf 1: Kalibrační závislost absorbance kyseliny gallové na její koncentraci

3.4.1.4 Příprava vzorků

Samotné vzorky extraktů pro měření byly připraveny obdobným způsobem. Do zkumavky bylo napipetováno 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteu činidla, 1 ml destilované vody a 100 µl extraktu vzorku. Roztoky byly promíchány na vortexu. Po pěti minutách byl do každé zkumavky napipetován 1 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného a obsah byl promíchán. Vzorky byly ponechány 45 minut v temnu, následně opět promíchány a byla proměřena jejich absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 750 nm oproti slepému vzorku. Slepý vzorek byl připraven stejně, avšak místo vzorku byl přidáno 100 µl destilované vody.

Z rovnice regrese kalibrační křivky, zobrazené na grafu 1, byla vypočítána koncentrace celkových polyfenolických látek ve vzorcích extraktů jako ekvivalent kyseliny gallové v mg na gram rostliny ($\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$). Stanovení bylo provedeno pro každý vzorek třikrát.

3.4.2 Stanovení aromatických látek

V dílčích extraktech v rámci optimalizace i v optimalizovaných extraktech bylo provedeno stanovení aromaticky aktivních látek. Pro stanovení byla použita metoda headspace mikroextrakce tuhou fází s plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem (HS-SPME-GC-MS).

3.4.2.1 Příprava vzorků pro měření

Pro měření bylo vždy 2 ml extraktu napipetováno do vialky a uzavřeno kovovým šroubovacím uzávěrem s plynotěsným septem. Vialka byla vložena do autosampleru a byla spuštěna analýza. Identifikace aromatických látek byla založena na porovnání retenčních časů a hmotnostních

spekter s proměřenými standardy a s dostupnou knihovnou spekter. Obsah aromatických sloučenin ve vzorcích byl určen semikvantifikací z plochy identifikovaných píků.

Podmínky SPME extrakce

Doba inkubace (temperování)	10 minut
Teplota extrakce a inkubace (teplota agitátoru)	40 °C
Doba extrakce	20 minut
Agitátor zapnutý	5 sekund
Agitátor vypnutý	60 sekund

Podmínky GC-MS analýzy

Kapilární kolona	TG–WaxMS
Rozměry kolony	30 m × 0,25 mm × 0,5 μm
Teplota injektoru (desorpce)	240 °C
Doba desorpce	20 minut

Dávkování splitless, ventil uzavřen 10 minut

Nosný plyn	helium
Průtok nosného plynu	1 ml·min ⁻¹
Teplotní program	40 °C s výdrží 1 min., vzestupný gradient 5 °C/min do 220 °C s výdrží 22 minut
Celková doba analýzy	60 minut

Hmotnostní detektor v módu EI

Energie ionizačních elektronů	70 eV
Teplota iontového zdroje	200 °C
Skenovací rozsah m/z	30–370 amu
Rychlost skenování	0,2 s

3.4.3 Stanovení antioxidační aktivity optimalizovaného extraktu

Antioxidační aktivita získaného optimalizovaného extraktu byla stanovena metodou TEAC. Je to metoda, při níž se testuje schopnost vzorku zhášet kation-radikál ABTS^{•+}.

3.4.3.1 Příprava ABTS^{•+}

Rozpuštěním ABTS v destilované vodě bylo připraveno 10 ml roztoku ATBS o koncentraci 7 mmol·l⁻¹. Po reakci s 2,45 mmol·l⁻¹ peroxodisíranu draselného byl připraven radikálový kation ABTS^{•+}. Takto připravený roztok byl ponechán ve tmě a chladu po dobu 12 hodin.

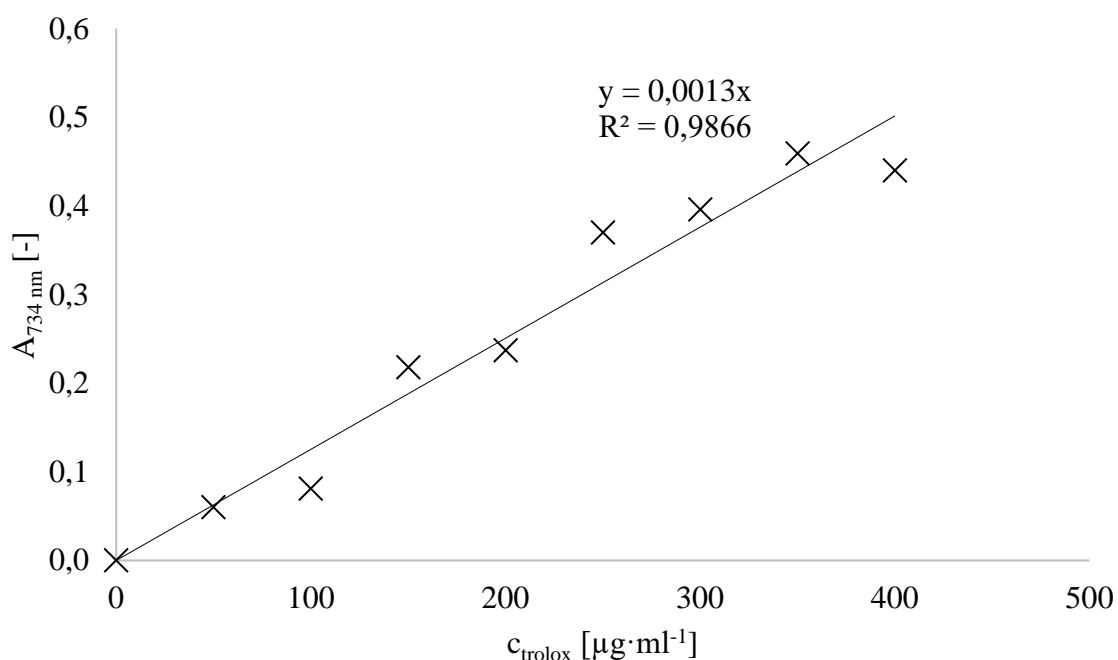
Před použitím byl roztok ABTS^{•+} zředěn 60% ethanolem na absorbanci 0,7 ± 0,02 při vlnové délce 734 nm (měřeno proti ethanolu) a následně byl používán pouze tento roztok.

3.4.3.2 Příprava kalibrační řady

Byl připraven standardní roztok Troloxu o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Z tohoto roztoku byla připravena řada osmi kalibračních roztoků o koncentracích $50\text{--}400 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Do zkumavky bylo nejprve napipetováno $10 \text{ } \mu\text{l}$ destilované vody a 1 ml zředěného roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a byla změřena absorbance při 734 nm v čase 0 (A_0). Při dalších měřeních bylo ve zkumavce smícháno $10 \text{ } \mu\text{l}$ roztoku z kalibrační řady a 1 ml zředěného roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Vzorek byl promíchán a uchován 10 minut ve tmě. Po uplynulých 10 minutách (A_{10}) byla změřena absorbance. Výsledná absorbance byla vypočítána podle rovnice (1).

$$A = A_0 - A_{10} \quad (1)$$



Graf 2: Kalibrační závislost absorbance Troloxu na jeho koncentraci

3.4.3.3 Příprava vzorků

Ve zkumavce bylo smícháno $10 \text{ } \mu\text{l}$ extraktu a 1 ml zředěného roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Vzorek byl promíchán a uchován 10 minut ve tmě. Po uplynulých 10 minutách (A_{10}) byla změřena absorbance. Výsledná absorbance byla vypočítána podle rovnice (1).

Výsledná antioxidační aktivita vzorků se vyjadřuje ekvivalentním množstvím Troloxu (TEAC) v $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Podle rovnice (2) bylo vypočítáno také procento zhášení radikálu.

$$\text{zhášení radikálu (\%)} = 100 \cdot \frac{A_0 - A_{10}}{A_0} \quad (2)$$

3.4.4 Stanovení antimikrobiální aktivity optimalizovaného extraktu

Antimikrobiální aktivita získaného optimalizovaného extraktu byla stanovena difúzní jamkovou metodou. Jako testovací mikroorganismy byly vybrány dva druhy bakterií – grampozitivní *Bacillus cereus*, gramnegativní *Escherichia coli*, a kvasinka *Candida glabrata*. Všechny použité mikroorganismy pochází z České sbírky mikroorganismů.

B. cereus a *C. glabrata* byly nejprve zaočkovány na šikmý agar a kultivovány týden při teplotě 25 °C. Následně byly přeočkovány z šikmého agaru do bujónu, který byl kultivován 24 hodin při teplotě 25 °C. Stejný postup byl zvolen také s *E. coli*, kultivace však probíhala při teplotě 37 °C.

3.4.4.1 Příprava kultivačních médií

Pro kultivaci bakterií *Bacillus cereus* a *Escherichia coli* byl použit masopeptonový agar (Nutrient Agar No.2) od výrobce HiMedia Laboratories. Složení média je popsáno v tabulce 5. Kultivační médium bylo připraveno rozpuštěním 8 g agaru v 200 ml destilované vody v Erlenmayerově baňce. Sterilizace média proběhla v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

Tabulka 5: Složení kultivačního média Nutrient Agar No.2

Složka	Obsah (g·l ⁻¹)
Masový pepton	10,0
Hovězí extrakt	10,0
Chlorid sodný	5,0
Agar	15,0

Pro kultivaci kvasinky *Candida glabrata* byl použit sladivový agar (Malt Extract Agar Base) od výrobce HiMedia Laboratories. Složení média je popsáno v tabulce 6. Kultivační médium bylo připraveno rozpuštěním 7,5 g agaru v 150 ml destilované vody v Erlenmayerově baňce. Sterilizace média proběhla v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

Tabulka 6: Složení kultivačního média Malt Extract Agar Base

Složka	Obsah (g·l ⁻¹)
Sladivý extrakt	30,0
Mykologický pepton	5,0
Agar	15,0

3.4.4.2 Ověření antimikrobiální aktivity

Pro stanovení antimikrobiální aktivity byla zvolena difúzní jamková metoda. Princip spočívá v difúzi připraveného extraktu do agaru s naočkováním testovaným mikroorganismem. V případě potlačení růstu mikroorganismu dojde k vytvoření tzv. inhibiční zóny.

Vysterilizované kultivační médium bylo zchlazeno na teplotu cca 45 °C. Do 200 ml vychlazeného masopeptonového agaru byly napipetovány 2 ml bujónu, který obsahoval 24 hodinovou kulturu bakterií *B. cereus* nebo *E. coli*. Při testování kvasinky bylo do 150 ml sladivového agaru napipetováno 1,5 ml bujónu obsahujícího *C. glabrata*. Připravená inokula byla promíchána a rozlita do Petriho misek. Pro *Escherichia coli* bylo třeba přelit již ztuhlé médium s inokulem další vrstvou masopeptonového agaru bez inokula, protože se jedná o fakultativně anaerobní mikroorganismus. Po ztuhnutí byly do agarových ploten vyvrtány čtyři jamky sterilním korkovrtem. Do tří jamek bylo napipetováno 100 µl zkoumaného extraktu, čtvrtá jamka byla kontrolní a bylo do ní pipetováno 100 µl 40% ethanolu kvůli ověření antimikrobiální aktivity daného rozpouštědla. Takto připravené Petriho misky s *B. cereus* a *C.*

glabrata byly kultivovány při 25 °C po dobu 72 hodin, v případě *E. coli* probíhala kultivace při 37 °C. Antimikrobiální aktivita byla vyhodnocena měřením průměru inhibiční zóny s přesností na milimetr.

3.5 Statistické zpracování výsledků

Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny pomocí programu MS Excel a Statistica 13. Výsledky jsou vyjádřeny ve tvaru průměr ± směrodatná odchylka, přičemž měření byla opakována dvakrát ($n = 2$).

Pro zjištění rozdílů mezi vzorky byla použita parametrická jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA – Analysis of Variance) s využitím Tukeyho HSD-testu a Kruskal-Wallisův test. Při zpracování výsledků obsahu polyfenolických sloučenin v dílčích extraktech byly předpokládány dvě hypotézy:

- H_0 – mezi získanými výsledky není statisticky významný rozdíl,
- H_a – mezi získanými výsledky existuje statisticky významný rozdíl.

Nejprve byla provedena deskriptivní analýza se zaměřením na Shapiro-Wilkův test pro zjištění normální či nenormální distribuce dat.

U dat s normální distribucí (typ rozpouštědla, navážka vzorku a teplota extrakce) byl proveden test homogenity rozptylu (Brown-Forsythův test) a jednofaktorová parametrická analýza rozptylu ANOVA s využitím Tukeyho HSD-testu.

U doby extrakce byla zjištěna nenormálně distribuovaná data, proto bylo nutné zvolit jednofaktorovou neparametrickou ANOVU, tj. Kruskal-Wallisův test. U neparametrických testů není možné použít Tukeyho test, proto se jako alternativa používá funkce vícenásobného porovnání p -hodnot. Veškeré testování bylo provedeno na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je součástí rozsáhlé studie zabývající se možnostmi získávání extraktů biologicky aktivních látek z vybraných druhů přírodních rostlinných materiálů a jejich aplikací do potravin, kosmetických a jiných výrobků.

Podstatou této diplomové práce byla optimalizace podmínek pro přípravu extraktů z rostliny *P. amboinicus* se zaměřením na maximální zisk bioaktivních sloučenin. Na základě studia literatury a provedených předběžných experimentů byla jako extrakční metoda zvolena jednoduchá macerace.

V rámci optimalizace podmínek se tato práce zaměřuje na vliv teploty, doby extrakce, koncentrace rozpouštědla a hmotnosti navážky rostlinného materiálu na vybrané vlastnosti extraktu. Podmínky, při nichž byl připraven extrakt obsahující nejvíce těkavých látek a celkových polyfenolů, byly vyhodnoceny jako optimální. Tyto podmínky byly následně zkombinovány a použity pro přípravu optimálního extraktu. Připravený optimální extrakt byl opět charakterizován z hlediska obsahu aromatických látek, celkových polyfenolických látek, a navíc také antioxidační a antimikrobiální aktivity.

4.1 Optimalizace podmínek macerace

Na základě studia literatury a provedených předběžných experimentů byly optimalizovány čtyři faktory, které významně ovlivňují výtěžek cílených látek: teplota a doba extrakce/macerace, koncentrace rozpouštědla a poměr hmotnosti rostlinného materiálu ku množství rozpouštědla. Každý vzorek v rámci optimalizace byl připraven ve dvou opakováních.

Pro přípravu extraktů byla testována teplota 20, 40 a 60 °C. Jako rozpouštědlo byla použita voda a ethanol o koncentracích 40 a 80 %. Navážka rýmovníku na 100 ml rozpouštědla byla 10, 20 a 30 g a doba extrakce 20, 40 a 60 minut. Podmínky zvolené k provedení experimentu jsou přehledně znázorněny v tabulce 7.

Jako kritéria kvality získaných extraktů byl sledován vždy profil těkavých látek a obsah polyfenolických sloučenin. Těkavé sloučeniny a jejich obsah jsou základním ukazatelem sensorické kvality získaného extraktu, obsah polyfenolů souvisí s antioxidační aktivitou, a tedy předpokládanou nutriční hodnotou extraktu.

Tabulka 7: Optimalizované parametry

číslo vzorku	teplota [°C]	čas [min]	rozpouštědla [%]	m _{navážky} [g/100 ml]
1	20	20	40	10
2	20	40	40	10
3	20	60	40	10
4	20	60	0	10
5	20	60	40	10
6	20	60	80	10
7	20	60	40	10
8	20	60	40	20
9	20	60	40	30

Tabulka 7: Optimalizované parametry – pokračování

číslo vzorku	teplota [°C]	čas [min]	rozpouštědla [%]	m _{navážky} [g/100 ml]
10	20	60	40	10
11	40	60	40	10
12	60	60	40	10

4.1.1 Obsah polyfenolických sloučenin v dílčích extraktech

Pro stanovení obsahu celkových polyfenolů byla použita Folin-Ciocalteu metoda, každý vzorek byl analyzován třikrát.

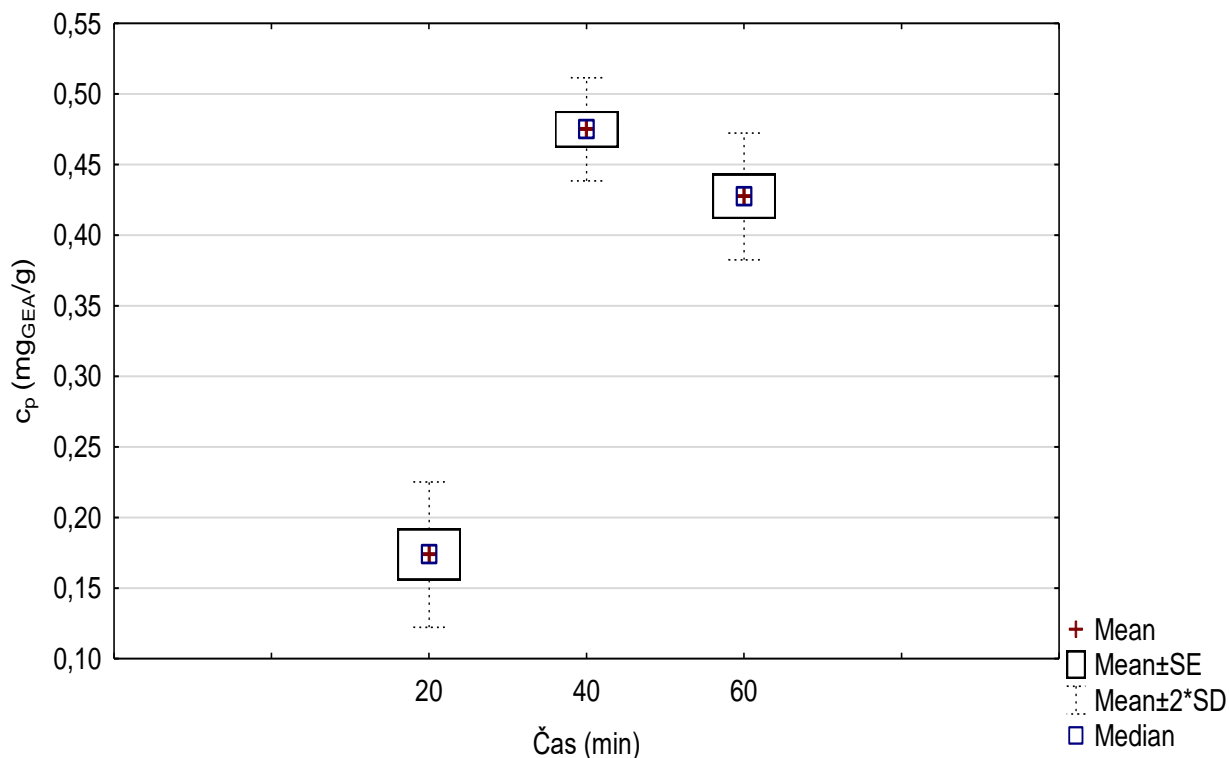
4.1.1.1 Vliv doby extrakce

Pro sledování proměnného parametru doby extrakce byl zvolen čas 20, 40 a 60 minut. Ostatní parametry extrakce byly neměnné, tzn. teplota byla nastavena na 20 °C, koncentrace ethanolu byla 40 % a hmotnost použitého rostlinného materiálu byla 10 g na 100 ml rozpouštědla.

