

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Brno, 2018

Ing. Lenka Burdějová



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

KOMPLEXNÍ ANALÝZA LÉČIVÝCH ROSTLIN A JEJICH POTENCIÁL PŘI VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU

COMPLEX CHARACTERISATION OF MEDICAL HERBS AND STUDY OF THEIR UTILIZATION IN FOOD
INDUSTRY AS A SOURCE OF FUNCTIONAL COMPONENTS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Lenka Burdějová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

Ing. Martin Polovka, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Ing. Lenka Burdějová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **Ing. Martin Polovka, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název dizertační práce:

Komplexní analýza léčivých rostlin a jejich potenciál při využití v potravinářském průmyslu

Zadání dizertační práce:

Cíle dizertační práce je možné rámcově definovat následovně:

1. Pomocí kombinace moderních analytických, spektroskopických a statistických metod komplexně prostudovat složení a vlastnosti vybrané skupiny nejvýznamnějších běžně dostupných léčivých rostlin.
 - a) Komplexně charakterizovat extrakty vybraných léčivých rostlin pocházejících ze dvou lokalit připravených dynamickou extrakcí do vody, 50% ethanolu a dimethylsulfoxidu (DMSO).
 - b) Posoudit efektivitu rozpouštědel v případě různé úpravy vzorku (mražení vs. sušení).
 - c) Posoudit vliv geografických podmínek a roků produkce na vybrané charakteristiky léčivých rostlin.
2. Navrhnout postupy šetrné izolace a následné aplikace vybraných komponentů léčivých rostlin do potravinářských produktů (nápoje).
3. Ve spolupráci s ověřovacím pracovištěm experimentálně ověřit realizovatelnost navrhovaných postupů izolace složek léčivých rostlin a jejich aplikace do potravinářských komodit.

Termín odevzdání dizertační práce: 30.4.2018

Ing. Lenka Burdějová
student(ka)

Ing. Martin Polovka, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.9.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená dizertační práce se zabývá komplexní charakterizací extraktů z léčivých rostlin pomocí spektroskopických a chromatografických technik s důrazem na vliv rozpouštědla, posklizňové úpravy vzorku, lokality a roku produkce na vybrané parametry. Část práce je věnována aplikaci vybraných extraktů z léčivých rostlin ve vhodné formě do nápojů. Tematicky je práce rozdělena do dvou částí.

V první části práce byly pomocí kombinace metod elektronové paramagnetické rezonance, ultrafialové viditelné spektroskopie, kapalinové chromatografie a optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem charakterizovány vodné, ethanolové a dimethylsulfoxidové extrakty z 10 vybraných druhů léčivých rostlin, které byly sbírány ve dvou různých lokalitách v průběhu dvou let (2015, 2016) a posklizňově upravovány dvěma způsoby (zmražení, sušení). Celkově bylo sledováno ve všech extraktech 39 parametrů: konkrétně obsah celkových fenolických látek, flavonoidů, 14 konkrétních fenolických sloučenin, barevné charakteristiky v systému CIE L*a*b* (L*, a*, b*, C*, h°, BI), radikál-zhášecí aktivita s využitím kation radikálu 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonové kyseliny), antioxidační/prooxidační aktivita technikou spinových lapačů v systému 5,5-dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO)/peroxidisíran draselný a obsah 15 minerálních látek (Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb, Zn). Výsledky prokázaly, že sledované parametry léčivých rostlin jsou různou mírou ovlivňovány použitým extrakčním systémem, posklizňovou úpravou vzorků, rokem produkce, původem vzorků (lokalitou) i druhovou skladbou. Bylo prokázáno, že druh extrakčního činidla výrazně ovlivňuje složení extraktů. Na základě analýz byl jako nejvhodnější systém pro potravinářskou aplikaci – izolaci hlavních funkčních složek (fenolických látek, flavonoidů) vybrán 50% ethanol, úprava rostlin sušením a z jednotlivých druhů máta peprná, meduňka lékařská, třezalka tečkovaná a šalvěj lékařská.

Druhou částí práce byla aplikace extraktů vybraných léčivých rostlin do nápojů. Pro aplikaci byly vybrány výše zmíněné rostliny, 25% ethanol místo 50% ethanolu (vzhledem k limitaci obsahu ethanolu v konečné surovině). V první fázi byla optimalizována extrakce léčivých rostlin. Byl vybrán vhodný poměr materiálu a rozpouštědla (1:10), doba extrakce (8 h) a zjištěna nasákavost bylin (50–62 %). Vyrobený extrakt byl po filtraci aplikován k sirupovému základu ve vybraných poměrech pro výrobu jednodruhových sirupů a senzorycky testován za účelem výběru vhodné receptury, příchutě a základu pro výrobu dvoudruhových sirupů. Nejchutnějším a celkově nejpříjemnějším z hlediska *flavouru* byl vyhodnocen mátový sirup a jako základ pro dvoudruhové sirupy byl vybrán šalvějový sirup. V rámci dalšího testování byla vybírána nejvhodnější receptura dvoudruhového sirupu, senzorycky nejvhodnější příchut' a testováno, zda by bylo vhodné vybrané dvoudruhové sirupy dobarvovat. Preferenčně bylo zjištěno, že dvoudruhové sirupy není nutno dobarvovat. Na základě senzorycké analýzy bylo prokázáno, že z jednodruhových sirupů byl nejlépe hodnocen mátový sirup, z dvoudruhových sirupů šalvějovo-mátový, tyto sirupy by po dalším testování bylo možné uvést do výroby a obohatit tak trh s potravinami.

KLÍČOVÁ SLOVA

Léčivé rostliny, fenolické sloučeniny, antioxidační aktivita, barva, kovy, senzorycká analýza

ABSTRACT

Presented thesis deals with the complex characterization of extracts from medical plants using spectroscopic and chromatographic techniques, with emphasis on the influence of solvent, post-harvest treatment of the sample, location and year of production on selected parameters. Part of the work is devoted to application of selected extracts from medical plants in suitable form into beverages. The thesis is divided into two parts.