Při delší době macerace lze očekávat vyšší výtěžek biologicky účinných látek, nicméně tento předpoklad se nepotvrdil. Nejnižší průměrný obsah polyfenolů $0,16 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ byl vyextrahován při době extrakce 20 minut. Naopak nejvyšší množství polyfenolů $0,49 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ bylo zjištěno při době extrakce 40 minut. Naměřené výsledky jsou prezentovány v tabulce 8 a grafu 3. K dosažení maximálního výtěžku polyfenolických látek tedy stačí 40 minut macerace.

Tabulka 8: Průměrný obsah polyfenolů ve vzorcích po době extrakce 20, 40 a 60 minut. Hodnoty ve sloupci označené jiným písmenem (a, b) se podle porovnání p-hodnot statisticky významně liší ($p < 0,05$).

Čas [min]	C _{polyfenoly} [$\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$] + SD		Min [$\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$]	Max [$\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$]
	vzorky A	vzorky B		
20	0,16a ± 0,00	0,19a ± 0,04	0,16	0,49
40	0,49b ± 0,01	0,46a ± 0,03		
60	0,41ab ± 0,02	0,44a ± 0,02		



Graf 3: Průměrný obsah polyfenolů ve vzorcích při době extrakce 20, 40 a 60 minut v $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$

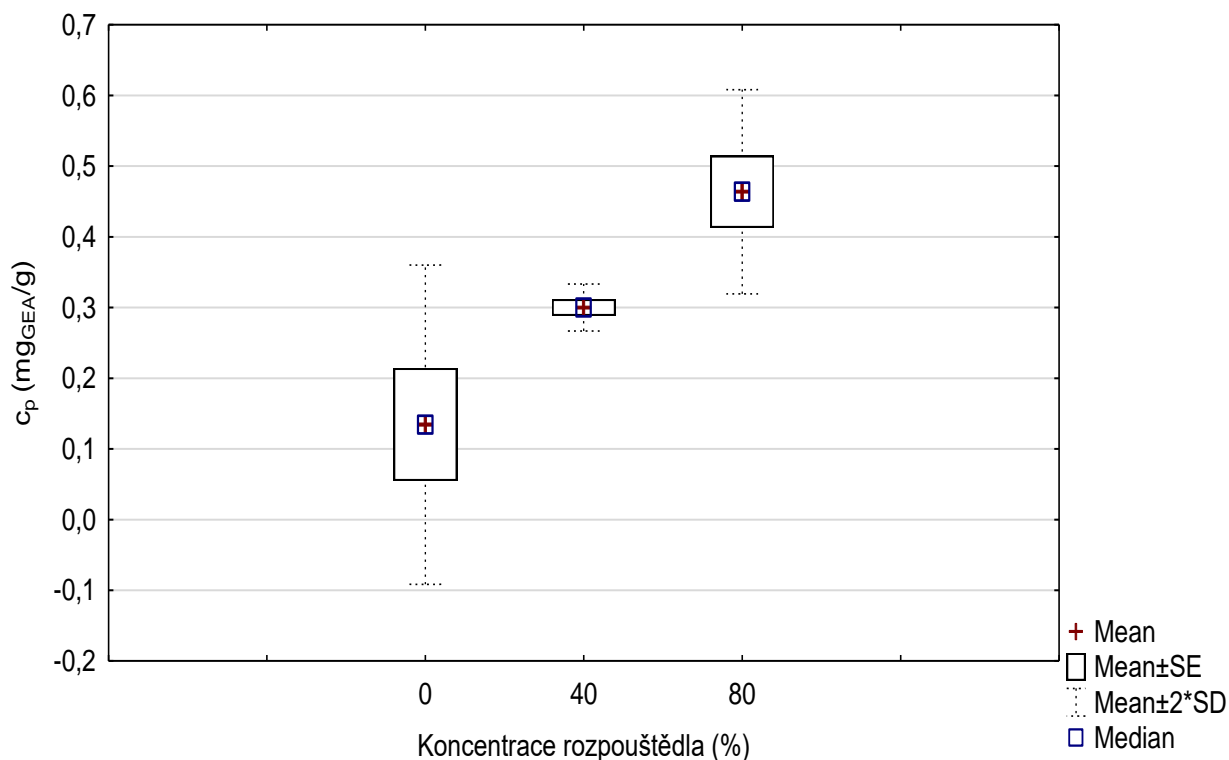
4.1.1.2 Vliv typu rozpouštědla

Při optimalizaci typu (koncentrace) rozpouštědla byla zvolena koncentrace ethanolu 0 % (tj. destilovaná voda), 40 % a 80 %. Ostatní parametry extrakce zůstaly nezměněny, tzn. teplota byla nastavena na 20 °C, doba extrakce 60 minut a hmotnost použitého rostlinného materiálu byla 10 g na 100 ml rozpouštědla.

Nejvyšší množství polyfenolů $0,52 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ bylo zjištěno při použití 80% ethanolu. Naopak nejméně polyfenolů ($0,05 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$) bylo vyextrahováno při použití vody jako rozpouštědla. Naměřené výsledky jsou prezentovány v tabulce 9 a grafu 4. Vyšší koncentrace ethanolu tedy poskytuje vyšší výtěžky polyfenolických látek.

Tabulka 9: Průměrný obsah polyfenolů ve vzorcích při koncentraci rozpouštědla 0, 40 a 80 %. Hodnoty ve sloupci označené jiným písmenem (a, b, c) se podle Tukeyho testu statisticky významně liší ($p < 0,05$).

Crozpouštědla [%]	Cpolyfenoly [$\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$] + SD		Min [$\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$]	Max [$\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$]
	vzorky A	vzorky B		
0	0,21a ± 0,03	0,05a ± 0,01	0,05	0,52
40	0,29ab ± 0,08	0,31b ± 0,05		
80	0,41b ± 0,03	0,52c ± 0,03		



Graf 4: Průměrný obsah polyfenolů ve vzorcích při použití rozpouštědla o koncentraci 0, 40 a 80 % v $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$

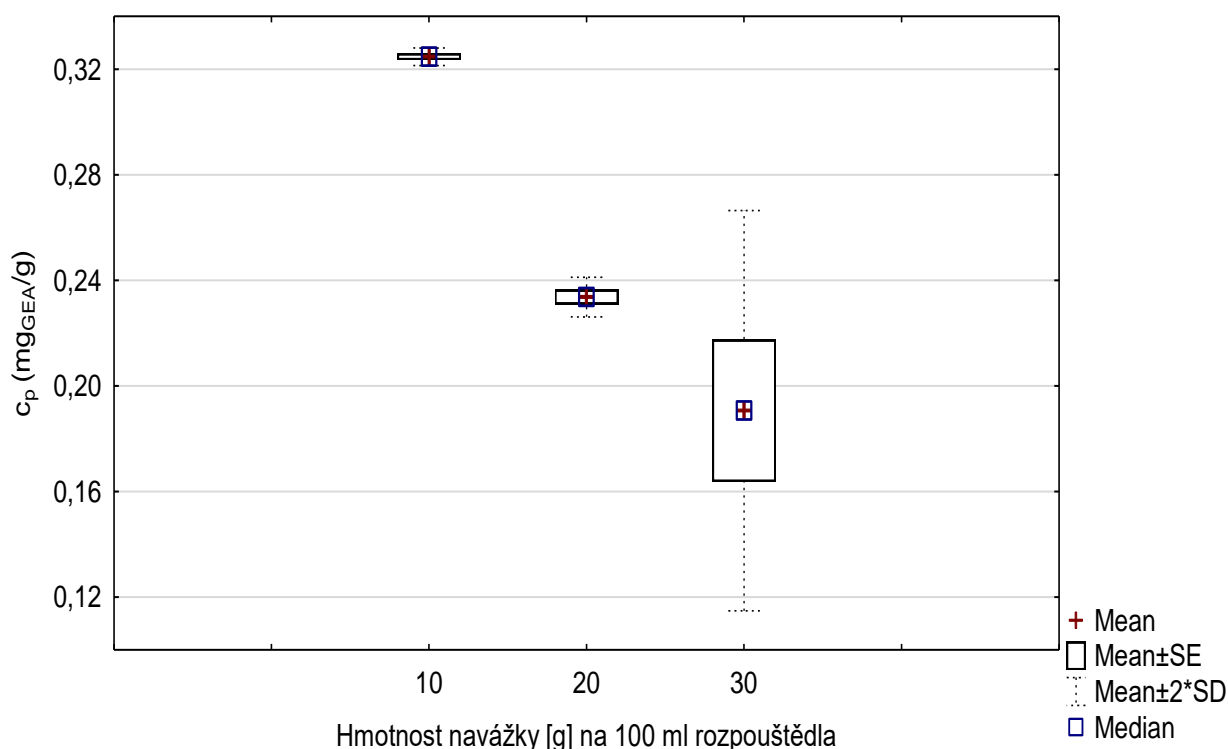
4.1.1.3 Vliv navážky vzorku

Při zkoumání vlivu navážky, resp. poměru navážka vs. rozpouštědlo, byly zvoleny podmínky: teplota 20 °C, doba extrakce 60 minut a rozpouštědlo 40% ethanol. Měnicím se faktorem byla hmotnost navážky, 10, 20 nebo 30 g na 100 ml rozpouštědla.

Nejvyšší množství polyfenolů $0,33 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ bylo identifikováno při použití navážky 10 g rostliny. Naopak nejméně polyfenolů $0,16 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ bylo zjištěno při použití nejvyšší navážky 30 g na 100 ml rozpouštědla. Naměřené výsledky jsou prezentovány v tabulce 10 a grafu 5. Jak je vidět, výtěžek celkových polyfenolů se překvapivě snižoval s nižším objemem rozpouštědla, resp. větším množstvím vzorku, nejvyšší výtěžek byl získán při poměru navážka/rozpouštědlo 1 : 10.

Tabulka 10: Průměrný obsah polyfenolů ve vzorcích při navážce 10, 20 a 30 g rýmovníku na 100 ml rozpouštědla. Hodnoty ve sloupci označené jiným písmenem (a, b, c) se podle Tukeyho testu statisticky významně liší ($p < 0,05$).

$m_{\text{navážky}} [\text{g}]$ na 100 ml	$C_{\text{polyfenoly}} [\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}] + \text{SD}$		Min [$\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$]	Max [$\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$]
	vzorky A	vzorky B		
10	$0,33\text{a} \pm 0,03$	$0,32\text{a} \pm 0,01$	0,16	0,33
20	$0,23\text{b} \pm 0,01$	$0,24\text{b} \pm 0,01$		
30	$0,22\text{b} \pm 0,03$	$0,16\text{c} \pm 0,01$		



Graf 5: Průměrný obsah polyfenolů ve vzorcích při navážce 10, 20 a 30 g rýmovníku na 100 ml rozpouštědla

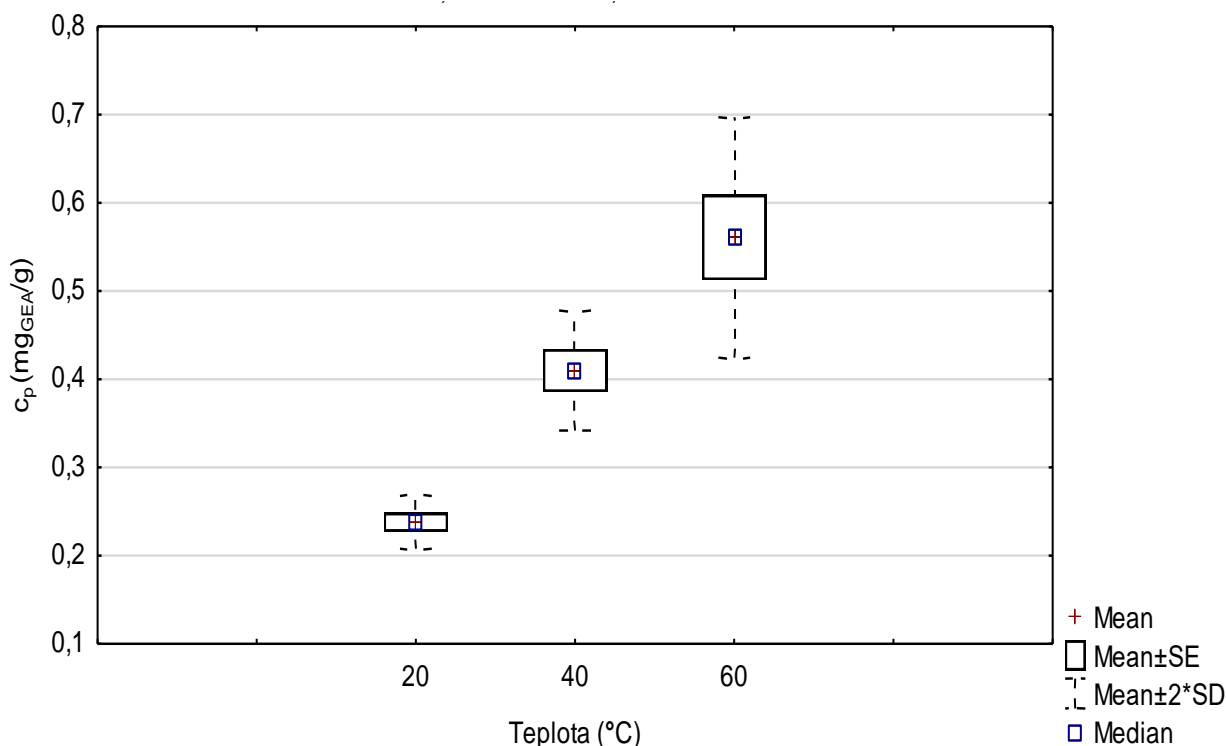
4.1.1.4 Vliv teploty extrakce

Pro sledování vlivu teploty na vlastnosti výsledného extraktu byla zvolena teplota 20, 40 a 60 °C. Ostatní parametry byly neměnné. Doba extrakce byla nastavena na 60 minut, koncentrace ethanolu jako rozpouštědla 40 % a hmotnost použitého rostlinného materiálu 10 g na 100 ml rozpouštědla.

Lze předpokládat vyšší zisk fenolů s vyšší teplotou, což se také potvrdilo. Nejvyšší množství polyfenolů 0,61 mg_{GAE}·g⁻¹ bylo identifikováno při použití teploty 60 °C. Naopak nejmenší obsah polyfenolů byl 0,23 mg_{GAE}·g⁻¹ při teplotě 20 °C. Naměřené výsledky jsou prezentovány v tabulce 11 a grafu 6. Na druhou stranu aplikace příliš vysoké teploty však není vhodná, protože může docházet k degradaci polyfenolických sloučenin.

Tabulka 11: Průměrný obsah polyfenolů ve vzorcích při teplotě 20, 40 a 60 °C. Hodnoty ve sloupci označené jiným písmenem (a, b, c) se podle Tukeyho testu statisticky významně liší ($p < 0,05$).

Teplota [°C]	C _{polyfenoly} [mg _{GAE} ·g ⁻¹] + SD		Min [mg _{GAE} ·g ⁻¹]	Max [mg _{GAE} ·g ⁻¹]
	vzorky A	vzorky B		
20	0,23a ± 0,04	0,25a ± 0,03	0,23	0,61
40	0,43b ± 0,03	0,39b ± 0,01		
60	0,61c ± 0,05	0,51c ± 0,03		



Graf 6: Průměrný obsah polyfenolů ve vzorcích při teplotě 20, 40 a 60 °C

4.1.2 Obsah těkavých látek v dílčích extraktech

Pro stanovení profilu těkavých látek byla použita metoda HS-SPME-GC-MS. Kombinace plynové chromatografie s hmotnostním detektorem byla zvolena z následujících důvodů. Plynová chromatografie se používá k separaci jednotlivých složek pomocí teploty v přiměřeném čase tak, aby mohly být studovány nezávisle na ostatních látkách. Podmínkou plynové chromatografie je skutečnost, že oddělené molekuly musí být v plynném skupenství. Plynová chromatografie není vhodná technika pro zkoumání samotných rostlin, protože většina sloučenin, které jsou jejich součástí, není v plynném skupenství. Po provedení extrakce z této rostliny vznikají éterické oleje, které obsahují stovky těkavých molekul, které snadno přechází do plynné fáze. Proto je tento typ chromatografie vhodný pro studium éterických olejů. Samotný plynový chromatograf pouze separuje a uvolňuje jednotlivé molekuly, ale neposkytuje informace o povaze a obsaženém množství jednotlivých látek přítomných v esenciálních olejích. Ke zkoumání těchto separovaných molekul slouží právě hmotnostně spektrometrický detektor [122].

GC-MS dokáže identifikovat většinu těkavých sloučenin, cizorodých látek a kontaminantů. Naopak většinou není možné detekovat pesticidy, netěkavé sloučeniny a těžké kovy a nelze určit, zda má detekovaná sloučenina přírodní nebo syntetický původ.

Výsledky popsané v této kapitole jsou přehledně prezentovány v tabulce 12 a na grafu 7, grafu 8 a grafu 9. Obsah aromatických látek ve vzorcích byl určen semikvantitativně z plochy identifikovaných píků a je prezentován jako procento z celkové plochy píků.

4.1.2.1 Vliv doby extrakce

Při optimalizaci doby extrakce bylo z rýmovníkových extraktů metodou HS-SPME-GC-MS identifikováno po 20 minutách 40 sloučenin, po 40 minutách 43 sloučenin a po 60 minutách 48 sloučenin. Dominantní zastoupení v připravených extraktech měly terpeny, estery, alkoholy

a aldehydy. Nejvyšší procentuální zastoupení terpenů 79,07 % bylo ve vzorku extrahovaném 40 minut, naopak nejnižší množství terpenů 68,75 % obsahoval vzorek po 60 minutách. Procentuální obsah esterů 12,50 % byl srovnatelný při době extrakce 20 a 60 minut. Nejvyšší procentuální obsah alkoholů (12,50 %) byl ve vzorku extrahovaném 60 minut.

4.1.2.2 Vliv typu rozpouštědla

Rozpouštědlo používané pro maceraci byla voda a ethanol o koncentraci 40% a 80%. Při použití vody, jakožto 0% rozpouštědla, bylo izolováno 42 sloučenin, s použitím 40% ethanolu 38 sloučenin a s 80% ethanolom 37 sloučenin. Nejvyšší zastoupení terpenů 83,78 % bylo při použití 80% ethanolu. Nejvyšší procento esterů (10,53 %) bylo zastoupeno ve vzorku extrahovaném 40% ethanolom.

4.1.2.3 Vliv navážky vzorku

Celkem 59 sloučenin bylo identifikováno při použití navážky 20 g rýmovníku na 100 ml 40% ethanolu. Při této navážce bylo vyhodnoceno nejvyšší procentuální zastoupení terpenů (76,27 %), ale zároveň nejnižší zastoupení esterů a aldehydů (shodně 3,39 %). Pouze 49 sloučenin bylo identifikováno při navážce 10 g rýmovníku na 100 ml stejně koncentrovaného ethanolu.

4.1.2.4 Vliv teploty extrakce

Při optimalizaci parametru teploty extrakce bylo při 40 °C identifikováno nejvíce sloučenin, a to 47. Nejmenší počet 41 sloučenin byl identifikován při 20 °C. Obsah terpenů byl při teplotách 20 a 40 °C velmi podobný, kolem 78 %. Zastoupení esterů bylo nejvyšší (8,51 %) ve vzorcích extrahovaných při teplotě 40 °C, ale zároveň při této teplotě bylo nejnižší procentuální zastoupení alkoholů a aldehydů.

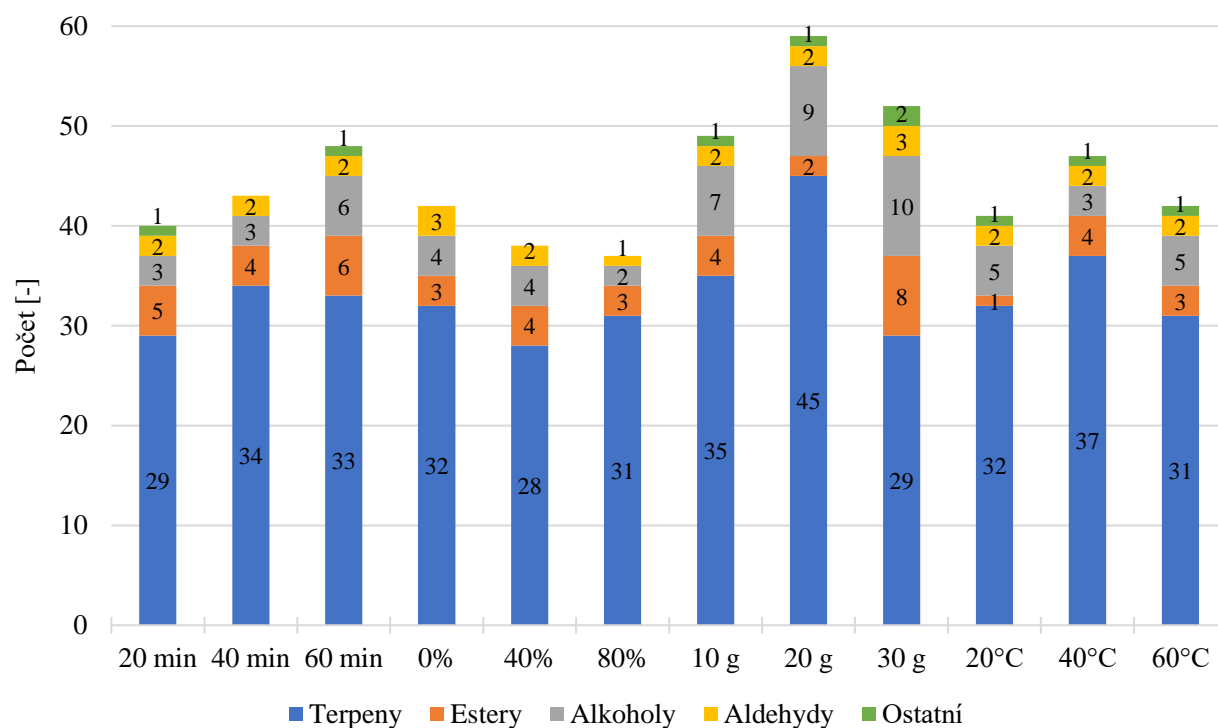
Ze skupiny monoterpenových uhlovodíků byly v připravených extraktech nejčastěji zastoupeny: 1R- α -pinen, γ -terpinen, o-cymen, p-cymen, thymol a limonen. Obsažené byly i kyslíkaté monoterpeny, nejčastěji kafr, karvakrol, karvakrol methyl ether a fenchon. Ze skupiny seskviterpenových uhlovodíků byl zastoupen například β -selinen, kadina-1(10),4-dien, α -bergamoten, karyofylen a humulen.

1-okten-3-ol, cis-3-hexen-1-ol, 3-oktanol, α -terpineol, α -akorenol a 1-dodekanol patří mezi alkoholy, které byly významně zastoupeny v extraktech. Ze skupiny esterů byl zastoupen například nonyl acetát, ethyl oktanoát a ethyl palmitát. Aldehydy jsou skupinou, která byla identifikována v extraktech nejméně často. Jedinými zástupci této skupiny jsou nonanal a α -hexyl-cinnamaldehyd. Pouze jedinkrát při použití nejvyšší navážky 30 g na 100 ml 40% ethanolu byl identifikován furfural.

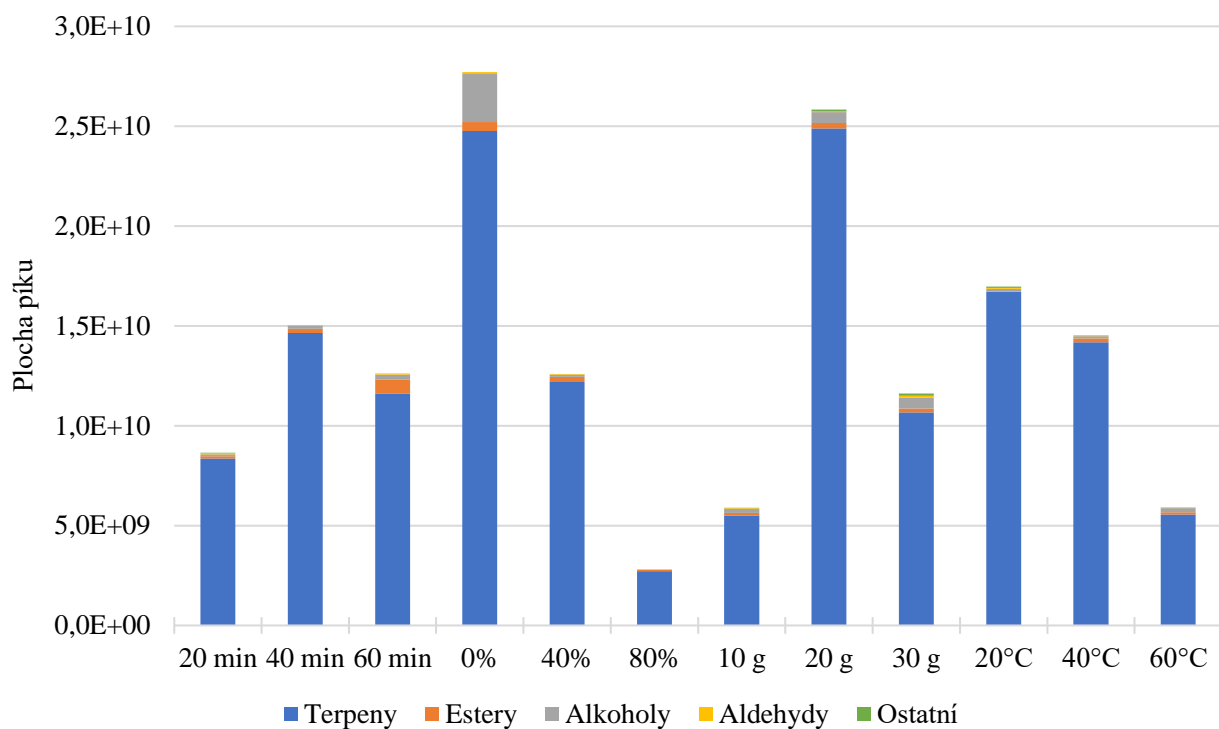
Do skupiny ostatních identifikovaných sloučenin patří například kadalen, polycyklický aromatických uhlovodík odvozený od seskviterpenů. Byly zde zařazeny i minoritně se vyskytující monosacharidy l-gala-l-ido-októza a 6-acetyl- β -D-manóza.

Tabulka 12: Přehled počtu aromatických látek identifikovaných v extraktech při optimalizaci podmínek

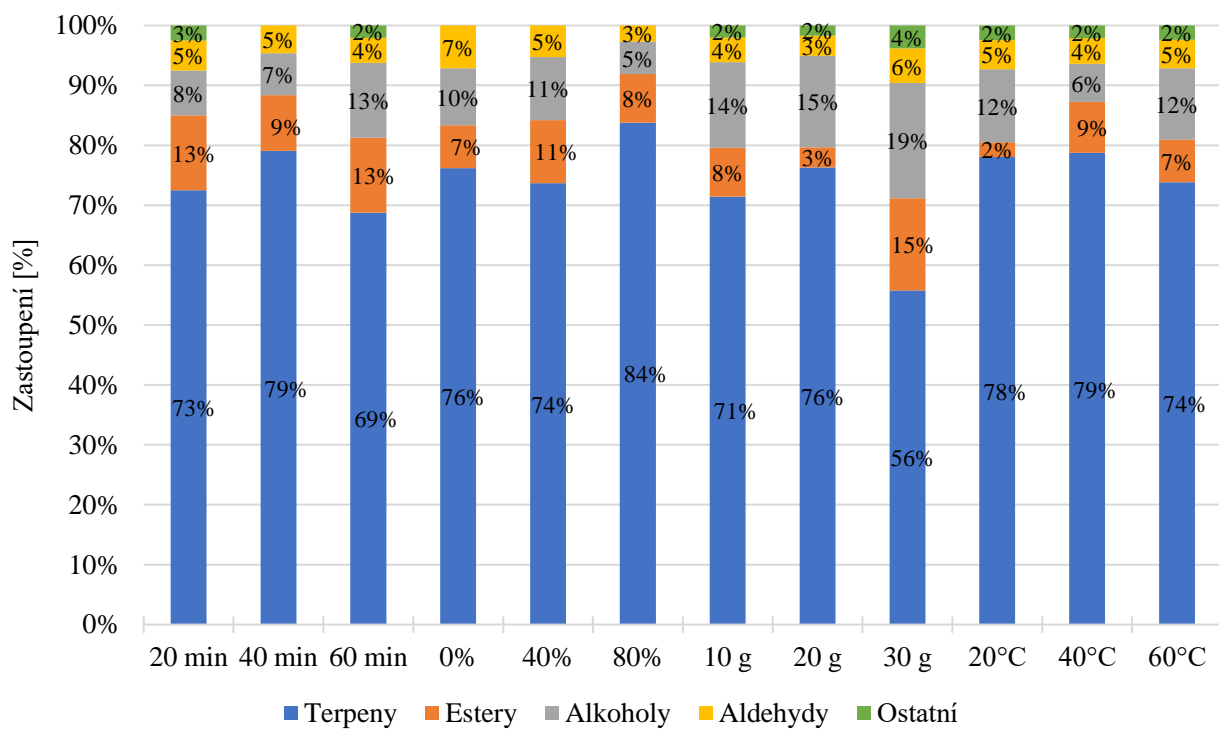
Skupina	čas [min]			Crozpouštědla [%]			m _{navážky} [g/100 ml]			teplota [°C]		
	20	40	60	0	40	80	10	20	30	20	40	60
Terpeny	29	34	33	32	28	31	35	45	29	32	37	31
Estery	5	4	6	3	4	3	4	2	8	1	4	3
Alkoholy	3	3	6	4	4	2	7	9	10	5	3	5
Aldehydy	2	2	2	3	2	1	2	2	3	2	2	2
Ostatní	1	0	1	0	0	0	1	1	2	1	1	1
Celkem	40	43	48	42	38	37	49	59	52	41	47	42



Graf 7: Počet sloučenin identifikovaných v extraktech při optimalizaci různých parametrů dle chemických skupin



Graf 8: Obsah sloučenin identifikovaných v extraktech při optimalizaci různých parametrů dle chemických skupin



Graf 9: Procentuální zastoupení jednotlivých chemických skupin v extraktech při optimalizaci různých parametrů

Na grafu 10 a grafu 11 je pro zajímavost znázorněno poměrné a procentuální zastoupení potenciálně alergenních látek dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009. Jsou to látky, které mohou u citlivých osob vyvolat podráždění či alergickou reakci. Reakce na vonné látky se obvykle projevuje kožní vyrážkou, nevolností, závratí, bolestí v krku, dušností či kašlem. Potenciální alergeny jsou součástí parfémů, pracích prášků, mýdel, vlasových přípravků, krémů, vonných tyčinek a svíček. Mohou se však nacházet i v potravinách, například v cukrovinkách, citrusech, nápojích nebo v aromatizovaných čajích.

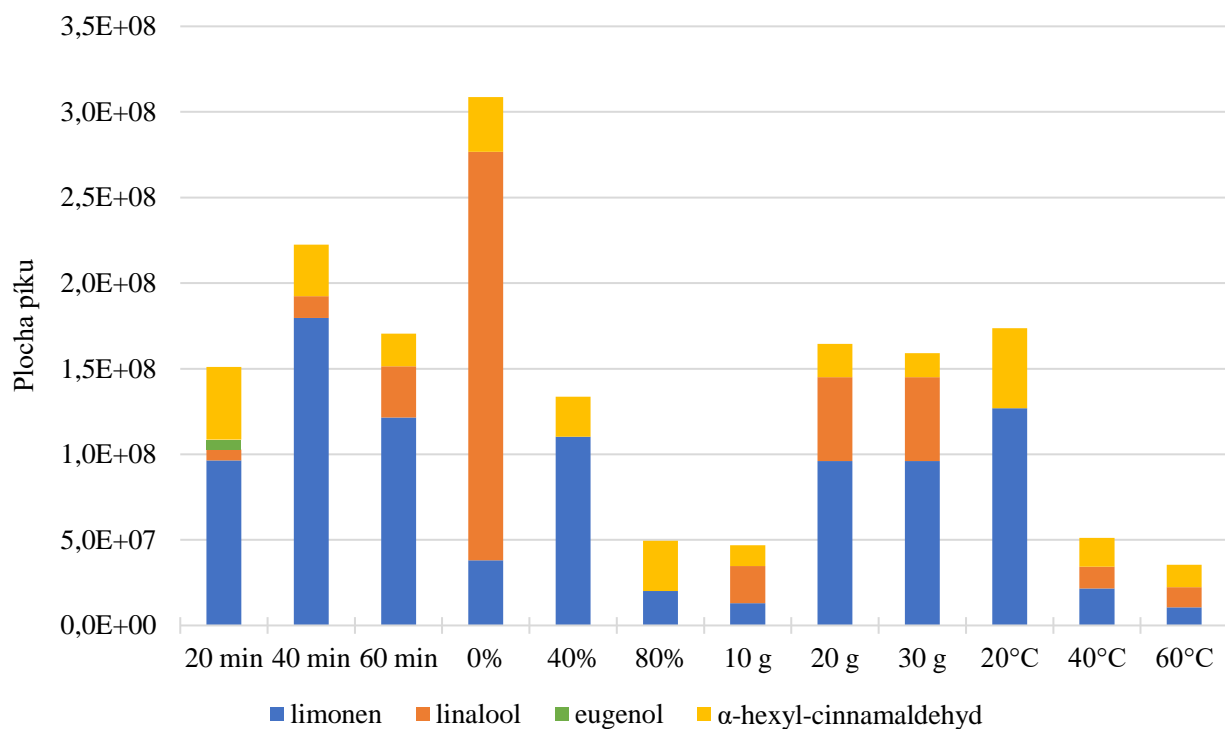
V připravených extraktech z *P. amboinicus* byly během optimalizace podmínek identifikovány 4 potenciální alergeny: limonen, linalool, α -hexyl-cinnamaldehyd a pouze jednou byl identifikován eugenol při době extrakce 20 minut.