At the first part of the work combination of electron paramagnetic resonance, ultraviolet visible spectroscopy, liquid chromatography and inductively coupled plasma optical emission spectrometry was applied for characterization of aqueous, ethanol and dimethylsulfoxide extracts from 10 selected medical plants, which were collected from two different locations during two years (2015, 2016) and post-harvestly treated by two ways (freezing, drying). In total, 39 parameters were determined: namely total phenolic compounds content, total flavonoids content, 14 specific phenolic compounds, colour characteristics in the CIE L*a*b* system (L*, a*, b*, C*, h°, BI), radical-quenching activity using the cation radical of the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), antioxidant/pro-oxidant activity using the spin trapping technique in the presence of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)/potassium peroxydisulphate and content of 15 minerals (Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb, Zn). The results confirmed that the studied parameters of medical plants are influenced by the extraction system, post-harvest treatment of samples, year of production, origin of samples (locality) and species composition. It has been shown that the type of extraction solvent significantly affects the composition of the extracts. On the basis of these analyzes, for food application – the isolation of the main functional components (phenolic compounds, flavonoids) – 50% ethanol, post harvest treatment by drying and samples of *Mentha piperita*, *Melissa officinalis*, *Hypericum perforatum* and *Salvia officinalis* were selected.

The second part of the thesis was focused on the application of selected extracts of medical plants to beverages (syrups). The above mentioned plants, 25% ethanol instead of 50% ethanol (due to the limitation of the ethanol content in final raw material), were selected for the application. At first, extraction of medical plants was optimized. Suitable ratio of material and solvent (1:10), extraction time (8 h) and herb absorbency (50–62 %) were determined. The prepared extract after filtration was applied to the syrup concentrate in different ratios to produce one-species syrups and further sensorially tested to select the suitable recipe, the best flavour and basis for the production of two-species syrups. The mint syrup was the most tasty and generally the most acceptable one-species syrup, and sage syrup was selected as the basis for two-species syrups. Further, the most appropriate recipes of the two-species syrups were chosen, the most sensorially acceptable one was selected and further tested if it would be appropriate to colour them. Preferentially, it has been found that it is not necessary to colour two-species syrups. On the basis of the sensory analysis, it has been found that peppermint and sage-peppermint syrups were the most tasty and acceptable syrups, which could be, after further testing, produced industrially to enrich the food market.

KEY WORDS

Medical plants, phenolic compounds, antioxidant activity, colour, metals, sensory analysis

BURDĚJOVÁ, L. *Komplexní analýza léčivých rostlin a jejich potenciál při využití v potravinářském průmyslu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 199 s. Vedoucí dizertační práce Ing. Martin Polovka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi svými návrhy, připomínkami přispěli k vypracování dizertační práce. Zejména děkuji vedoucímu práce Ing. Martinu Polovkovi Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, ochotu a snahu pomoci při řešení dizertační práce i v průběhu celého doktorského studia. Dále bych ráda poděkovala Ing. Evě Vítové Ph.D., Ing. Blance Tobolkové Ph.D. a Ing. Jaromíru Pořízkovi Ph.D. za cenné odborné rady a pomoc. Za spolupráci, poskytnutí vzorků a informací pro dizertační práci bych chtěla poděkovat Ing. Gabriele Křemenové, Ing. Lei Jedonkové z Centra léčivých rostlin Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně a Ing. Jarmile Neugebauerové Ph.D. ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem, kteří mi přinášeli inspiraci a jakkoliv přispěli k dokončení této práce. Můj velký dík také patří celé mé rodině za podporu jak psychickou tak i finanční a hlavně mému muži za trpělivost, lásku a veškerou pomoc.

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 Léčivé rostliny.....	10
2.1.1 <i>Produkce léčivých rostlin v České republice</i>	10
2.1.2 <i>Kontrola kvality léčivých rostlin</i>	10
2.1.3 <i>Zabezpečení kvality léčivých rostlin</i>	11
2.1.4 <i>Chemické složení léčivých rostlin</i>	12
2.1.1 <i>Pozitivní účinky léčivých rostlin</i>	16
2.1.2 <i>Aplikace léčivých rostlin do potravin</i>	17
2.2 Stanovení fenolických sloučenin léčivých rostlin.....	20
2.2.1 <i>Příprava vzorku</i>	20
2.2.2 <i>Extrakční metody</i>	21
2.2.3 <i>Purifikační a izolační metody</i>	25
2.3 Instrumentální techniky vhodné pro stanovení fenolických sloučenin.....	25
2.3.1 <i>UV-VIS spektroskopie</i>	26
2.3.2 <i>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie</i>	26
2.3.3 <i>Plynová chromatografie</i>	28
2.3.4 <i>Další instrumentální techniky</i>	28
2.4 Metody vhodné pro stanovení fenolických látek	29
2.4.1 <i>Stanovení celkového obsahu fenolických látek</i>	29
2.4.2 <i>Stanovení celkového obsahu flavonoidů</i>	29
2.4.3 <i>Stanovení celkového obsahu anthokyanů</i>	29
2.4.4 <i>Stanovení celkového obsahu proanthokyanidinů</i>	29
2.4.5 <i>Stanovení celkového obsahu hydrolyzovaných taninů</i>	30
2.5 Instrumentální techniky vhodné pro stanovení antioxidační aktivity	30
2.5.1 <i>UV-VIS spektroskopie</i>	30
2.5.2 <i>Elektronová paramagnetická rezonance</i>	31
2.6 Metody vhodné pro stanovení antioxidační aktivity.....	31
2.6.1 <i>Metody založené na eliminaci syntetických radikálů</i>	32
2.6.2 <i>Metody založené na eliminaci kyslíkových radikálů</i>	32
2.6.3 <i>Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace</i>	33
2.6.4 <i>Metody založené na redukční schopnosti látek</i>	34
2.7 Přehled studií fenolického profilu a antioxidační aktivity léčivých rostlin	34
2.8 Stanovení minerálních látek.....	36
2.8.1 <i>Příprava vzorku</i>	36
2.8.2 <i>Metody mineralizace</i>	36
2.8.3 <i>Extrakční metody vhodné pro prvkovou analýzu</i>	38
2.9 Instrumentální techniky vhodné pro stanovení minerálních látek	38
2.9.1 <i>Atomová absorpční spektrometrie</i>	39
2.9.2 <i>Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem</i>	39
2.9.3 <i>Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem</i>	39