Limonen je klasifikován jako cyklický terpen s výraznou pomerančovou vůní. Byl obsažen ve všech připravených vzorcích. Nejvíce limonenu (1,88 %) bylo identifikováno ve vzorku připraveném macerací 20 g rýmovníku ve 100 ml 40% ethanolu. Naopak nejnižší procentuální zastoupení limonenu (0,14 %) bylo ve vzorku, který byl připraven macerací rýmovníku ve vodě. Lze tedy soudit, že na extrakci tohoto potenciálního alergenu má vliv použité rozpouštědlo, jeho koncentrace a množství rostlinného materiálu.

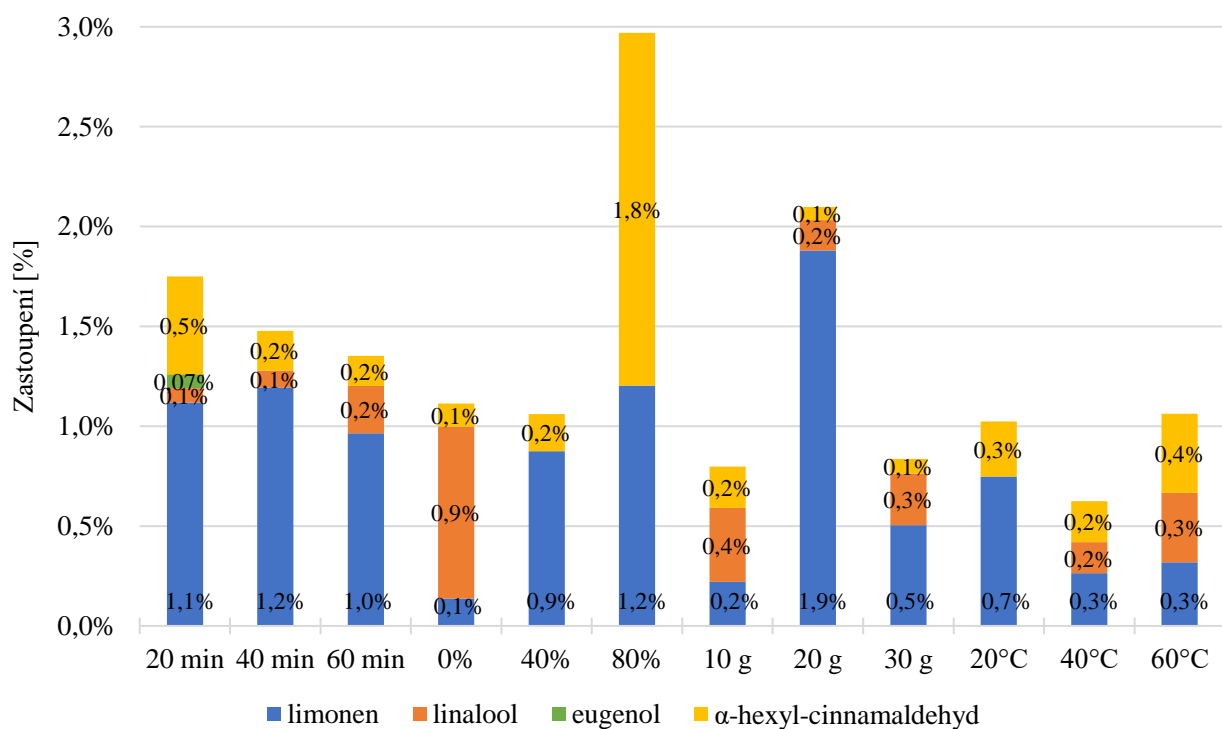
V každém vzorku byl obsažen i α -hexyl-cinnamaldehyd, nazývaný také hexylcinnamal. Je to aldehyd odvozený od kyseliny skořicové, často používaný při výrobě kosmetických přípravků a parfémů. Obsah hexylcinnamalu byl v rozmezí 0,07 % až 1,77 %. Nejvyšší obsah tohoto potenciálního alergenu byl ve vzorku připraveném extrakcí 80% ethanolom. Nejnižší množství bylo identifikováno při použité nejvyšší navážce rýmovníku 30 g na 100 ml 40% ethanolu. Důvodem tohoto výsledku mohlo být nedostatečné pronikání rozpouštědla mezi částice nasekané rostliny.

Linalool je terpenový alkohol s příjemnou květinovou vůní. Vyskytuje se v rostlinách z čeledi hluchavkovitých, ale také vavřínovitých a rourovitých. Linalool, jakožto potenciální alergen, byl obsažen ve většině vzorků. Nejvyšší obsah (0,86 %) byl identifikován ve vzorku s 0% rozpouštědlem – vodou.

Obsah potenciálních alergenů ve vzorcích byl určen semikvantitativně z plochy identifikovaných píků a je prezentován jako procento z celkové plochy píků.



Graf 10: Obsah potenciálně alergenních látek identifikovaných v extraktech



Graf 11: Procentuální zastoupení potenciálních alergenních látek v připravených extraktech

4.2 Příprava a charakterizace optimálního extraktu

Na základě výsledků optimalizačního procesu (kapitola 4.1) byl připraven „optimální“ extrakt, tj. extrakt který obsahoval pokud možno co nejvyšší obsah polyfenolických látek a zároveň počet a obsah aromatických sloučenin. Tento extrakt byl připraven ve třech paralelních opakováních za těchto podmínek:

- doba extrakce/macerace 40 minut,
- rozpouštědlo 40% ethanol,
- hmotnost navážky 20 g rýmovníku na 100 ml rozpouštědla,
- teplota 40 °C.

Na základě nejvyššího obsahu polyfenolických látek ($0,49 \text{ mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{g}^{-1}$ rostliny) v dílčích extraktech byla pro přípravu optimálního extraktu vybrána doba extrakce 40 minut. Počet identifikovaných aromatických sloučenin byl sice nejvyšší v čase 60 minut, avšak rozdíl mezi počtem látek v čase 40 a 60 minut nebyl významný. Zároveň byl při této době extrakce získán nejvyšší obsah aromatických sloučenin – viz graf 8. Proto byla zejména z důvodů časové úspory celého procesu vybrána kratší doba extrakce.

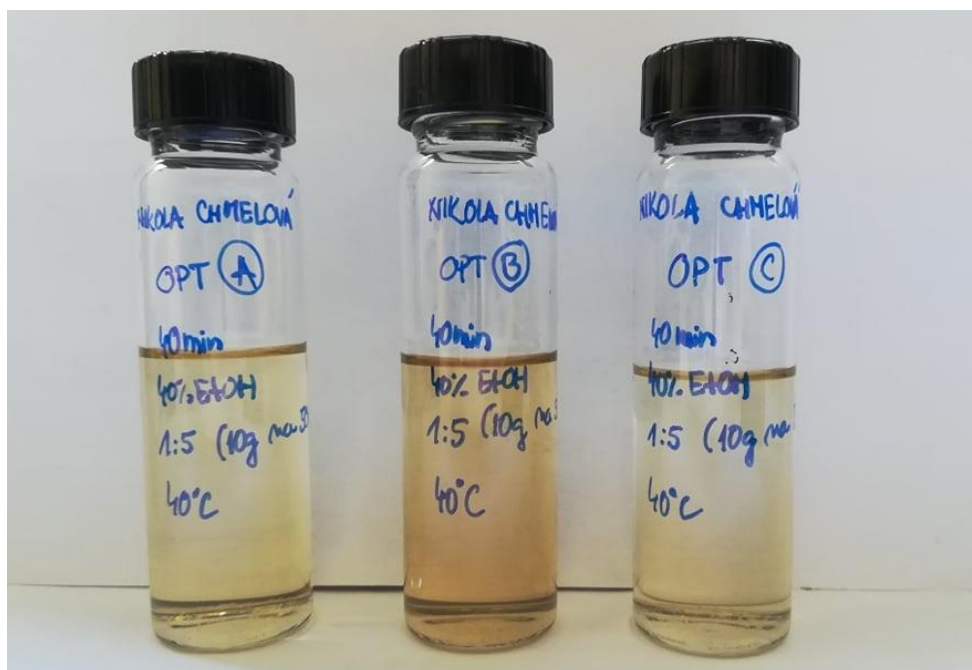
Extrakty připravené s použitím ethanolu o koncentraci 80% vykazovaly vysoký obsah celkových polyfenolů ($0,52 \text{ mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{g}^{-1}$ rostliny). Důvodem je, že typ a koncentrace použitého rozpouštědla zvyšuje extrahovatelnost polyfenolických látek. Proto také extrakty připravené macerací pouze ve vodě, vykazovaly nízký obsah polyfenolů ($0,05 \text{ mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{g}^{-1}$ rostliny). Při použití 0% rozpouštědla (tj. destilovaná voda) byl získán nejvyšší obsah aromatických sloučenin, naopak při použití 80% ethanolu nejnižší. Pro přípravu finálních extraktů byl zvolen kompromis v podobě 40% ethanolu. Důvodem pro zvolení této střední koncentrace byla především finanční úspora v ceně rozpouštědla. V důsledku pandemie onemocnění COVID-19 totiž cena ethanolu v období od března 2020 do května 2021 vzrostla trojnásobně. Dle počtu a plochy píků identifikovaných aromatických sloučenin byla zvolená 40% koncentrace rozpouštědla prostřední možností.

Zvolené množství navážky rýmovníku 20 g na 100 ml rozpouštědla (tedy poměr 1 : 5) nevycházelo opět nejvyšší v obsahu celkových polyfenolických látek. Tento parametr byl zvolen podle počtu (59) a obsahu identifikovaných aromatických látek v extraktu, které byly výrazně vyšší oproti jiným použitým navážkám (viz graf 7, graf 8).

Teplota 40 °C byla zvolena proto, že ve vzorku připraveném při této teplotě byl identifikován vyšší počet aromatických látek (47), než ve vzorcích připravených při teplotách 20 a 60 °C. Obsah polyfenolických látek a obsah aromatických látek v extraktech připravených při teplotě 40 °C sice nebyly nejvyšší dosažené, šlo opět o vhodně zvolený kompromis; jak již bylo řečeno, aplikace příliš vysoké teploty může způsobit ztrátu nebo degradaci některých sloučenin.

Připravený optimální extrakt (tři paralelní provedení – označeny OPT A, OPT B a OPT C – viz obrázek 15) byl, stejně jako dílčí extrakty, charakterizován z hlediska obsahu celkových polyfenolických látek, obsahu aromatických látek. Navíc byla stanovena jeho antioxidační a antimikrobiální aktivita.

U vzorku OPT B je pozorovatelné intenzivnější zbarvení ve srovnání s dalšími dvěma vzorky OPT A a OPT C. Rozdílná barva mohla být způsobena tím, že rostlinný materiál pro své použití nepatrně déle čekal (cca 10 minut) a došlo k výraznějším projevům reakce enzymového hnědnutí, která nastala při poškození listů a stonků rostliny krájením. Což dokazuje, že připravené extrakty jsou poměrně nestabilní a je třeba je zpracovávat rychle.



Obrázek 15: Extrakty rýmovníku připravené při podmínkách: 40 minut, 40% ethanol, poměr rostliny ku rozpouštědлу 1 : 5 a teplota 40 °C (tři paralelní stanovení)

4.2.1 Obsah polyfenolických sloučenin v optimálním extraktu

V extraktech připravených za optimálních podmínek byl stanoven obsah celkových polyfenolických látek spektrofotometricky Folin-Ciocalteu metodou. Každý extrakt byl analyzován třikrát. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce 13. Jak je vidět, mezi vzorky jsou patrné rozdíly. Odchylky v naměřených výsledcích mohly být způsobeny tím, že i přesto, že došlo k promíchání rostlinného materiálu před jeho použitím, mohl být v některém vzorku obsažen vyšší poměr stonků či listů než ve vzorku jiném. Průměrný obsah polyfenolických látek v optimalizovaném vzorku byl určen na $0,08 \pm 0,02 \text{ mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{ml}^{-1}$, což je v přepočtu $0,40 \pm 0,07 \text{ mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{g}^{-1}$ rostliny (viz tabulka 15).

Tabulka 13: Průměrný obsah polyfenolů ve vzorcích připravených za optimálních podmínek.

	$\text{C}_{\text{polyfenoly}} [\text{mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{g}^{-1}] + \text{SD}$	Min [$\text{mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{g}^{-1}$]	Max [$\text{mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{g}^{-1}$]
OPT A	$0,31 \pm 0,02$	0,31	0,49
OPT B	$0,40 \pm 0,04$		
OPT C	$0,49 \pm 0,05$		

4.2.2 Těkavé (aromaticky aktivní) látky v optimálním extraktu

Přehled těkavých látek identifikovaných v optimálním extraktu i samotný chromatogram těkavých látek z měření jsou umístěny v přílohách (Příloha A-B). V tabulce 17 je pro každou identifikovanou sloučeninu uveden retenční čas, její název a chemická skupina.

V optimalizovaných extraktech bylo identifikováno 62 a 64 aromatických sloučenin (viz tabulka 14). Z hlediska počtu sloučenin se jedná o nejvyšší čísla ze všech připravených

vzorků, lze tedy usuzovat, že podmínky pro přípravu optimálních rýmovníkových extraktů byly vhodně zvoleny.

Počet, plocha a procentuální zastoupení identifikovaných sloučenin rozdělených dle chemických skupin je zobrazeno na grafu 12, 13 a 14. Dominantní zastoupení v extraktech měly monoterpeny a seskviterpeny. Ve všech třech připravených vzorcích byl počet monoterpenových uhlovodíků a aldehydů shodný. Nejvyšší počet seskviterpenů (27) byl ve vzorku OPT C. Počet esterů a alkoholů byl téměř shodný ve všech vzorcích.

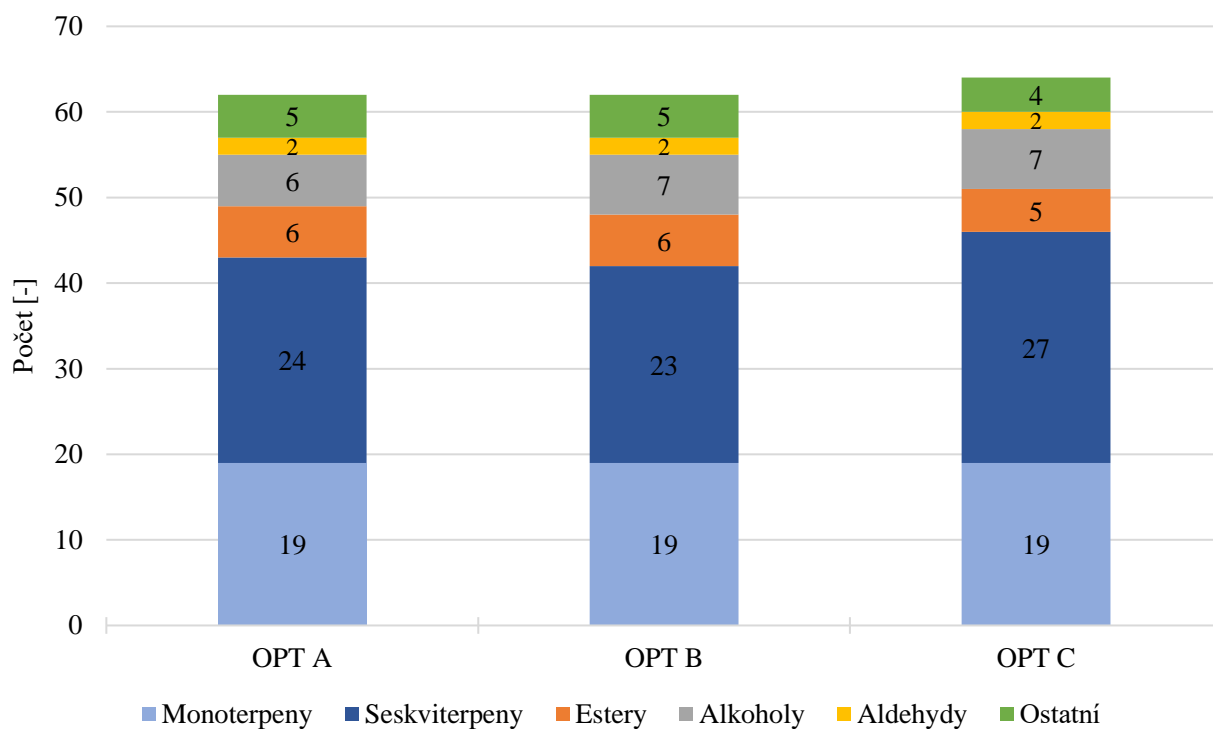
Monoterpeny nejvíce zastoupené ve vzorcích byly 1R- α -pinen, γ -terpinen, p-cymen, 3-karen. Mezi významně zastoupené kyslíkaté monoterpeny patřil kafr, karvakrol a karvakrol methyl ether. Seskviterpeny tvořily nejpočetnější skupinu a mezi jejich zástupce v extraktech patřil α -bergamoten, karyofylen, β -selinen, γ -gurjunen, α -kopaen, humulen a kadina-1(10),4-dien. Všechny ze zmíněných nejčastěji zastoupených monoterpenů a seskviterpenů byly identifikovány metodou GC-MS také ve studii Arumugam a kol. [10], kteří se zabývali botanickou, fytochemickou, farmakologickou a nutriční významností rostliny *P. amboinicus*. V této studii bylo identifikováno celkem 76 těkavých a 30 netěkavých sloučenin.

1-okten-3-ol, cis-3-hexen-1-ol, 3-oktanol, 1-dodekanol, 1-heptatriakontanol a α -akorenol jsou příkladem alkoholů identifikovaných v extraktech. Přítomnost 1-okten-3-olu a cis-3-hexen-1-olu byla potvrzena studiemi Arumugam a kol. [10] a Tewari a kol. [123].

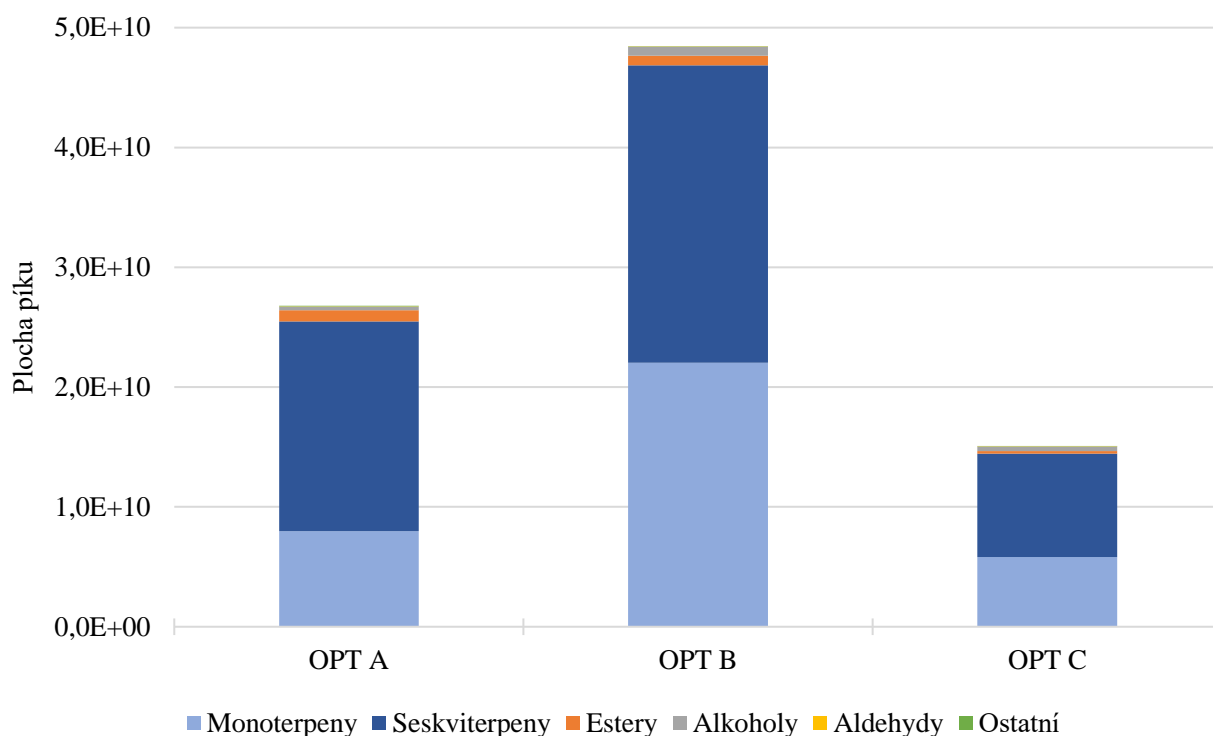
Ze skupiny esterů byl nejvíce zastoupen například nonyl acetát, ethyl oktanoát, ethyl palmitát a ethyl dekanoát. Aldehydy jsou skupinou, která byla identifikována v extraktech nejméně. Jedinými zástupci této skupiny v extraktech jsou nonanal a α -hexyl-cinnamaldehyd. Do skupiny ostatních identifikovaných sloučenin byly zařazeny například sacharidy l-gala-l-ido-októza a 6-acetyl- β -D-manóza, epoxidy trans-Z- α -bisabolen a oxid karyofylenu a jeden cykloalkan 4,5,9,10-dehydro-isolongifolen. Přítomnost oxid karyofylenu byla taktéž potvrzena ve studii Tewari a kol. [123].

Tabulka 14: Přehled počtu aromatických látek identifikovaných v optimálních extraktech

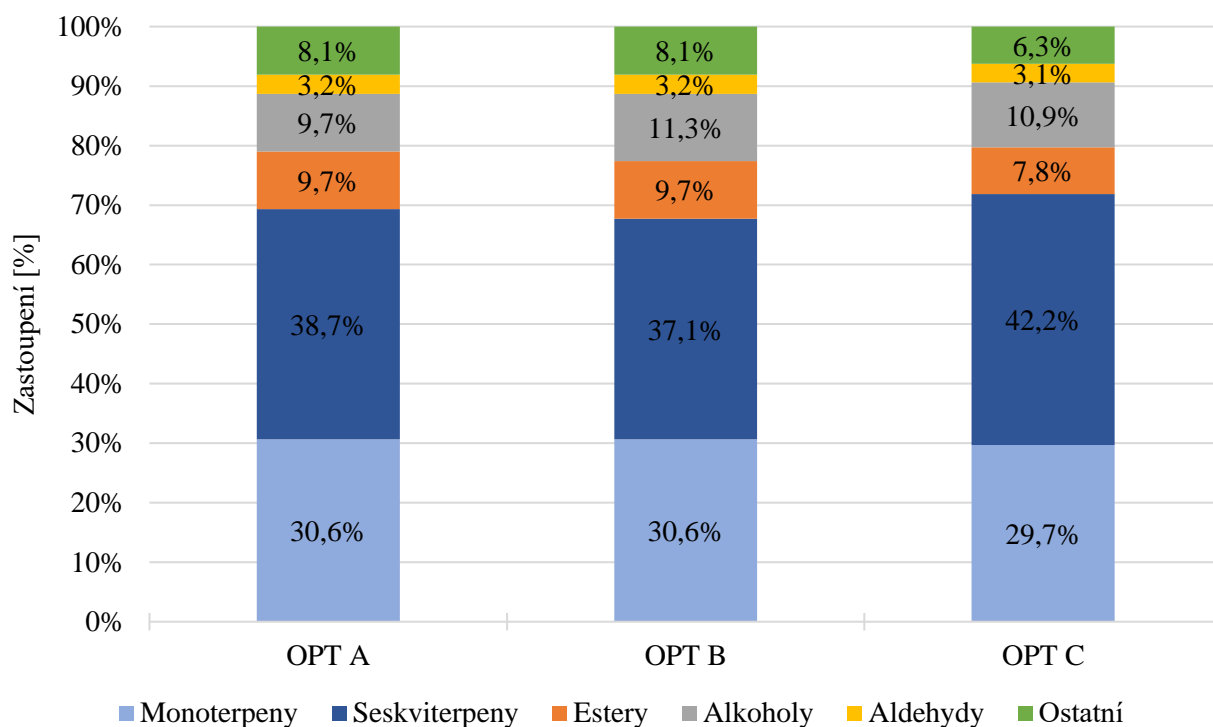
Skupina	OPT A	OPT B	OPT C
Monoterpeny	19	19	19
Seskviterpeny	24	23	27
Estery	6	6	5
Alkoholy	6	7	7
Aldehydy	2	2	2
Ostatní	5	5	4
Celkem	62	62	64



Graf 12: Počet sloučenin identifikovaných v optimálních extraktech (rozdělení dle chemických skupin)



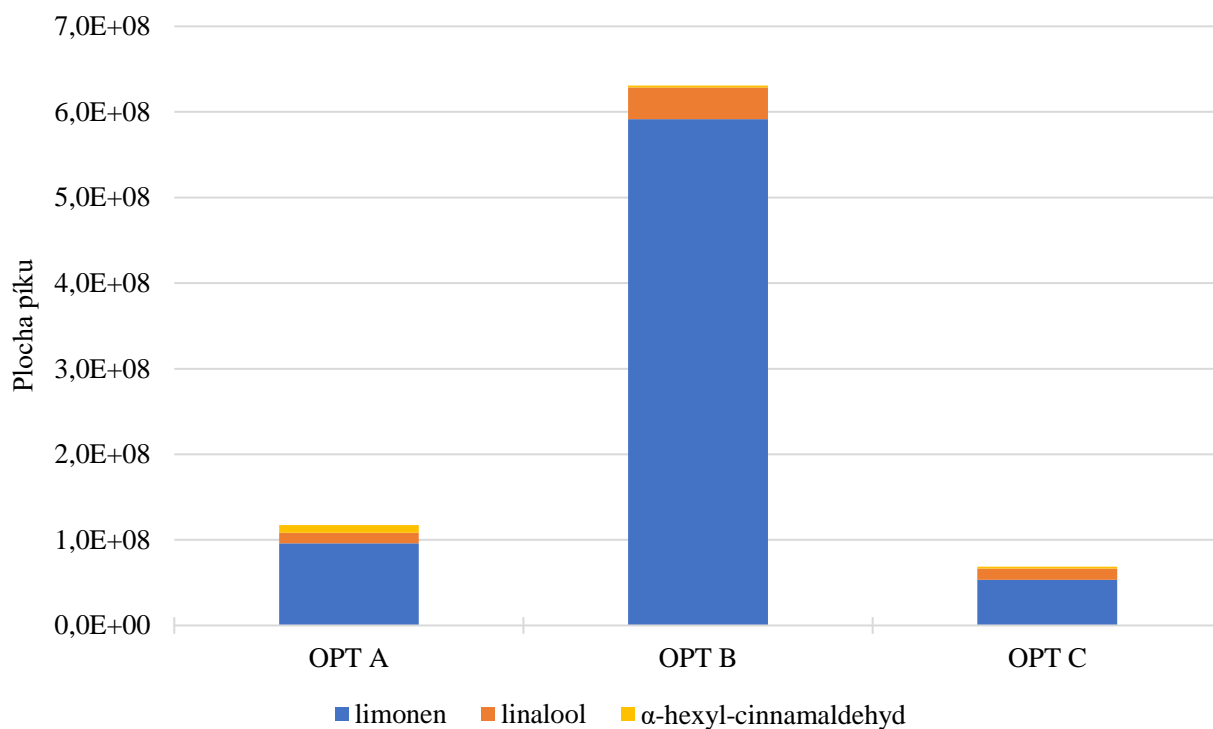
Graf 13: Obsah sloučenin identifikovaných v optimálních extraktech (rozdělení dle chemických skupin)



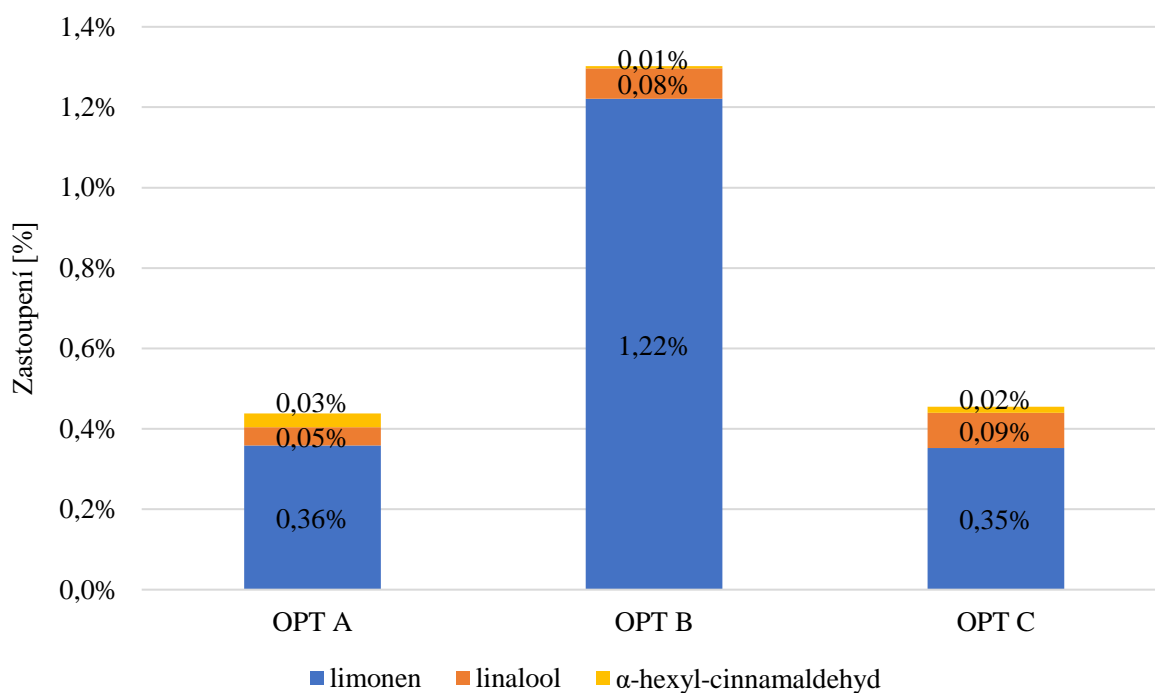
Graf 14: Procentuální zastoupení jednotlivých chemických skupin v optimálních extraktech

Na grafu 15 a grafu 16 je pro zajímavost znázorněno poměrné a procentuální zastoupení potenciálně alergenních látek (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009). V získaných optimálních extraktech z rýmovníku byly identifikovány 3 potenciální alergeny: limonen, linalool, α -hexyl-cinnamaldehyd. Jsou to stejné sloučeniny, které byly nalezeny i v dílčích vzorcích v procesu optimalizace.

Z těchto tří identifikovaných alergenů měl nejvyšší zastoupení limonen (1,22 %) ve vzorku OPT B, zbylé dva vzorky OPT A a OPT C obsahovaly téměř shodně 0,36 % a 0,35 % limonenu. Obsah linaloolu ve vzorcích byl v rozmezí 0,05 % (OPT A) až 0,09 % (OPT C). Nejmenší procentuální zastoupení ve vzorcích měl potenciální alergen α -hexyl-cinnamaldehyd. Jeho obsah byl maximálně 0,03 % (vzorek OPT A). Obsah potenciálních alergenů ve vzorcích byl určen semikvantitativně z plochy identifikovaných píků a je prezentován jako procento z celkové plochy píků.



Graf 15: Obsah potenciálně alergenních látek identifikovaných v optimálních extraktech



Graf 16: Procentuální zastoupení potenciálních alergenních látek v optimálních extraktech

4.2.3 Antioxidační aktivita optimálního extraktu

V získaných optimálních extraktech byla stanovena antioxidační aktivita metodou TEAC. Výsledky jsou vyjádřeny standardně jako ekvivalentní množství Troloxu.

Průměrná hodnota antioxidační aktivity u získaných optimálních extraktů byla určena na $241,24 \pm 29,24 \mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}$. Procento zhášení kation-radikálu ABTS^{•+} bylo vypočítáno podle rovnice (2) na $49,29 \pm 5,97 \%$.

Tabulka 15: Charakteristika optimálního extraktu

Celkový obsah polyfenolických látek	$0,08 \pm 0,02 \text{ mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{ml}^{-1}$
	$0,40 \pm 0,07 \text{ mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{g}^{-1}$ rostliny
Antioxidační aktivita	$241,24 \pm 29,24 \mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}$
% zhášení radikálu ABTS ^{•+}	$49,29 \pm 5,97 \%$

Swamy a kol. [97] se zabývali stanovením celkových polyfenolických látek a antioxidační aktivity *P. amboinicus*. Pro stanovení použili 25 g sušených listů do 100 ml tří různých rozpouštědel: methanolu, acetonu a hexanu. Směs následně zfiltrovali a odpařili na vakuové odparce. Obsah celkových polyfenolů stanovených metodou Folin-Ciocalteu byl v methanolovém extraktu určen $94,37 \pm 1,24 \text{ mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{g}^{-1}$ extraktu. Procento zhášení radikálu DPPH bylo stanoveno na $90,13 \pm 3,32 \%$.

Kromě toho, že se Bhatt a Negi [98] zabývali antimikrobiální aktivitou různých druhů extraktů z listů *P. amboinicus*, jak již bylo popsáno v kapitole 2.7.3, řešili také jejich antioxidační aktivitu. Kapacita zachytávání radikálu DPPH u 0,1% hydroalkoholového extraktu byla $27,62 \pm 1,67 \%$.

Hodnoty obsažené v tabulce 15 jsou obtížně srovnatelné s výsledky z výše zmíněných studií. Důvodem je, že antioxidační aktivita byla měřena v neodpařeném extraktu a pro stanovení byla použita metoda TEAC. Na výslednou antioxidační aktivitu rostliny má vliv i použité extrakční rozpouštědlo, metoda extrakce, podmínky a oblast pěstování rostliny. Posledním ze zmíněných faktorů se zabývali Ślusarczyk a kol. [124]. Ve své studii popsali, že rostliny *P. amboinicus* pěstované v Polsku mají výrazně vyšší obsah polyfenolických sloučenin než rostliny pěstované v Indonésii. Je známo, že obsah polyfenolických sloučenin pozitivně koreluje s antioxidační aktivitou.

4.2.4 Antimikrobiální aktivita optimálního extraktu

Antimikrobiální aktivita optimalizovaných extraktů z *P. amboinicus* byla ověřena difúzní jamkovou metodou za podmínek uvedených v kapitole 3.4.4.

V tabulce 16 a na obrázku 16, 17 a 18 jsou uvedeny výsledky antimikrobiální aktivity proti testovaným mikroorganismům – *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* a kvasinka *Candida glabrata*. Jak je vidět, extrakty vykazovaly nepatrnou antimikrobiální aktivitu pouze proti *Bacillus cereus*.