2.9.4	<i>Rentgenová fluorescenční spektrometrie</i>	40
2.10	Přehled studií minerálního složení léčivých rostlin	40
2.11	Senzorická analýza.....	41
3	CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	43
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
4.1	Laboratorní vybavení	44
4.1.1	<i>Pomůcky</i>	44
4.1.2	<i>Chemikálie</i>	44
4.1.3	<i>Přístroje</i>	44
4.1.4	<i>Vzorky léčivých rostlin pro komplexní charakterizaci</i>	45
4.1.5	<i>Vzorky půd</i>	48
4.2	UV-VIS experimenty	48
4.2.1	<i>Příprava extraktů pro komplexní charakterizaci léčivých rostlin</i>	48
4.2.2	<i>Stanovení celkového obsahu fenolických látek</i>	48
4.2.3	<i>Stanovení celkového obsahu flavonoidů</i>	49
4.2.4	<i>Stanovení barevných charakteristik v systému CIE L*a*b*</i>	50
4.3	EPR experimenty	50
4.3.1	<i>Příprava extraktů pro EPR experimenty</i>	50
4.3.2	<i>Stanovení antioxidační aktivity s využitím kation radikálu ABTS⁺</i>	50
4.3.3	<i>Stanovení antioxidační/prooxidační aktivity s využitím techniky spinových lapačů v přítomnosti DMPO/K₂S₂O₈</i>	50
4.3.4	<i>Parametry EPR analýzy</i>	51
4.3.5	<i>Zpracování experimentálních dat</i>	51
4.4	HPLC experimenty	52
4.4.1	<i>Příprava vzorků pro HPLC-DAD analýzu</i>	52
4.4.2	<i>Stanovení koncentrace konkrétních fenolických sloučenin</i>	52
4.5	ICP-OES experimenty.....	53
4.5.1	<i>Příprava vzorků léčivých rostlin pro ICP-OES experimenty</i>	53
4.5.2	<i>Příprava vzorků půdy pro ICP-OES experimenty</i>	53
4.5.3	<i>Stanovení minerálních látek pomocí ICP-OES</i>	53
4.6	Aplikace vybraných léčivých rostlin do potravin	54
4.6.1	<i>Vzorky léčivých rostlin pro aplikaci do sirupů</i>	54
4.6.2	<i>Příprava extraktů pro aplikaci do sirupů</i>	55
4.6.3	<i>Testování extraktů v laboratorních a poloprovozních podmínkách</i>	55
4.6.4	<i>Výroba sirupového základu a bylinných sirupů</i>	55
4.7	Senzorické hodnocení bylinných nápojů a sirupů.....	56
4.8	Statistické zpracování výsledků	58
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	59
5.1	Komplexní charakterizace léčivých rostlin.....	59
5.1.1	<i>Vliv extrakčních podmínek na celkový obsah fenolických látek</i>	59
5.1.2	<i>Vliv extrakčních podmínek na obsah celkových flavonoidů</i>	66
5.1.3	<i>Vliv extrakčních podmínek na barevné charakteristiky</i>	71

5.1.4	<i>Vliv extrakčních podmínek na radikál-zhášecí aktivitu</i>	76
5.1.1	<i>Vliv extrakčních podmínek na antioxidační aktivitu s využitím techniky spinových lapačů v systému DMPO/K₂S₂O₈</i>	84
5.1.2	<i>Vliv extrakčních podmínek na obsah konkrétních fenolických sloučenin</i>	87
5.1.3	<i>Vliv extrakčních podmínek na obsah prvků</i>	93
5.2	<i>Statistické zhodnocení výsledků</i>	99
5.2.1	<i>Statistické porovnání vodných extraktů</i>	99
5.2.1	<i>Statistické porovnání ethanoloých extraktů</i>	105
5.2.2	<i>Statistické porovnání DMSO extraktů</i>	108
5.2.3	<i>Statistické porovnání extrakční výtěžnosti všech rozpouštědel</i>	111
5.3	<i>Aplikace vybraných léčivých rostlin do potravin</i>	119
5.3.1	<i>Optimalizace extrakce a výroba extraktů z léčivých rostlin v poloprovozních podmínkách</i>	120
5.3.2	<i>Senzorická analýza vyrobených sirupů</i>	124
5.3.3	<i>Senzorická analýza jednodruhových sirupů a nápojů</i>	125
5.3.4	<i>Senzorická analýza dvoudruhových sirupů a nápojů</i>	133
6	<i>ZÁVĚRY</i>	136
7	<i>SEZNAM POUŽITÝCH LITERÁRNÍCH ZDROJŮ</i>	138
8	<i>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</i>	163
9	<i>SEZNAM PŘÍLOH</i>	166
10	<i>PŘÍLOHY</i>	168

1 ÚVOD

Léčivé rostliny jsou plané nebo kultivované rostliny obsahující biologicky účinné látky, které jsou zodpovědné za jejich pozitivní účinky. Léčivé rostliny mají tradiční nepostradatelné místo v medicíně a dodnes se využívají převážně ke zmírnění, prevenci, léčbě onemocnění, k regeneraci a celkové obnově organismu. Jsou nejdůležitějším zdrojem přírodních biologicky aktivních látek a hrají významnou roli v primární zdravotní péči. Alternativní léčba s využitím bylin je v současnosti velmi oblíbená a celkově vzrůstá význam a zájem o léčivé rostliny vzhledem k nižší ceně, větší dostupnosti a bezpečnosti oproti syntetickým výrobkům. Kromě medicíny se léčivé rostliny hojně využívají ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu. Ve farmácii se nejčastěji využívají jako hlavní suroviny pro výrobu léčiv, sirupů a bylinných čajů. V kosmetice slouží některé vybrané druhy léčivých rostlin jako vonné, chuťové ingredience a hlavní suroviny při výrobě kosmetických výrobků. V potravinářském průmyslu se léčivé rostliny používají ke zlepšení chuti, vůně a vzhledu potravin, ke snížení spotřeby soli, tuku a ke konzervaci potravin. Jsou nejčastěji hlavními nebo vedlejšími surovinami při výrobě různých potravinářských výrobků a doplňků stravy.

Vzhledem ke zvyšujícímu se zájmu spotřebitelů o zdravý životní styl, zvyšuje se i povědomí o zdravých, výživově bohatých a pestrých potravinách, kam lze zařadit i léčivé rostliny. Existuje velké množství bylin, avšak pouze malé procento z nich je biologicky a farmaceuticky testováno. Proto se v posledních desetiletích léčivé rostliny staly hlavním objektem výzkumu jakožto potenciální zdroj nových prospěšných biologicky aktivních sloučenin. Dále také došlo ke značnému vývoji nových technologických postupů a metod v oblasti extrakce, izolace, biologického a farmaceutického testování léčivých rostlin s důrazem na jejich kvalitu a bezpečnost. Vzhledem k tomu, že využití léčivých rostlin má velký budoucí průmyslový potenciál, je nezbytné, aby byly nové informace o hlavních složkách léčivých rostlin, o nových metodách využívaných k jejich testování a trendech v technologiích doplňovány o nové poznatky.