Inhibiční zóny na obrázku 16 byly obtížně pozorovatelné kvůli podobnému zbarvení kolonií mikroorganismu a kultivačního média. Průměrná velikost inhibiční zóny *B. cereus* na připravené extrakty byla určena na $0,59 \pm 0,08 \text{ cm}$.

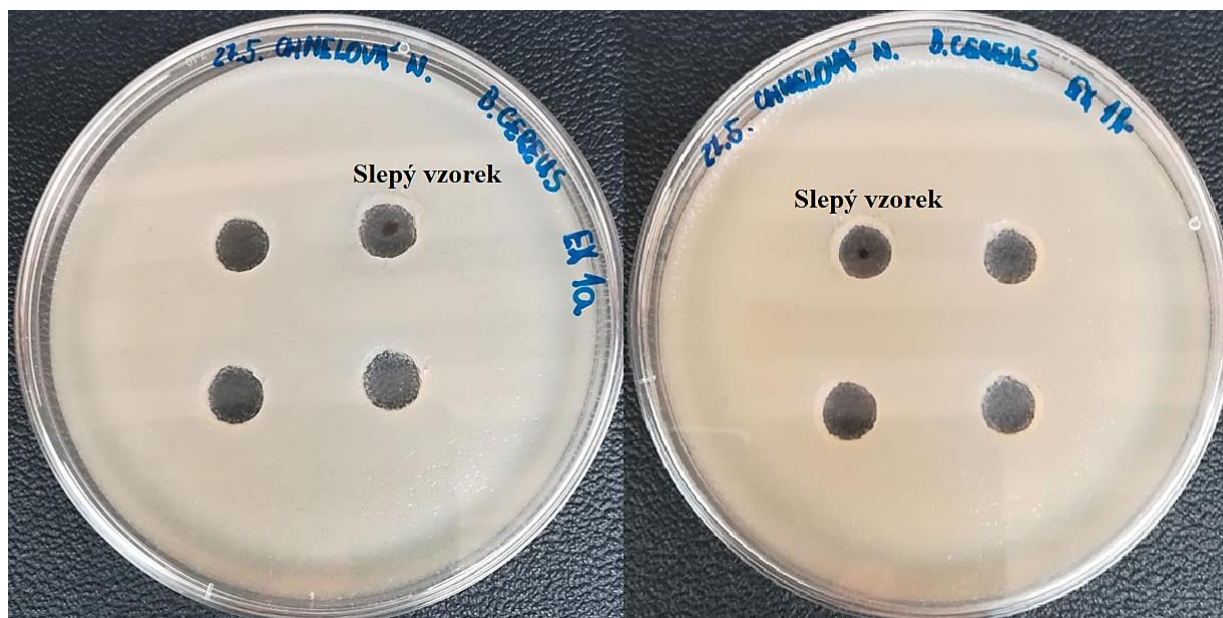
Extrakty nevykazovaly antimikrobiální aktivitu proti kvasince *Candida glabrata*. Kvasinka na Petriho miskách s médiem vždy vyrostla, ale nedošlo k vytvoření inhibičních zón. Khan a spol. [125] ve své studii prokázali účinnost ethanolových extraktů proti *C. glabrata*. Extrakty v jejich studii byly připraveny metodou Soxhletovy extrakce s koncentrovanějším

rozpouštědlem. Průměrná velikost inhibičních zón byla v rozmezí 6 až 30 mm. Použití koncentrovanějšího rozpouštědla a extrakční metoda může pozitivně ovlivnit přestup bioaktivních látek do výluhu, čímž se projeví antimikrobiální aktivita.

V případě *Escherichia coli* také nedošlo k vytvoření inhibičních zón. Bakterie na miskách narostla, dokonce přímo v jamkách vytvořených korkovrtem. V kapitole 2.7.3 je zmíněno mnoho studií s různými typy extraktů. Jednou ze zmíněných studií je Bhatt a Negi [98], kteří prokázali vyšší rezistenci gramnegativních bakterií u hexanových, ethylacetátových, acetonových, methanolových extraktů z listů *P. amboinicus*. Je tedy pravděpodobné, že 40% ethanolový extrakt z rýmovníku, který byl připraven v této diplomové práci, není účinný proti *E. coli*.

Tabulka 16: Velikost naměřených inhibičních zón po odečtu účinku rozpouštědla

MO	Inhibiční zóna [cm]					
	OPT A		OPT B		OPT C	
	1a	1b	2a	2b	3a	3b
<i>B. cereus</i>	0,53 ± 0,05	0,93 ± 0,12	0,53 ± 0,12	0,43 ± 0,05	0,60 ± 0,08	0,50 ± 0,08
<i>C. glabrata</i>	–	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i>	–	–	–	–	–	–



Obrázek 16: Inhibiční zóny optimálního extraktu (OPT A) na mikroorganismus *Bacillus cereus* ve dvou paralelních provedeních (1a, 1b)



Obrázek 17: Inhibiční zóny optimálního extraktu (OPT A) na mikroorganismus *Candida glabrata* ve dvou paralelních provedeních (1a, 1b)



Obrázek 18: Inhibiční zóny optimálního extraktu (OPT A) na mikroorganismus *Escherichia coli* ve dvou paralelních provedeních (1a, 1b)

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce bylo optimalizovat podmínky pro přípravu extraktů z rostliny rýmovníku (*Plectranthus amboinicus*) se zaměřením na maximální zisk bioaktivních sloučenin a zachováním sensoricky i nutričně cenných složek.

Na základě studia literatury a provedených předběžných experimentů byla jako extrakční metoda zvolena jednoduchá macerace. Pro experiment byly použity čerstvé listy i stonky rýmovníku pěstovaného v laboratorních podmínkách.

Na základě vyhodnocení obsahu polyfenolických látek a aromatických sloučenin u připravených extraktů byly jako optimální podmínky macerace zvoleny: doba extrakce 40 minut, rozpouštědlo 40% ethanol, navážka 20 g rýmovníku na 100 ml rozpouštědla a teplota 40 °C.

U extraktů z rýmovníku připravených za optimálních podmínek byl stanoven obsah celkových polyfenolů Folin-Ciocalteu metodou na $0,08 \pm 0,02 \text{ mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{ml}^{-1}$, což odpovídá $0,40 \pm 0,07 \text{ mg}_{\text{GEA}} \cdot \text{g}^{-1}$ rostliny. Antioxidační aktivita extraktů byla stanovena metodou TEAC a odpovídala hodnotě $241,24 \pm 29,24 \text{ } \mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}$. Zhášení radikálu ABTS^{•+} bylo určeno na $49,29 \pm 5,97 \%$.

Při stanovení obsahu aromatických látek metodou HS-SPME-GC-MS bylo v optimalizovaných extraktech identifikováno 62 a 64 aromatických sloučenin. Dominantně byly zastoupeny monoterpeny a seskviterpeny, dále také estery, alkoholy a aldehydy.

Antimikrobiální aktivita extraktů byla ověřena difúzní jamkovou metodou, pro stanovení byly vybrány dva druhy bakterií – grampozitivní *Bacillus cereus*, gramnegativní *Escherichia coli*, a kvasinka *Candida glabrata*. Extrakty vykazovaly antimikrobiální aktivitu pouze proti *B. cereus*. Důvodem mohlo být málo koncentrované rozpouštědlo (40% ethanol), nebo málo koncentrované samotné extrakty, příp. zvolená extrakční metoda. U gramnegativní *E. coli* je možným důvodem její vyšší rezistence ve srovnání s grampozitivními bakteriemi, což souvisí s odlišnou skladbou buněčné stěny.

Výsledky, které jsou popsány v této diplomové práci, potvrzují, že rýmovník, resp. jeho připravený extrakt, vykazuje určitou antioxidační a antimikrobiální aktivitu a obsahuje spektrum atraktivních aromatických látek typu terpenů a terpenoidů, a má tedy dobrý potenciál pro využití do kosmetických přípravků nebo jako nová a netradiční příchuť do různých potravin a pochutin. Toto bylo potvrzeno aplikací získaného extraktu do čerstvého sýra v rámci navazující diplomové práce Bc. Štefana Kučerky [126].

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] World Checklist of Selected Plant Families (WCSP), <https://wcsp.science.kew.org> [online]. [cit. 2020-03-27]. Dostupné z: <https://wcsp.science.kew.org/qsearch.do>
- [2] YUAN, Yao-Wu, David J. MABBERLEY, Dorothy A. STEANE a Richard G. OLMSTEAD, 2010. Further disintegration and redefinition of *Clerodendrum* (Lamiaceae): Implications for the understanding of the evolution of an intriguing breeding strategy. *TAXON*. **59**(1), 125-133. DOI: 10.1002/tax.591013. ISSN 00400262. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/tax.591013>
- [3] LI, Pan, Zhe-Chen QI, Lu-Xian LIU, et al., 2017. Molecular phylogenetics and biogeography of the mint tribe Elsholtzieae (Nepetoideae, Lamiaceae), with an emphasis on its diversification in East Asia. *Scientific Reports*. **7**(1). DOI: 10.1038/s41598-017-02157-6. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-02157-6>.
- [4] VALÍČEK, Pavel, 2002. *Užitkové rostliny tropů a subtropů*. Vyd. 2., upr. a dopl. Praha: Academia. ISBN 80-200-0939-6.
- [5] LUKHOBÁ, Catherine W., Monique S.J. SIMMONDS a Alan J. PATON, 2006. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology*. **103**(1), 1-24. DOI: 10.1016/j.jep.2005.09.011. ISSN 03788741. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874105006215>
- [6] ASHAARI, Nur Suhanawati, Mohd Hairul AB. RAHIM, Suriana SABRI, et al., 2020. Functional characterization of a new terpene synthase from *Plectranthus amboinicus*. *PLOS ONE*. **15**(7). ISSN 1932-6203. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0235416](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235416)
- [7] *Plectranthus* L'Hér., [Http://powo.science.kew.org](http://powo.science.kew.org) [online]. [cit. 2020-03-27]. Dostupné z: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:328178-2>
- [8] KUBÍNOVÁ, Renata a Miroslava STRUŽKOVÁ, 2014. Fytoterapeutický potenciál vybraných druhů rodu *Plectranthus*. *Praktické lékařství* [online]. 10(3), 112-114 [cit. 2020-03-27]. ISSN 1803-5329. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2014/03/09.pdf>
- [9] *Plectranthus amboinicus*, <https://en.wikipedia.org> [online]. [cit. 2020-03-27]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Plectranthus_amboinicus
- [10] ARUMUGAM, Greetha, Mallappa SWAMY a Uma SINNIHA, 2016. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance. *Molecules*. **21**(4). DOI: 10.3390/molecules21040369. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/4/369>
- [11] BURDĚJOVÁ, L. Komplexní charakterizace léčivých rostlin a jejich potenciál při využití v potravinářském průmyslu jako zdroje funkčních komponent. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 196 s.

- [12] WAISSER, Karel, 2004. *Úvod do biologické aktivity organických sloučenin*. Hradec Králové: Gaudeamus. ISBN 80-704-1558-4.
- [13] VELÍŠEK J., CEJPEK K., 2008: Biosynthesis of Food Components. OSSIS, Tábor, 512 s. ISBN 978-80- 86659-12-1
- [14] ZHAO, Yueliang, YiZhen WU a Mingfu WANG, 2015. Bioactive Substances of Plant Origin. *Handbook of Food Chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, 967-1008. ISBN 978-3-642-36604-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-36605-5_13
- [15] MICKYMARAY, 2019. Efficacy and Mechanism of Traditional Medicinal Plants and Bioactive Compounds against Clinically Important Pathogens. *Antibiotics*. **8**(4). DOI: 10.3390/antibiotics8040257. ISSN 2079-6382. Dostupné také z: <https://www.mdpi.com/2079-6382/8/4/257>
- [16] GUPTA, Charu a Dhan PRAKASH, 2014. Phytonutrients as therapeutic agents. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. **11**(3). DOI: 10.1515/jcim-2013-0021. ISSN 2194-6329. Dostupné také z: <https://www.degruyter.com/view/j/jcim.2014.11.issue-3/jcim-2013-0021/jcim-2013-0021.xml>
- [17] KROON, Paul A, Michael N CLIFFORD, Alan CROZIER, Andrea J DAY, Jennifer L DONOVAN, Claudine MANACH a Gary WILLIAMSON, 2004. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *The American Journal of Clinical Nutrition*. **80**(1), 15-21. ISSN 0002-9165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/80.1.15
- [18] GULCIN, İlhami, 2020. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*. **94**(3), 651-715. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-020-02689-3
- [19] KING, AMY a GLORIA YOUNG, 1999. Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*. **99**(2), 213-218. ISSN 00028223. Dostupné z: doi:10.1016/S0002-8223(99)00051-6
- [20] PANCHE, A. N., A. D. DIWAN a S. R. CHANDRA, 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. **5**. DOI: 10.1017/jns.2016.41. ISSN 2048-6790. Dostupné také z: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S2048679016000410/type/journal_article
- [21] BONETTI, Francesco, Gloria BROMBO a Giovanni ZULIANI, 2017. Nootropics, Functional Foods, and Dietary Patterns for Prevention of Cognitive Decline. *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging*. Elsevier, 2017, 211-232. DOI: 10.1016/B978-0-12-805376-8.00019-8. ISBN 9780128053768. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128053768000198>
- [22] AKINWUMI, Bolanle, Kimberly-Ann BORDUN a Hope ANDERSON, 2018. Biological Activities of Stilbenoids. *International Journal of Molecular Sciences*. **19**(3).

DOI: 10.3390/ijms19030792. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/3/792>

- [23] LANGCAKE, P. a R.J. PRYCE, 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*. **9**(1), 77-86. DOI: 10.1016/0048-4059(76)90077-1. ISSN 00484059. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0048405976900771>
- [24] SEYED, Mohamed Ali, Ibrahim JANTAN, Syed Nasir Abbas BUKHARI a Kavitha VIJAYARAGHAVAN, 2016. A Comprehensive Review on the Chemotherapeutic Potential of Piceatannol for Cancer Treatment, with Mechanistic Insights. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **64**(4), 725-737. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05993. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.5b05993>
- [25] Resveratrol. In: *Merck* [online]. [cit. 2021-01-22]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/resveratrol2282450136011?lang=en&ion=CZ>
- [26] NOLLET, Leo M.L. a Janet Alejandra GUTIERREZ-URIBE, 2018. *Phenolic Compounds in Food: Characterization and Analysis*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 978-1498722964.
- [27] GUIMARÃES, Adriana G, Mairim R SERAFINI a Lucindo J QUINTANS-JÚNIOR, 2014. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. **24**(3), 243-265. ISSN 1354-3776. Dostupné z: doi:10.1517/13543776.2014.870154
- [28] KIM, Taejoon, Bokyeong SONG, Kyoung Sang CHO a Im-Soon LEE, 2020. Therapeutic Potential of Volatile Terpenes and Terpenoids from Forests for Inflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. **21**(6). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21062187
- [29] Isoprene. In: *Merck* [online]. [cit. 2021-01-22]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/isoprene68127879511?lang=en&ion=CZ>
- [30] FEŘTEKOVÁ, Vlasta, 2005. *Kosmetika v teorii a v praxi*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf. ISBN 80-734-5046-1.
- [31] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS. ISBN 978-808-6659-176.
- [32] CUONG, Nguyen Xuan, Le Thi VIEN, Tran Thi Hong HANH, et al., 2015. Cytotoxic triterpene saponins from *Cercodemas anceps*. **25**(16), 3151-3156. ISSN 0960894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2015.06.005
- [33] MOSES, Tessa, Kalliope K. PAPADOPOULOU a Anne OSBOURN, 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **49**(6), 439-462. ISSN 1040-9238. Dostupné z: doi:10.3109/10409238.2014.953628

- [34] LOURENÇO, Sofia C., Margarida MOLDÃO-MARTINS a Vítor D. ALVES, 2019. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. *Molecules*. **24**(22). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24224132
- [35] RICE-EVANS, C., B. HALLIWELL, G.G. LUNT a Barry HALLIWELL, 1995. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposia*. **61**, 73-101. ISSN 0067-8694. Dostupné z: doi:10.1042/bss0610073
- [36] LEVINE, Mark, 1999. Criteria and Recommendations for Vitamin C Intake. *JAMA*. **281**(15). ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.281.15.1415
- [37] KALÁČ, Pavel, 2001. *Organická chemie přírodních látek a kontaminantů*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta. ISBN 80-704-0520-1.
- [38] RACEK, Jaroslav, c2003. *Oxidační stres a jeho ovlivnění*. Praha: Galén. Repetitorium. ISBN 80-726-2231-5.
- [39] D. PATEL ET AL, Roshan, 2010. *Der Pharmacia Lettre: Antioxidant Potential of Leaves of Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng* [online]. *Der Pharmacia Lettre*, 2010, 2(4): 240-245. Shree Leuva Patel Trust Pharmacy Mahila College, Amreli, (Gujarat), India, 240-245 [cit. 2021-01-22]. ISSN 0975-5071. Dostupné z: <https://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/antioxidant-potential-of-leaves-of-plectranthus-amboinicus-lourspreng.pdf>
- [40] BRIGELIUS-FLOHÉ, Regina, 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine*. **27**(9-10), 951-965. DOI: 10.1016/S0891-5849(99)00173-2. ISSN 08915849. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584999001732>
- [41] POLI, G., E. ALBANO a MU. DIANZANI, 1993. *Free radicals: From basic science to medicine*. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag. ISBN 978-3-0348-9116-5.
- [42] TRABER, Maret G. a Jeffrey ATKINSON, 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*. **43**(1), 4-15. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024. ISSN 08915849. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584907002195>
- [43] PAPAS, A.M, 1999. Diet and Antioxidant Status. *Food and Chemical Toxicology*. **37**(9-10), 999-1007. DOI: 10.1016/S0278-6915(99)00088-5. ISSN 02786915. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691599000885>
- [44] LIN, Jen-Kun, Chih-Li LIN, Yu-Chih LIANG, Shoei-Yn LIN-SHIAU a I-Ming JUAN, 1998. Survey of Catechins, Gallic Acid, and Methylxanthines in Green, Oolong, Pu-erh, and Black Teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **46**(9), 3635-3642. DOI: 10.1021/jf980223x. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf980223x>
- [45] ALI, Abdul Manaf, Muhammad Mukram MACKKEEN, Saleh H. EL-SHARKAWY, Abdul Hamid JUNAINAH, Ismail NOR HARDIANI, Ahmad FAUJAN a Lajis MD