Vzhledem k tomu, že daná problematika není dosud ze široka analyzována, předložená dizertační práce se věnuje komplexní charakterizaci extraktů z vybraných léčivých rostlin hlavně z hlediska fyzikálně-chemického, složení, zastoupení fenolických sloučenin, minerálních látek, jejich barevných charakteristik i antioxidačních vlastností. V rámci komplexní charakterizace byl sledován vliv geografických, klimatických podmínek a posklizňových úprav, zároveň i vliv technologického zpracování, konkrétně použitých extrakčních systémů na izolaci funkčních složek léčivých rostlin. Poslední fáze práce představuje přípravu pro praktickou aplikaci získaných extraktů v potravinářském průmyslu. Byly vybrány čtyři druhy léčivých rostlin, vhodná posklizňová úprava a extrakční systém k extrakci fenolických sloučenin pro aplikaci do sirupů, tyto byly následně vyrobeny a senzoricky zhodnoceny.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 LÉČIVÉ ROSTLINY

Léčivé rostliny (byliny), často označované souhrnně léčivé, aromatické a kořeninové rostliny (LAKR) jsou definovány z potravinářského hlediska jako rostliny, které se používají ke zlepšení chuti a aroma potravin. Řadí se mezi nutraceutika, funkční potraviny, fytopotraviny [1]. Zpracovávají se jak čerstvé, tak i sušené části léčivých rostlin (tzv. drogy). Drogou může být celá sušená rostlina nebo její část, např. nať, květ, list, plod, stonek, kůra, semeno nebo kořen [2, 3].

2.1.1 Produkce léčivých rostlin v České republice

V České republice se používá 300 druhů LAKR, celkově se zvyšuje poptávka i jejich produkce. Ministerstvo zemědělství ve své situační zprávě uvádí, že ještě v roce 1999 byly pěstovány na 950 hektarech, v roce 2014 již na 5 566 hektarech (viz Tab. 1).

Rozsah pěstování LAKR je určován nestabilní situací jejich odbytu. Narůstá počet zpracovatelských subjektů, všeobecně roste poptávka, pěstitelů je však nedostatek. Důvodem je na jedné straně především ekonomická i odborná náročnost pěstování LAKR, na druhé pak stagnace výkupních cen a konkurence levných dovážených LAKR [4, 5]. Nejvíce sbíranými léčivými rostlinami v ČR jsou: šípek, listy břízy bělokoré a nať třezalky tečkované.

Tab. 1: Vývoj ploch a produkce rostlin skupiny LAKR v ČR [5]

rok	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
plocha [ha]	5 858	5 184	4 015	5 674	7 864	8 588	7 225	5 659	5 566
produkce [t]	4 727	3 925	3 847	3 900	5 605	7 016	6 098	3 775	5 066
výnos [t]	0,81	0,76	0,96	0,69	0,71	0,82	0,86	0,67	0,91

Ekologická produkce léčivých rostlin v České republice

Ekologické zemědělství představuje v současnosti rychle rostoucí sektor zemědělství většiny zemí světa. V rámci rostlinné ekologické produkce nabývají LAKR stále většího významu, v roce 2013 představovaly téměř 50 % z celkové plochy ekologicky pěstovaných technických plodin. Dle šetření Ústavu zemědělské ekonomiky a informací ČR vzrostl také počet ekofarem, zabývajících se mj. pěstováním LAKR. Většina produkce je určena pro export, domácí trh spotřebuje pouze okolo 2 %; přibližně polovina je pak realizována jako BIO produkty, druhá polovina jako konvenční výrobky. V roce 2011 také vzrostl počet zpracovatelů-výrobců koření a aromatických výtažků v ekologickém režimu. Mezi nejvíce pěstované LAKR patří ostropestřec, kmín, koriandr, heřmánek, meduňka, máta, saturejka, anýz a levandule [4, 5].

2.1.2 Kontrola kvality léčivých rostlin

Léčivé rostliny, zpracovávané pro potravinářské účely, podléhají požadavkům, které vymezuje potravinářská legislativa. Kontrolním orgánem v této oblasti je Státní zemědělská a potravinářská inspekce. Zpracovatelské podniky používají různé systémy řízení jakosti, jako jsou ISO 9001:2000, systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů (HACCP – Hazard

Analysis and Critical Control Points) a správné výrobní praxe (GMP – Good Manufacturing Practice).

Základním parametrem kvality je optická kvalita produktu. Natě, listy a květy musí mít odpovídající barvu, bez černých skvrn a jiných posunů barevnosti. Druhým parametrem jakosti je typická vůně, kterou si každá surovina zachovává v případě správného procesu sušení. Kvalita léčivých rostlin je značně ovlivněna způsobem sklizně, transportu, skladování a zpracování, proto je v případě kontroly jakosti léčivých rostlin stále diskutována správná zemědělská praxe (GAP – Good Agricultural Practice) a výše zmíněná GMP [4-6].

2.1.3 Zabezpečení kvality léčivých rostlin

Při zpracování léčivých rostlin pro výzkum nebo další průmyslové aplikace je nezbytně nutné zabezpečit jejich kvalitu a dodržet základní pěstitelské a technologické postupy. V následujícím přehledu jsou uvedena všeobecná doporučení:

- **Pěstování** na otevřených, slunných a vzdušných lokalitách s jižně orientovanou expozicí.
- **Sklizně** se provádí postupně, dle sklizňové zralosti jednotlivých druhů. Podzemní orgány jako oddenky, hlízy, cibule, by se měly sklízet v zimě. Natě a listy se sklízí v období květu. Květy se sklízí před tvorbou semen v plném květu. Plody a semena se sklízí před dosažením zralého stavu [7, 8].
- **Posklizňové ruční oddělení částí**, které jsou poškozené od hmyzu, plísní aj.
- **Posklizňové umytí rostlin** pod tekoucí vodou.
- **Posklizňové sušení** u většiny LAKR při 30–60 °C, u LAKR s obsahem esenciálních olejů při teplotě nižší než 40 °C, u sprejových sušících technik při 100–200 °C, doba kontaktu s materiálem je však menší než 1 minuta, nutná dobrá cirkulace vzduchu, způsob sušení musí být experimentálně stanoven pro každý druh [7-9].
- **Mikrobiální dekontaminace** ozařováním s použitím gama a rentgenového záření o energii 5 MeV až do 10 MeV a dávkováním až do 10 kG, které je povoleno Codexem Alimentarius. Popřípadě ošetření pomocí páry při teplotě 100–200 °C, následné vysušení horkým vzduchem a rychlé ochlazení [10, 11] nebo za použití plazmy [12].
- **Mletí, rozdrčení** za účelem snížení velikosti částic před samotnou extrakcí, vhodná velikost drčeného materiálu, např. rozdrčení na prášek může způsobovat problémy při protiproudé extrakci a také může vytvářet zákal v extraktu, po mletí kontrola umletého materiálu a případné ruční odstranění nečistot [7, 8, 13].
- **Skladování** sušených léčivých rostlin v pytlích z pytloviny nebo papíru ve stinných, suchých skladech. Vyhnout se skladování v plastových taškách, neumožňují dostatečné větrání. Pytle by měly být označeny latinským názvem rostliny s datem sběru, názvem dodavatele, původem a schválením kontroly jakosti. Zajistit oddělení jednotlivých druhů s vysokým obsahem vonných látek, aby nedošlo k ovlivnění typického aroma jinou surovinou. Doporučená max. lhůta pro skladování, u listů, výhonků, květů a plodů 12–18 měsíců, u kůry a kořenů 12–36 měsíců. Při dlouhodobějším skladování bylin je důležité dodržet správné skladovací podmínky, zabránit styku se sluncem, prachem, hlodavci, hmyzem atd. [7, 8, 14]. Čerstvé léčivé rostlinné materiály by měly být

skladovány při vhodných nízkých teplotách, nejlépe 2–8 °C; mražené výrobky by měly být skladovány při teplotě –18 °C [7].

2.1.4 Chemické složení léčivých rostlin

Chemické složení se může lišit u konkrétních rodů, čeledí, odrůd a druhů. Je značně ovlivněno environmentálními a geografickými faktory. Může se lišit v rámci ontogeneze, vliv může mít množství živin, podmínky při pěstování, vitalita a stáří rostliny. Dále může mít vliv také příprava materiálu, podmínky skladování nebo doba sklizně [15, 16].

Léčivé rostliny obsahují vodu, organické a anorganické látky. Z organických sloučenin se vyskytují primární metabolity (sacharidy, aminokyseliny, bílkoviny, nukleové kyseliny, mastné kyseliny, steroidy, lipidy a organické kyseliny) a sekundární metabolity (alkaloidy, flavonoidy, taniny, saponiny, fytoosteroly, terpeny, srdeční glykosidy, vitaminy a éterické oleje). Sekundární metabolity plní v rostlině celou řadu funkcí: přispívají k vytvoření barvy, aroma a chuti, a primárně chrání rostliny proti škůdcům, patogenům, konkurenčním rostlinám, znečištění, stresu a ultrafialovému záření [17, 18]. Jsou považovány za biologicky aktivní látky a jsou známé svými biologickými vlastnostmi [17, 19, 20]. Anorganickými sloučeninami léčivých rostlin jsou hlavně minerální látky, které jsou důležité při biologických, chemických, metabolických procesech a enzymatických reakcích, které vedou k tvorbě aktivních organických látek rostlin. Makroprvky (N, P, Ca, Mg, K a S) jsou hlavními živinami rostlin [21, 22]. Mikroprvky (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, Co, Ni) jsou esenciální a podílejí se jednak na redoxních reakcích, elektronovém transferu a dalších důležitých metabolických procesech v rostlinách. Neesenciální prvky (Pb, Cd, Cr, Hg atd.) jsou pro rostliny potenciálně vysoce toxické. Nadměrné množství převážně Cd, Co, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb a Zn vede k inhibici růstu, fotosyntézy, buněčného dýchání, vývoje buněk, využití vody, metabolismu dusíku, způsobují poškození buněčné membrány, proteinů a DNA [23].

Levandule lékařská (Lavandula angustifolia)

Levandule obsahuje zejména sacharidy, v menším množství lipidy a bílkoviny, minerály, třísloviny, hořčiny, fytoosteroly, triterpenové kyseliny a fenolické sloučeniny (anthokyany, fenolické kyseliny, kumariny a flavonoidy) [24-26]. Obecně lze říci, že obsah makroprvků v levanduli je následující $K > Ca > Mg > Na$. Pro levanduli je charakteristický nízký obsah hořčiku a sodíku [24, 25]. Aktivní antioxidační složky levandule jsou 1,8-cineol, limonen, kyselina ferulová, rosmarýnová, *p*-kumarová, *o*-kumarová, *p*-hydroxybenzoová, protokatechová, sinapová, kávová, vanilová, chlorogenová, kvercetin, kumarin, 7-methoxykumarin a apigenin [27-29]. Levandule také obsahuje kyselinu glykolovou, valerovou, urnosovou a herniarin [25].

Měsíček lékařský (Calendula officinalis)

Měsíček obsahuje řadu chemických sloučenin: sacharidy, lipidy, aminokyseliny, organické kyseliny, taniny, karotenoidy, steroly, terpeny, flavonoidy, kumariny, quinony a éterické oleje. Hlavními antioxidačními složkami jsou fenolické kyseliny, flavonoidy, karotenoidy, tokoferoly a kumariny [30]. V květech a stoncích měsíčku byly identifikovány následující flavonoidy: kvercetin, isorhamnetin, isokvercetin, isorhamnetin-3-O- β -D-glykosid, narcissin, kalendoflasid, kalendoflavosid, kalendoflavobiosid, rutin, isoquercitrin, neohesperidosid, isorhamnetin-3-O-

neohesperidosid, isorhamnetin-3-O-2^G-rhamnosyl rutinoid, isorhamnetin-3-O-rutinoid, kvercetin-3-O-glucosid, isorhamnetin-3-O-(2"-acetyl)- β -D-glucopyranosid, isorhamnetin-3-O-(2",6"-diacetyl)- β -D-glucopyranosid, hesperidin, fisetin, kvercetin-3-O-rutinoid, myricetin, kaemferol, luteolin, apigenin a katechin [31, 32]. Chlorogenová, kávová, ferulová a rozmarýnová kyselina jsou hlavní identifikované fenolické kyseliny [33, 34]. V listech a stoncích měsíčku se nacházejí následující karotenoidy: neoxanthin, 9Z-neoxanthin, violaxanthin, luteoxanthin, 9Z-violaxanthin, 13Z-violaxanthin, antheraxanthin, mutatoxanthin epimer 1, mutatoxanthin epimer 2, lutein, 9/9' 2-lutein, α -kryptoxanthin, β -kryptoxanthin, β -karoten a z kumarinů hlavně skopoletin, umbelliferon a esculetin [35, 36]. V sušených květech měsíčku byl zjištěn obsah: Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Cr a stopové množství Co, Pb a Cd [37]. V ethanolových extraktech byl zjištěn obsah Na, Ca, Mg, K, Cu, Zn a Al. Mn, Fe, Cr, Pb a Cd nebyly v extraktech detekovány [38].