- NORDIN, 1996. Antiviral and cytotoxic activities of some plants used in Malaysian indigenous medicine. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. **19**(2/3), pp. 129-136. ISSN 0126-6128. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/236960016_Antiviral_and_Cytotoxic_Activities_of_Some_Plants_Used_in_Malaysian_Indigenous_Medicine
- [46] PINHEIRO, Patrícia Fontes, Adilson Vidal COSTA, Thammyres de Assis ALVES, Iasmini Nicoli GALTER, Carlos Alexandre PINHEIRO, Alexandre Fontes PEREIRA, Carlos Magno Ramos OLIVEIRA a Milene Miranda Praça FONTES, 2015. Phytotoxicity and Cytotoxicity of Essential Oil from Leaves of *Plectranthus amboinicus*, Carvacrol, and Thymol in Plant Bioassays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **63**(41), 8981-8990. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b03049. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.5b03049>
- [47] CARBAJAL, Daisy, Angel CASACO, Lourdes ARRUZAZABALA, Ricardo GONZALEZ a Victor FUENTES, 1991. Pharmacological screening of plant decoctions commonly used in Cuban folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. **33**(1-2), 21-24. ISSN 03788741. Dostupné z: [doi:10.1016/0378-8741\(91\)90155-7](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90155-7)
- [48] OLIVEIRA, Rinalda de Araújo G. de, Edeltrudes de O. LIMA, Evandro L. de SOUZA, Wellington L. VIEIRA, Kristerson R. L. FREIRE, Vinicius N. TRAJANO, Igara O. LIMA a Raimundo N. SILVA-FILHO, 2007. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **17**(2), 186-190. ISSN 0102-695X. Dostupné z: [doi:10.1590/S0102-695X2007000200009](https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000200009)
- [49] ONG, H.C. a M. NORDIANA, 1999. Malay ethno-medico botany in Machang, Kelantan, Malaysia. *Fitoterapia*. **70**(5), 502-513. ISSN 0367326X. Dostupné z: [doi:10.1016/S0367-326X\(99\)00077-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00077-5)
- [50] GURGEL, Ana Pavla A. Diniz, Jackeline G. DA SILVA, Ana Ruth S. GRANGEIRO, Danielli C. OLIVEIRA, Cynthia M.P. LIMA, Aldo C.P. DA SILVA, Rinalda A.G. OLIVEIRA a Ivone A. SOUZA, 2009. In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. **125**(2), 361-363. ISSN 03788741. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jep.2009.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.07.006)
- [51] Z. HASIBUAN ROSIDAH, Poppy Anjelisa, Syafruddin ILYAS a M. Pandapotan NASUTION, 2013. Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Extracts. *International Journal of Pharmacy Teaching & Practices*. **Vol.4**(3), 755-758. Dostupné také z: <https://www.iomcworld.org/articles/antioxidant-and-cytotoxic-activities-of-plectranthus-amboinicus-lour-spreng-extracts.pdf>
- [52] RAMALAKSHMI, P., N. SUBRAMANIAN, R. SARAVANAN, H. MOHANAKRISHNAN a M. MUTHU, November, 2014. ANTICANCER EFFECT OF *Coleus amboinicus* (KARPOORAVALLI) ON HUMAN LUNG CANCER CELL LINE (A549). *International Journal of Development Research*. **Vol 4**(Issue11), pp. 2442-2449. ISSN 2230-9926. Dostupné také z: <https://www.journalijdr.com/sites/default/files/issue-pdf/2488.pdf>

- [53] THIPPESWAMY, A. H. M., A. H. M. VISWANATHA SWAMY, Rucha KULKARNI, BC KOTI a Aparna GORE, 2011. Alcoholic leaf extract of *Plectranthus amboinicus* regulates carbohydrate metabolism in alloxan-induced diabetic rats. *Indian Journal of Pharmacology*. **43**(3), 286–290. ISSN 0253-7613. Dostupné z: doi:10.4103/0253-7613.81520
- [54] LUKHOBBA, Catherine W., Monique S.J. SIMMONDS a Alan J. PATON, 2006. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology*. **103**(1), 1-24. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2005.09.011
- [55] PINO, Jorge A., Jorge GARCIA a Marco A. MARTINEZ, 1996. Comparative Chemical Composition of the Volatiles of *Coleus aromaticus* Produced by Steam Distillation, Solvent Extraction and Supercritical Carbon Dioxide Extraction. *Journal of Essential Oil Research*. **8**(4), 373-375. ISSN 1041-2905. Dostupné z: doi:10.1080/10412905.1996.9700643
- [56] ASIIMWE, Savina, Anna-Karin BORG- KARLSSON, Muhammad AZEEM, Kamatenesi MAUD MUGISHA, Agnes NAMUTEBI a Ndukui James GAKUNGA, February 2014. Chemical composition and Toxicological evaluation of the aqueous leaf extracts of *Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*. **3**(2), PP.19-27. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/264623408_Chemical_composition_and_toxicological_evaluation_of_the_aqueous_leaf_extract_of_Plectranthus_amboinicus_Lour_Spreng
- [57] AZIZ, Zarith Asyikin Abdul, Akil AHMAD, Siti Hamidah Mohd SETAPAR, et al., 2018. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. *Current Drug Metabolism*. **19**(13), 1100-1110. ISSN 13892002. Dostupné z: doi:10.2174/1389200219666180723144850
- [58] WANG, Lijun a Curtis L. WELLER, 2006. *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*. **17**(6), 300-312. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2005.12.004
- [59] RICHTER, Jana a Ingo SCHELLENBERG, 2007. Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **387**(6), 2207-2217. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-006-1045-6
- [60] ASBAHANI, A. El, K. MILADI, W. BADRI, et al., 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*. **483**(1-2), 220-243. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.069
- [61] CAN BASER, K. Husnu a Gerhard BUCHBAUER, 2016. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Second Edition. CRC Press. ISBN 9781466590465.
- [62] MANJAMALAI A. a V.M. BERLIN GRACE, March 2012. Bioactive evaluation of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* by GC-MS analysis and its role as a drug for

- microbial infections and inflammation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **4**(3), 205-211. ISSN 0975-1491. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/256706199_Bioactive_evaluation_of_the_essential_oil_of_plectranthusamboinicus_by_GC-MS_analysis_and_its_role_as_a_drug_for_microbial_infections_and_inflammation
- [63] VASCONCELOS, Sara Edwrigens Costa Benício, Hider Machado MELO, Theodora Thays Arruda CAVALCANTE, Francisco Eduardo Aragão Catunda JÚNIOR, Mário Geraldo DE CARVALHO, Francisca Gleire Rodrigues MENEZES, Oscarina Viana DE SOUSA a Renata Albuquerque COSTA, 2017. Plectranthus amboinicus essential oil and carvacrol bioactive against planktonic and biofilm of oxacillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **17**(1). ISSN 1472-6882. Dostupné z: doi:10.1186/s12906-017-1968-9
- [64] HSU, Kuang-Ping a Chen-Lung HO, 2019. Antimildew Effects of Plectranthus amboinicus Leaf Essential Oil on Paper. *Natural Product Communications*. **14**(7). ISSN 1934-578X. Dostupné z: doi:10.1177/1934578X19862903
- [65] DAO, Tan Phat, Duy Chinh NGUYEN, Duy Trinh NGUYEN, et al., 2019. Extraction Process of Essential Oil from Plectranthus amboinicus Using Microwave-Assisted Hydrodistillation and Evaluation of It's Antibacterial Activity. *Asian Journal of Chemistry*. **31**(5), 977-981. ISSN 0975427X. Dostupné z: doi:10.14233/ajchem.2019.21667
- [66] BOŽOVIĆ, Mijat, Alberto NAVARRA, Stefania GARZOLI, Federico PEPI a Rino RAGNO, 2017. Essential oils extraction: a 24-hour steam distillation systematic methodology. *Natural Product Research*. **31**(20), 2387-2396. ISSN 1478-6419. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2017.1309534
- [67] PRADO, Juliana M., Renata VARDANEGA, Isabel C.N. DEBIEN, Maria Angela de Almeida MEIRELES, Lia Noemi GERSCHENSON, Halagur Bogegowda SOWBHAGYA a Smain CHEMAT, 2015. Conventional extraction. *Food Waste Recovery*. Elsevier, 2015, 127-148. DOI: 10.1016/B978-0-12-800351-0.00006-7. ISBN 9780128003510. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128003510000067>
- [68] BEZERRA, Rita de Cássia de Freitas, Francisco Barros de Oliveira NETO, Francisco Felipe Maia da SILVA, Luciana Medeiros BERTINI a Leonardo Alcântara ALVES, November 2017. Seasonal effect in essential oil composition and antioxidant activity of Plectranthus amboinicus leaves. *Bioscience Journal*. **33**(6), 1608-1616. ISSN 19813163. Dostupné z: doi:10.14393/BJ-v33n6a2017-37154
- [69] LOPES, Pablo Queiroz, Fabíola Bernardo CARNEIRO, Ana Letícia BRAZ DE SOUSA, Sócrates Golziodo SANTOS, Elquio Eleamen OLIVEIRA a Luiz Alberto LIRA SOARES, Jan-Mar 2017. Technological Evaluation of Emulsions Containing The Volatile Oil from Leaves of Plectranthus Amboinicus Lour. *Pharmacognosy Magazine*. **13**(49), 159-167. ISSN 0973-1296. PMID: 28216901. Dostupné z: doi:10.4103/0973-1296.197646

- [70] NN, Azwanida, 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants*. **04**(03). ISSN 21670412. Dostupné z: doi:10.4172/2167-0412.1000196
- [71] TAHER, Muhammad, Norazsida RAMLI, PakeerOothuman Syed AHAMED a HassanMohamed ELHADY, March 2014. Antimalarial activity of Malaysian *Plectranthus amboinicus* against *Plasmodium berghei*. *Pharmacognosy Research*. **6**(4), 280-284. ISSN 0974-8490. Dostupné z: doi:10.4103/0974-8490.138248
- [72] PATEL, Roshan, Naveen MAHOBIA, Naheed WASEEM, Nitin UPWAR a Sudarshan SINGH, 2010. Phyto-Physicochemical Investigation of Leaves of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. *Pharmacognosy Journal*. **2**(13), 536-542. ISSN 09753575. Dostupné z: doi:10.1016/S0975-3575(10)80057-4
- [73] ABUBAKAR, AbdullahiR a Mainul HAQUE, 2020. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*. **12**(1). ISSN 0975-7406. Dostupné z: doi:10.4103/jpbs.JPBS_175_19
- [74] WIBISONO, Kunto, Syarifah Iis AISYAH, Sri SUHESTI a Waras NURCHOLIS, 2019. Optimization of Total Flavonoids Extraction and A-Glucosidase Inhibitory Activity from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Leaves using the Simplex-Centroid Design. *Molekul*. **14**(2), 84-91. ISSN 2503-0310. Dostupné z: doi:10.20884/1.jm.2019.14.2.497
- [75] Extrakční techniky: Extrakce v Soxhletově extraktoru. *Mendelova univerzita v Brně* [online]. [cit. 2021-01-22]. Dostupné z:
- [76] MAMIDIPALLY, Pavan K. a Sean X. LIU, 2004. First approach on rice bran oil extraction using limonene. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **106**(2), 122-125. ISSN 1438-7697. Dostupné z: doi:10.1002/ejlt.200300891
- [77] https://www.researchgate.net/publication/292544627_Optimisation_of_extraction_of_thymol_from_plectranthus_amboinicus_leaves_using_response_surface_methodology
- [78] LABORATORNÍ PRÁCE Č. 23 EXTRAKCE. In: *Http://interaktivni-chemie.cz/* [online]. [cit. 2021-01-22]. Dostupné z: <http://interaktivni-chemie.cz/wp-content/uploads/23-extrakce.pdf>
- [79] MATIAS, Diogo, Marisa NICOLAI, Lucília SARAIVA, et al., 2019. Cytotoxic Activity of Royleanone Diterpenes from *Plectranthus madagascariensis* Benth. *ACS Omega*. **4**(5), 8094-8103. ISSN 2470-1343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.9b00512
- [80] DELAZAR, Abbas, Lutfun NAHAR, Sanaz HAMEDEYAZDAN a Satyajit D. SARKER, 2012. Microwave-Assisted Extraction in Natural Products Isolation. *Natural Products Isolation*. Totowa, NJ: Humana Press, 2012-2-8, 89-115. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-61779-623-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-624-1_5

- [81] NABILAH, A. Samada, Dayang Norulfairuz Abang ZAIDELA, Eraricar SALLEHA, Abdul Halim Mohd YUSOFA, Daniel Joe DAILINA a Dyg Norkhairunnisa Abang ZAIDELB, 2019. Optimization of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng Extraction Process using Microwave-Assisted Technique. *Chemical Engineering Transactions*. **72**, 397- 402. ISSN 2283-9216. Dostupné z: doi:10.3303/CET1972067
- [82] BIMAKR, Mandana, Ali GANJLOO, Soheila ZARRINGHALAMI a Elham ANSARIAN, 2017. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Malva sylvestris* leaves and its comparison with agitated bed extraction technique. *Food Science and Biotechnology*. **26**(6), 1481-1490. ISSN 1226-7708. Dostupné z: doi:10.1007/s10068-017-0229-5
- [83] OROIAN, Mircea, Florina DRANCA a Florin URSACHI, 2020. Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. *Journal of Food Science and Technology*. **57**(1), 70-78. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-019-04031-x
- [84] ZAHARI, Nur Amirah Asifa Raisha, Gun Hean CHONG, Luqman Chuah ABDULLAH a Bee Lin CHUA, 2020. Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) Process on Thymol Concentration from *Plectranthus Amboinicus* Leaves: Kinetic Modeling and Optimization. *Processes*. **8**(3). ISSN 2227-9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr8030322
- [85] RICHTER, Bruce E., Brian A. JONES, John L. EZZELL, Nathan L. PORTER, Nebojsa AVDALOVIC a Chris POHL, 1996. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry*. **68**(6), 1033-1039. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac9508199
- [86] BRACHET, Anne, Rudaz SERGE, Lidia MATEUS, Philippe CHRISTEN, JEAN-LU a Veuthey, 2001. Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Journal of Separation Science*. **2001**(vol. 24), p. 865-873. Dostupné z: doi:10.1002/1615-9314(20011101)24:10/11<865::AID-JSSC865>3.0.CO;2-U
- [87] LAILA, Farida, Dedi FARDIAZ, Nancy Dewi YULIANA, Muhammad Rizal Martua DAMANIK a Fitriya Nur Annisa DEWI, 2020. Phytochemical Contents of Torbangun (*Coleus amboinicus* Lour) from Fractionation of Pressurized Liquid Extraction. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. **25**(2), 224-231. ISSN 08534217. Dostupné z: doi:10.18343/jipi.25.2.224
- [88] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad Koraichi IBNSOUDA, 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. **6**(2), 71-79. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- [89] HEATLEY, N. G., 1944. A method for the assay of penicillin. *Biochemical Journal*. **38**(1), 61-65. ISSN 0306-3283. Dostupné z: doi:10.1042/bj0380061
- [90] JORGENSEN, James H. a Mary Jane FERRARO, 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. **49**(11), 1749-1755. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1086/647952

- [91] doc. MVDr. Renáta, doc. MVDr. Renáta BURSOVÁ, Mgr. Marta DUŠKOVÁ, PH.D. a MVDr. Lenka NECIDOVÁ, PH.D., 2014. *MIKROBIOLOGIE POTRAVIN – PRAKTICKÁ CVIČENÍ I. OBECNÁ MIKROBIOLOGIE* [online]. Revidované vydání. Brno [cit. 2021-01-25]. Dostupné z: https://fvhe.vfu.cz/files/cela-skripta-bursova-a-kol._mikrobiologie-potravin-praktika-i_elektronicka-verze-zari-2015.pdf
- [92] HAUSDORFER, J., E. SOMPEK, F. ALLERBERGER, M. P. DIERICH a S. RÜSCHGERDES, September 1998. E-test for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **2**(Number 9), pp. 751-755(5). ISSN 1027-3719. Dostupné také z: <https://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtd/1998/00000002/00000009/art00010#>
- [93] Antimicrobial susceptibility test strip ETEST®. In: <https://www.medicalexpo.com/> [online]. [cit. 2021-01-25]. Dostupné z: <https://www.medicalexpo.com/prod/biomerieux/product-70644-864562.html>
- [94] DE OLIVEIRA, Francisco Fábio Martins, Alba Fabiola TORRES, Thially Braga GONÇALVES, et al., 2013. Efficacy of Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng in a Murine Model of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Skin Abscesses. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2013**, 1-9. ISSN 1741-427X. Dostupné z: doi:10.1155/2013/
- [95] PRITIMA, RA a RS PANDIAN, 2008. Antimicrobial Activity Of Coleus aromaticus (Benth) Against Microbes Of Reproductive Tract Infections Among Women. *African Journal of Infectious Diseases*. **1**(1), 18-24. ISSN 2006-0165. Dostupné z: doi:10.4314/ajid.v1i1.42081
- [96] PARAMASIVAM, Deepak, Balamuralikrishnan BALASUBRAMANIAN, Sungkwon PARK, Palanisamy ALAGAPPAN, Tanushri KAUL, Wenchao LIU a Perumal PACHIAPPAN, 2020. Phytochemical profiling and biological activity of Plectranthus amboinicus (Lour.) mediated by various solvent extracts against Aedes aegypti larvae and toxicity evaluation. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **13**(11). ISSN 1995-7645. Dostupné z: doi:10.4103/1995-7645.295360
- [97] SWAMY, Mallappa Kumara, Greetha ARUMUGAM, Ravinder KAUR, Ali GHASEMZADEH, Mazina Mohd. YUSOFF a Uma Rani SINNIHAH, 2017. GC-MS Based Metabolite Profiling, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Different Solvent Extracts of Malaysian Plectranthus amboinicus Leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2017**, 1-10. ISSN 1741-427X. Dostupné z: doi:10.1155/2017/1517683
- [98] BHATT, Praveena a Pradeep S. NEGI, 2012. Antioxidant and Antibacterial Activities in the Leaf Extracts of Indian Borage (<i>Plectranthus amboinicus</i>). *Food and Nutrition Sciences*. **03**(02), 146-152. ISSN 2157-944X. Dostupné z: doi:10.4236/fns.2012.32022
- [99] HASSANI, M. Saïd, I. ZAINATI, S. ZRIRA, S. MAHDI a M. OUKESSOU, 2012. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Plectranthus amboinicus (Lour) Spring. Essential Oil from Archipelago of Comoros. *Journal of Essential Oil Bearing*