Třezalka tečkovaná (Hypericum perforatum)

Třezalka tečkovaná obsahuje několik skupin biologicky aktivních látek, mezi něž se řadí naftodiantrony (hypericin, pseudohypericin, isohypericin, protohypericin, protopseudohypericin), floroglucinoly (hyperfirin, adhyperfirin, hyperforin, adhyperforin), flavonoidy, xanthony, třísloviny, těkavé látky (např. α -pinen, β -pinen, limonen, α -terpineol, geraniol a (*E*)- β -ocimen), oligomerní prokyanidiny, dále antrachinonové deriváty, karotenoidy, aminokyseliny, mastné kyseliny, vitaminy (vitamin C, E), cholin, pektin, kumarin, sacharidy, organické kyseliny minerální látky a alkoholy s dlouhým řetězcem [39-44]. Hlavní aktivní sloučeniny třezalky jsou: hypericin, pseudohypericin, rutin, kvercetin a hyperforin. Hypericin (derivát anthrachinonu) se nachází v černých tečkách podél okvětních lístků, jedná se o vysoce fotoreaktivní barvivo zodpovědné za červené zbarvení oleje třezalky. Hyperforin je lipofilní derivát floroglucinolu, nestabilní v přítomnosti světla a kyslíku [39, 40, 45]. Z flavonoidů se vyskytuje hlavně hyperosid, rutin, isokvercitrin, kvercitrin, kvercetin, amentoflavon, luteolin, kaemferol, biapigenin a epigallokatechin gallát a z fenolických kyselin hlavně kyselina chlorogenová, neochlorogenová, kryptochlorogenová, kávová, ferulová, *p*-hydroxybenzoová, vanilová, rozmarýnová a *p*-kumarová [46, 47]. V třezalce tečkované byl také stanoven obsah tokoferolů, přičemž nejvíce zastoupen byl δ -tokoferol, dále γ - a α -tokoferol [48]. Bylo zjištěno, že v rostlině i v extraktech jsou obsaženy následující prvky: K, Mg, Mn, Pb, Zn, Co, Cr, Li, Ni, Na, Ca, Cu, Fe a Se [49, 50]. Mezi nejvíce zastoupené prvky patří: Ca, Mg, Al, Fe, Mn, Sr a Zn [51]. V třezalce a jejich čajích také byly kvantifikovány následující toxické prvky: Pb, Cd, Al, Ni, As, Sb a Ba [49, 52, 53].

Šalvěj muškátová (Salvia sclarea)

Šalvěj muškátová obsahuje hlavně terpeny, fenolické sloučeniny, taniny, tokoferoly a minerální látky. Z terpenů mají nejvyšší zastoupení linalool, linalool acetát, α -terpineol, limonen, sklareol, manool a salvipison [54-56]. Z fenolických sloučenin byly identifikovány následující: kyselina kávová, rozmarýnová, karnosová, kvercetin, luteolin, apigenin, diosmetin, rhamnetin, genkwanin a methylkarnosát. V extraktech šalvěje muškátové byl také zjištěn α - a γ -tokoferol [57]. Z minerálních látek byly kvantifikovány: Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, P, Pb, S, Ti a Zn. Nejvyšší zastoupení bylo K, S, Ca, Na a Mg a ve stopových množstvích byly zjištěny obsahy: As, Cd, Co, Hg, Li, Mo a Pb [58].

Meduňka lékařská (Melissa officinalis)

Listy meduňky obsahují flavonoidy (kvercitrin, rhamnocitin, luteolin), fenolické kyseliny, monoterpenoické aldehydy, monoterpenické glykosidy, triterpeny (ursolová a oleanová kyselina), seskviterpeny, chlorofyly, karotenoidy, vitamin C, saponiny, taniny, esenciální oleje a minerální látky [59-61]. Extrakty meduňky obsahují hydroxyskořicové kyseliny a flavonoidy: gallovou, chlorogenovou, metrilovou, kávovou, *m*-kumarovou, rozmarýnovou kyselinu, *p*-kumarovou, protokatechovou kyselinu, erio-dictyol-7-O-glukosid, naringin, hesperidin, naringenin, apigenin a hesperetin [59, 60]. Nejvíce účinnými antioxidačními složkami v esenciálním oleji jsou monoterpenické aldehydy a ketony (neral, geranial, citronellal, geranyl acetát, isomenthon a menthon) a mono- a seskviterpeny (β -karyofylen, β -karyofylen oxid), fenolické kyseliny a flavonoidy. V čerstvých a sušených listech meduňky byly zjištěny vyšší obsahy následujících minerálních látek: Al, Ca, Na, P, S a nižší obsahy Ag, B, Ba, Bi, Cd, Co, Mn, Ni, Pb, Sr, Tl, V a Zn. As a Se nebyly v sušených listech detekovány [53, 62].

Máta peprná (Mentha piperita)

Máta peprná obsahuje hlavně sacharidy, proteiny a uronové kyseliny. Ze sacharidů a jejich derivátů je zastoupena kyselina glukuronová, galakturonová, glukosa, galaktosa a arabinosa. Obsah mastných kyselin v nepolární frakci je zastoupen především kyselinou palmitovou, linolovou a linolenovou. Čerstvé listy máty peprné obsahují karotenoidy (lutein and β -karoten), chlorofyly, α - a γ -tokoferoly, vitamin C, fenolické sloučeniny, dále třísloviny, hořčiny, fytosteroly (β -sitosterol, daukosterol) a antrachinony (konkrétně emodin, aloe-emedin a chrysofanol) a betain [63]. Máta peprná obsahuje následující fenolické kyseliny: kyselinu kávovou, rozmarýnovou, protokatechovou, gallovou, vanilovou, syringovou, ferulovou, chlorogenovou, sinapovou, skořicovou, *p*-hydroxybenzoovou a *o*-kumarovou. Z flavonoidů jsou zastoupeny: luteolin, isorhoifolin, linarin, pebrellin, hesperidin, naringin, narirutin, rutin, katechin, epikatechin a kvercetin [64, 65]. Hlavní složkou esenciálního oleje je menthol, dále jsou zastoupeny: limonen, cineol, menthon, menthofuran, isomenthon, methyl acetát, isopulegol, pulegon a karvon [63, 66, 67]. Hlavní makroprvky nalezené v čerstvých a suchých listech máty peprné jsou Ca, Mg, Na, K a P; dále mikroprvky Cu, Fe, Mn, Zn, Al, B, Ba, Ni ve stopových množstvích byly zjištěny obsahy: Cr, I, Cd, Ag a Se [53, 68, 69].

Šalvěj lékařská (Salvia officinalis)

Mezi fytochemikálie obsažené v květech, listech a stoncích šalvěje lékařské patří sacharidy, proteiny, mastné kyseliny, deriváty glykosidů (např. glykosidy flavonoidů, saponiny), alkaloidy, fenolické sloučeniny (kumariny, flavonoidy, třísloviny), vitaminy, éterické oleje, steroidy, terpeny (mono až seskviterpeny), hořčiny, pryskyřice a vosky [70]. Ze sacharidů a jejich derivátů se v šalvěji nejčastěji vyskytuje arabinosa, galaktosa, glukosa, mannososa, xylosa, uronové kyseliny a rhamnosa [71]. V listech šalvěje lékařské byl stanoven vysoký obsah polynenasycených mastných kyselin (PUFA – Polyunsaturated fatty acids), dále mononenasycených mastných kyselin (MUFA – Monounsaturated Fatty acids) a nasycených mastných kyselin (SAFA – Saturated Fatty Acids). Z pohledu jednotlivých mastných kyselin (MK – mastná kyselina) byla nejvíce zastoupena α -linolenová, linolová, palmitová a gadoleová kyselina [72]. Hlavními

biologickými složkami esenciálního oleje šalvěže jsou monoterpeny (R-, β -thujon, kafr, 1,8-cineol, cineon a borneol), seskviterpeny (R-humulen a β -karyofylen) a v listech jsou nejvíce zastoupeny di a triterpeny. [73, 74]. Z fenolických látek jsou v šalvěži lékařské obsaženy fenolické kyseliny, flavonoidy a třísloviny. Jmenovitě např. kyselina kávová, chlorogenová, rozmarýnová, ferulová, karnosová, salvianová, ursolová, ellagová, epikatechin, epikatechin gallát, methyl karnosát, kvercetin, karnosol, rosmanol, rosmadial, epirosmanol, rutin a luteolin, 6-methoxygenkwannin, genkwannin, hispidulin a salviginin [71, 75, 76]. Také bylo zjištěno, že šalvěž obsahuje vitamin A, B₁, B₂, B₃ a C [77]. V listech sušené šalvěže lékařské byly zjištěny vyšší obsahy následujících minerálních látek: Ca, K, Mg, Na a P nižší obsahy Al, Ni, B, Ba, Cu, Fe, Mn, Sr, Zn, Co a Cr [53, 78]. V čerstvých květech šalvěže lékařské byly kvantifikovány následující minerály: Ca, K, Na, P, Mg, Fe, B, Zn, Cu a Cr [79].

Yzop lékařský (Hyssopus officinalis)

Yzop lékařský je bohatý na flavonoidy, fenolické kyseliny, těkavé látky, diterpenové laktony (marrubiin), dále obsahuje významné množství tříslovin, organické kyseliny, chlorofyly, karotenoidy, vitamin C, řadu minerálů a stopy pryskyřice [80]. Z flavonoidů jsou obsaženy apigenin, kvercetin, kvercitrin, isokvercitrin, katechin, acacetin, diosmin, luteolin a jejich glykosidy, z fenolických kyselin pak kyselina ferulová, gallová, gentisová, chlorogenová, kávová, *p*-hydroxybenzoová, *p*-kumarová, protokatechová, gentisová, rozmarýnová, syringová, kaftarová a vanilová [81, 82]. Esenciální olej yzopu obsahuje isopinokamfon, β -pinen, pinokarvon, karvakrol, α -elemol, karyofylen, *p*-cymen, mystenal, limonen a linalool [80, 83]. Obsah vitaminu C v rámci ontogeneze je v rozmezí 15–32 mg·100 g⁻¹, karotenoidů 12–30 mg·100 g⁻¹ a celkových chlorofylů 43–74 mg·100 g⁻¹ [83]. V sušených vzorcích yzopu lékařského se nachází xylosa, mannosy, glukosa, kyselina galakturonová a alginová. Yzop lékařský obsahuje 5–9 % lipidů. Zastoupení MK je následující: SAFA > MUFA > PUFA. Z mastných kyselin jsou zastoupeny: kyselina olejová, stearová, palmitová, linolová, linolenová a arachidonová [81]. Yzop obsahuje základní makroprvky Ca, K, Na, P, Mg dále také mikroprvky Fe, Cu, Zn a Mn [84]. Bylo také zjištěno, že yzop je schopen z půdy akumulovat P, Ca, Mg, Zn, Mn, Fe, As, Pb a Cd [85].

Jestřabina lékařská (Galega officinalis)

Jestřabina obsahuje sacharidy, mastné kyseliny, amikokyseliny, flavonoidy, taniny, deriváty guanidinu (galegin), saponiny, fytoosteroly (β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol), triterpeny (galegadiol, soyasapogenol) hořčiny, organické kyseliny, vitamin C, β -karoten, chlorofyly, minerály a alkaloidy [86-89]. Galegin je hlavní složkou, která je zodpovědná za antidiabetické účinky jestřabiny [90]. Z fenolických sloučenin jsou zastoupeny: ferulová, *p*-kumarová, salicylová, chlorogenová, kávová, vanilová, gallová kyselina, rutin, kvercetin, myricetin, naringin, kaemferol, genistein, apigenin a luteolin [91]. Flavonoidy, vitamin C, β -karoten a fytoosteroly jsou hlavní antioxidační látky jestřabiny [89, 91]. Hlavními MK jsou palmitová, linolová a linolenová kyselina [87]. Z organických kyselin je nejvíce zastoupena kyselina mléčná, octová a máselná. Jestřabina obsahuje následující makroprvky: P, K, Na, Ca, Mg a mikroprvky: B, Ni, Cu, Zn, Mn a Fe. V nati byly také ve stopovém množství detekovány Cr, Cd a Pb [92].

Ostropestřec mariánský (Silybum marianum)

Semena ostropestřce obsahují flavolignany, flavonoidy, aminy (histamin), esenciální oleje, mastné kyseliny, třísloviny, steroly (cholesterol, kampesterol, stigmasterol, sitosterol), tokoferoly a betain. Hlavními flavolignany jsou silymarin, silybin, v menším zastoupení jsou silychristin, silydianin, isosilychristin, isosilybin [93-95]. Nejvíce zastoupeným flavonoidem je taxifolin, dále je zastoupen apigenin, kvercetin, kaemferol, rutin a luteolin. Z fenolických kyselin kyselina protocatechová, kávová, *p*-kumarová, chlorogenová, ferulová, cichorová, cinarová a rozmarýnová [94, 96]. Sloučeniny silymarin a silybin mají antioxidační vlastnosti a mají pozitivní účinek na játra. Z MK jsou nejvíce zastoupeny kyselina linolová, olejová a palmitová. Hlavními těkavými látkami esenciálního oleje jsou γ -kadinen a α -pinen [97]. V esenciálním oleji ostropestřce byl kvantifikován také vysoký obsah α -tokoferolu, v menším zastoupení také β - a γ -tokoferol [98]. V extraktech ze semene byly zjištěny vyšší obsahy Ca, Mg, Na, P, S a K, a nižší obsahy Cu, Fe, Mn, Li a Cl [99, 100].