- [100] SIVARANJANI, D., P. SARANRAJ, M. MANIGANDAN a K. AMALA, 2019. Antimicrobial activity of *Plectranthus amboinicus* solvent extracts against Human Pathogenic Bacteria and Fungi. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. **9**(3), 36-39. ISSN 2250-1177. Dostupné z: doi:10.22270/jddt.v9i3.2604
- [101] STRATIL, P., B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ, 2007. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*. **71**(4), 1741-1751. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2006.08.012
- [102] STRATIL, P., V. KUBÁŇ a J. FOJTOVÁ, 2008. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Sciences*. **26**(4), 242-253. ISSN 12121800. Dostupné z: doi:10.17221/1119-CJFS
- [103] MUHAMAD, Shamsul a Siti Fatimah Zahrah MAT ALI, 2019. Boiling increase antioxidant activity, total phenolic content and total flavonoid content in *Plectranthus amboinicus* leaves. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. **6**(3), 024-030. ISSN 25813250. Dostupné z: doi:10.30574/gscbps.2019.6.3.0023
- [104] EL-HAWARY, Seham S, Rabie H EL-SOFANY, Azza R ABDEL-MONEM, Rehab S ASHOUR a Amany A SLEEM, 2012. Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) spreng growing in Egypt (Lamiaceae). *Pharmacognosy Journal*. **4**(32), 45-54. ISSN 09753575. Dostupné z: doi:10.5530/pj.2012.32.9
- [105] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ, 2004. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. Praha, ČR: Česká společnost chemická, **98**(4), 174 – 179. ISSN 0009-2770. Dostupné také z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf
- [106] KARADAG, Ayse, Beraat OZCELIK a Samim SANER, 2009. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*. **2**(1), 41-60. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-008-9067-7
- [107] KEDARE, Sagar B. a R. P. SINGH, 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. **48**(4), 412-422. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-011-0251-1
- [108] GARRETT, Andrew R., Byron K. MURRAY, Richard A. ROBISON a Kim L. O'NEILL, 2010. Measuring Antioxidant Capacity Using the ORAC and TOSC Assays. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*. Totowa, NJ: Humana Press, 2010-9-30, 251-262. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-60761-410-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-411-1_17
- [109] HASIBUAN, Poppy Anjelisa Zaitun, Panal SITORUS, Denny SATRIA a Rizka Damela SIBUEA, 2019. Antioxidant Properties and Cytotoxic Activity of Ethyl Acetate Fraction of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Leaves on HeLa and T47D Cell

- Lines. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*. **10**(1), 37-45. ISSN 2355-8989. Dostupné z: doi:10.14499/indonesianjcanchemoprev10iss1pp37-45
- [110] BINIECKA, Małgorzata a Sergio CAROLI, 2011. Analytical methods for the quantification of volatile aromatic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **30**(11), 1756-1770. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2011.06.015
- [111] ARTHUR, Catherine L. a Janusz. PAWLISZYN, 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*. **62**(19), 2145-2148. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00218a019
- [112] SPME (Solid phase microextraction) Mikroextrakce tuhou fází, 2011. <https://fvhe.vfu.cz> [online]. [cit. 2021-02-13]. Dostupné z: https://fvhe.vfu.cz/files/teorie_spme.pdf?fbclid=IwAR3z6cPEeyWiAp_-2CZgIa_BbieCsUmWMG2ssoCbAU9AS-5-QpSA-nERA-A
- [113] *Handbook of Solid Phase Microextraction*, 2012. Spojené státy americké: Elsevier, 496 s. Chemistry 2011. ISBN 978-0-12-416017-0. Dostupné také z: C2011-0-04297-7
- [114] FORGÁCS, E. a T. CSERHÁTI, 2003. Gas chromatography. *Food Authenticity and Traceability*. Elsevier, 2003, 197-217. ISBN 9781855735262. Dostupné z: doi:10.1533/9781855737181.1.197
- [115] SHELLIE, R.A., 2013. Gas Chromatography. *Encyclopedia of Forensic Sciences*. Elsevier, 2013, s. 579-585. ISBN 978-0-12-382166-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-382165-2.00245-2
- [116] ÖTLEŞ, S., 2015. Analysing the composition of fortified foods and supplements: the case of vitamins. *Dietary Supplements*. Elsevier, 2015, s. 37-44. ISBN 9781782420767. Dostupné z: doi:10.1533/9781782420811.1.37
- [117] FENG, Tao, Min SUN, Shiqing SONG, Haining ZHUANG a Lingyun YAO, 2019. Gas chromatography for food quality evaluation. *Evaluation Technologies for Food Quality*. Elsevier, 2019, s. 219-265. ISBN 978-0-12-814217-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814217-2.00012-3
- [118] SNEDDON, J., S. MASURAM a J. C. RICHERT, 2007. Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Basic Principles, Instrumentation and Selected Applications for Detection of Organic Compounds. *Analytical Letters*. **40**(6), 1003-1012. ISSN 0003-2719. Dostupné z: doi:10.1080/00032710701300648
- [119] HOLČAPEK, Michal, 2016. *Spojení hmotnostní spektrometrie a separačních technik* [online]. In: <https://holcapek.upce.cz> [cit. 2021-02-13]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/09_Spojeni_MS_separace.pdf
- [120] KALUARACHCHI, M., M.R. LEWIS a J.C. LINDON, 2017. Standardized Protocols for MS-Based Metabolic Phenotyping. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Third Edition. Elsevier, 2017, s. 224-231. ISBN 9780128032244. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.12134-1

- [121] TSIMIDOU, M. a D. BOSKOU, 2003. ADULTERATION OF FOODS | Detection. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Second Edition. Elsevier, 2003, s. 47-55. ISBN 9780122270550. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-227055-X/00013-4
- [122] ADAMS, Robert P., 2007. *Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry*. 4th ed. Ilured Publishing corporation: Carol Stream. ISBN 978-193-2633-214.
- [123] TEWARI, G., C. PANDE, G. KHARKWAL, S. SINGH a C. SINGH, 2012. Phytochemical study of essential oil from the aerial parts of *Coleus aromaticus* Benth. *Natural Product Research*. **26**(2), 182-185. ISSN 1478-6419. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2011.574135
- [124] ŚLUSARCZYK, Sylwester, Adam CIEŚLAK, Yulianri Rizki YANZA, Małgorzata SZUMACHER-STRABEL, Zora VARADYOVA, Marta STAFINIĄK, Dorota WOJNICZ a Adam MATKOWSKI, 2021. Phytochemical Profile and Antioxidant Activities of *Coleus amboinicus* Lour. Cultivated in Indonesia and Poland. *Molecules*. **26**(10). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26102915
- [125] KHAN, DM., L. BERNAITIS, KL. SHOBHA, M. ASHOK a P. Shenoy REVATHI, 2013. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *TAXUS BACCATA*, *PHYLLANTHUS DEBILIS*, *PLECTRANTHUS AMBOINICUS* AGAINST *CANDIDA* SPECIES OF CLINICAL ORIGIN. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*. **2013**(4(5)), 386-389. ISSN 0976 - 3651. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/291274081_International_Journal_of_Biological_Pharmaceutical_Research_ANTIFUNGAL_ACTIVITYOF_TAXUS_BACCATA_PHYLLANTHUS_DEBILIS_PLECTRANTHUS_AMBOINICUS_AGAINST_CANDIDA_SPECIES_OF_CLINICAL_ORIGIN
- [126] KUČERKA, Štefan. Výroba a charakterizace sýrů s přidavkem rostlinného extraktu. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131321>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAPM	Metoda stanovení s 4-aminoantipyrinem
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric-Pressure Chemical Ionization)
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization)
ASE	Extrakce za zvýšeného tlaku a teploty (Accelerated Solvent Extraction)
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluen
CI	Chemická ionizace (Chemical Ionization)
CUPRAC	Antioxidační kapacita redukce mědnatých kationtů (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
EI	Elektronová ionizace (Electron Ionization)
ESI	Elektrosprej (Electrospray Ionization)
FCM	Folin-Ciocalteu metoda
Fe ²⁺ -TPTZ	Fe ²⁺ -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)
Fe ³⁺ -TPTZ	Fe ³⁺ -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)
FRAP	Antioxidační kapacita redukce železnatých iontů (Ferric Reducing Ability of Plasma)
GAE	Ekvivalent kyseliny gallové (Gallic Acid Equivalent)
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GC-ECD	Plynová chromatografie/Detektor elektronového záchytu (Gas Chromatography/Electron Capture Detector)
GC-FID	Plynová chromatografie/Plameno-ionizační detektor (Gas Chromatography/Flame Ionization Detector)
GC-MS	Plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie (Gas Chromatography/Mass Spectrometry)
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie (Gas-Liquid Chromatography)
GSC	Plynová absorpční chromatografie (Gas-Solid Chromatography)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
HS-SPME	Head-Space mikroextrakce tuhou fází (Head-Space Solid-Phase Microextraction)
MAE	Mikrovlnná extrakce (Microwave-Assisted Extraction)
MALDI	Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
MIB	Minimální baktericidní koncentrace
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MRSA	Methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
NMR	Nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance)
ORAC	Kapacita absorpce kyslíkových radikálů (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
PBM	Metoda Price a Butler
PFE	Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (Pressurised Fluid Extraction)
PHGPx	Enzym fosfolipid hydroperoxid glutathion peroxidáza (Phospholipid-Hydroperoxide Glutathione Peroxidase)

PMAE	Tlaková mikrovlnná extrakce (Pressurized Microwave-Assisted Extraction)
PSE	Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (Pressurised Solvent Extraction)
RSM	Metoda plochy odezvy (Response Surface Methodology)
RT	Retenční čas
SFE	Superkritická fluidní extrakce (Supercritical Fluid Extraction)
SFMAE	Mikrovlnná extrakce bez rozpouštědla (Solvent-Free Microwave-Assisted Extraction)
SPME	Mikroextrakce tuhou fází (Solid-Phase Microextraction)
TEAC	Ekvivalent antioxidační kapacity Troloxu (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
TFC	Celkový obsah flavonoidů
TPC	Celkový obsah polyfenolických látek
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
UAE	Ultrazvuková extrakce (Ultrasonic-Assisted Extraction)
UPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
UV	Ultrafialové

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha A GC-MS analýza optimalizovaného extraktu

Příloha B Chromatogram optimalizovaného extraktu

8.1 Příloha A: GC-MS analýza optimalizovaného extraktu

Tabulka 17: Sloučeniny identifikované v optimalizovaném extraktu (OPT A) z *P. amboinicus*

RT [min]	Sloučenina	Skupina
6,55	kamfen	Monoterpeny
8,41	3-karen	Monoterpeny
8,38	1R- α -pinen	Monoterpeny
8,84	β -myrcen	Monoterpeny
9,26	(+)-4-karen	Monoterpeny
9,80	limonen	Monoterpeny
10,07	β -terpinen	Monoterpeny
11,02	α -felandren	Monoterpeny
11,13	γ -terpinen	Monoterpeny
11,82	o-cymen	Monoterpeny
11,89	p-cymen	Monoterpeny
12,03	terpinolen	Monoterpeny
13,64	isoterpinolen	Monoterpeny
15,02	cis-3-hexen-1-ol	Alkoholy
15,16	3-oktanol	Alkoholy
15,25	nonanal	Aldehydy
15,41	fenchon	Kyslíkaté monoterpeny
16,30	ethyl oktanoát	Estery
16,66	1-okten-3-ol	Alkoholy
17,67	α -kopaen	Seskviterpeny
17,76	α -kubeben	Seskviterpeny
18,54	kafr	Kyslíkaté monoterpeny
19,12	linalool	Kyslíkaté monoterpeny
19,85	nonyl acetát	Estery
20,02	α -bergamoten	Seskviterpeny
20,38	karyofylen	Seskviterpeny
20,62	karvakrol methyl ether	Kyslíkaté monoterpeny

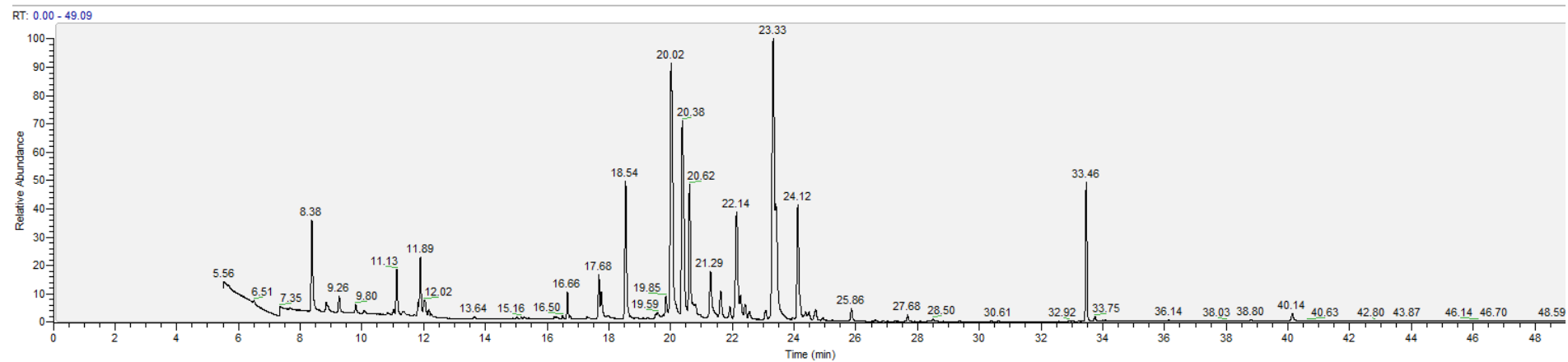
Tabulka 17: Sloučeniny identifikované v optimalizovaném extraktu (OPT A) z *P. amboinicus* – pokračování

RT [min]	Sloučenina	Skupina
21,29	ethyl dekanoát	Estery
21,63	epi- β -santalen	Seskviterpeny
21,92	cis- β -farnesen	Seskviterpeny
22,13	humulen	Seskviterpeny
22,27	guaia-1(10),11-dien	Seskviterpeny
22,41	isokaryofylen	Seskviterpeny
22,55	γ -muurolen	Seskviterpeny
23,08	eremofilen	Seskviterpeny
23,32	β -selinen	Seskviterpeny
23,43	γ -gurjunen	Seskviterpeny
24,12	kadina-1(10),4-dien	Seskviterpeny
24,37	β -funebren	Seskviterpeny
24,49	α -kurkumen	Seskviterpeny
24,70	guaia-6,9-dien	Seskviterpeny
24,93	α -kadinen	Seskviterpeny
25,86	kadina-1,3,5-trien	Seskviterpeny
26,24	trans-Z- α -bisabolen epoxid	Epoxidy
26,65	γ -selinen	Seskviterpeny
26,89	3-O-benzyl-D-glukóza	Monosacharid
27,36	4,5,9,10-dehydro-isolongifolen	Cykloalkan
27,68	α -kalakoren	Seskviterpeny
28,08	7-epi-cis-seskvisabinen hydrát	Seskviterpeny
28,50	1-dodekanol	Alkoholy
29,85	l-gala-l-ido-októza	Monosacharid
30,40	karyofylen alkohol	Alkoholy
30,61	α -korokalen	Seskviterpeny
32,91	thymol	Monoterpeny

Tabulka 17: Sloučeniny identifikované v optimalizovaném extraktu (OPT A) z *P. amboinicus* – pokračování

RT [min]	Sloučenina	Skupina
33,24	askaridol epoxid	Kyslíkaté monoterpeny
33,46	karvakrol	Kyslíkaté monoterpeny
33,75	azulol	Seskviterpeny
34,00	ethyl palmitát	Estery
34,09	1-heptatriakotanol	Alkoholy
34,51	β -vatirenen	Seskviterpeny
36,14	α -hexyl-cinnamaldehyd	Aldehydy
36,23	methyl ester kyseliny 12,15-oktadekadienová	Estery
38,80	6-acetyl- β -D-manóza	Monosacharid
40,14	decyl ester kyseliny kaprinové	Estery

8.2 Příloha B: Chromatogram optimalizovaného extraktu



Obrázek 19: Chromatogram těkavých látek v optimalizovaném extraktu (OPT A) připraveného z *P. amboinicus*; identifikace sloučenin na základě retenčních časů viz Tabulka 17