2.1.1 Pozitivní účinky léčivých rostlin

Fytochemikálie jsou zodpovědné za pozitivní vlastnosti léčivých rostlin. Řada studií byla provedena ke stanovení účinnosti těchto látek a pochopení základního mechanismu jejich působení. Studie byly zaměřeny na identifikaci, izolaci a stanovení biologické aktivity účinných složek rostlin *in vitro* nebo *in vivo* na pokusných zvířatech nebo pomocí epidemiologických a klinických studií u lidí [19, 101]. Fyziologické vlastnosti některých účinných látek jsou dobře prostudovány, další výzkum se zaměřuje na jejich možnou roli při prevenci a/nebo léčbě rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění, diabetu, vysokého krevního tlaku, popálenin a ztrátě zraku ve stáří [2, 3, 19, 102-104]. Bylo zjištěno, že jedna biologicky účinná sloučenina může mít jednu nebo více biologických funkcí. Přehled biologicky účinných látek rostlin a jejich konkrétní biologické funkce jsou uvedeny v Tab. 2.

Největší skupinou látek s antioxidačním účinkem v léčivých rostlinách jsou fenolické sloučeniny. Je známo více než 8 000 látek s fenolickou strukturou. Mezi fenolické sloučeniny se známou antioxidační aktivitou řadíme flavonoidy, taniny, chalkony, kumariny, fenolické kyseliny a stilbeny [105]. Kromě fenolických sloučenin jsou příkladem neenzymatických antioxidantů vitaminy C a E, glutathion, β -karoten a další karotenoidy. Dále některé prvky jako Cu, Fe, Mn, Zn a Se, které se vyskytují většinou vázané na proteiny nebo tvoří metaloenzymy, hlavně glutathion oxidasu (Se), katalasu (Fe), superoxid dismutasu (Cu, Zn a Mn); jsou důležité při ochraně buněk před volnými radikály [106].

Tab. 2: Biologicky aktivní látky léčivých rostlin [19]

Klasifikace	Skupiny sloučenin	Biologická funkce
polysacharidy	celulosa, hemicelulosa, gummy, slizy, pektiny, ligniny	ovlivňují vodní aktivitu, zpomalení absorpce živin, vázání toxinů a žlučových kyselin
antibakteriální, antifungální látky	terpeny, alkaloidy, fenolické sloučeniny	inhibitory mikroorganismů, redukuje riziko fungální infekce
antioxidanty	fenolické sloučeniny, flavonoidy, karotenoidy, tokoferol, kyselina askorbová, kumarin	zhášení volných kyslíkových radikálů, inhibice lipidové peroxidace
protirakovinné látky	karotenoidy, polyfenoly, flavonoidy, kurkumin	inhibitory nádorů, inhibují rozvoj rakoviny plic, antimetastatická aktivita
detoxikační látky	redukční kyseliny, tokoferoly, fenoly, indoly, aromatické isothiokyany, kumariny, flavony, karotenoidy, retinoidy, kyanáty, fytosteroly	inhibitory aktivace prokarcinogenu, induktory vazby drog na karcinogeny, inhibitory vzniku nádorů
ostatní sloučeniny	alkaloidy, terpeny, aromatické aktivní sloučeniny, biogenní aminy	neurofarmakologická činidla, antioxidanty, chemoprevence rakoviny

2.1.2 Aplikace léčivých rostlin do potravin

Běžně se LAKR přidávají jako přísady do nealkoholických a alkoholických nápojů, pečiva, sušenek, želé, čokoládových a dražé bonbonů. Dále se z nich vyrábí zmrzliny, bylinné čaje, kořenící, bylinné směsi a doplňky stravy. Vzhledem k jejich antioxidační a antimikrobiální aktivitě jsou také používány jako konzervační činidla, hrají důležitou roli při ochraně potravin a nápojů.

Levandule lékařská

Květy, pupeny i listy levandule jsou jedlé a často se používají jako chuťové nebo vonné ingredience při vaření pokrmů, pečení sušenek nebo přípravě desertů. Sušená levandule se přidává do čajových, kořenících směsí, nealkoholických a alkoholických nápojů. Z opylovaných květů levandule se také vyrábí med [107]. V potravinářském průmyslu se využívá levandulový esenciální olej při aromatizaci žvýkaček, cukrovinek, nealkoholických a alkoholických nápojů, zmrzlin, jemného pečiva, salsy, džemů, želé, sirupů, pudinků nebo do vývarů [25, 108]. Bylo zavedeno několik norem kvality týkajících se chemického profilu esenciálních olejů (EO – Essential oil) levandule: ISO 3515:2002 (EO *Lavandula angustifolia*), ISO 8902:2009 (EO *Lavandin Grosso*, francouzský typ), ISO 3054:2001 (EO *Lavandin Abrial*, francouzský typ), a ISO 4719:2012 (EO z levandule Spike) [109].

Měsíček lékařský

Čerstvé květy měsíčku lékařského se používají jako přísada do omelet, salátů, polévek, kari koření, pudinků, koláčů, nápojů a sýrů [110, 111]. Květy měsíčku byly ve středověku využívány jako přírodní barvivo do sýrů a másla [112]. Extrakty z měsíčku byly úspěšně aplikovány do melounových džusů [113] a sirupy do sušenek [114].

Třezalka tečkovaná

Třezalka tečkovaná a její preparáty našly uplatnění jako doplňky stravy ve formě tablet, kapslí, čajů, tinktur a extraktů [40, 113]. Využívá se jako barvivo a ochucovadlo. Dle nařízení (ES) č. 1334/2008 a prováděcích příloh 793/2012/ES a 872/2012/ES lze použít látky určené k aromatizaci potravin nebo složky potravin s aromatickými vlastnostmi vyrobené z třezalky tečkované pouze k aromatizaci alkoholických nápojů. Příloha II směrnice 88/388/ECC o látkách určených k aromatizaci nastavuje maximální hodnoty pro hypericin u alkoholických nápojů na $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [115]. Nálevy, alkoholické tinktury a extrakty třezalky se používají k ochucení a aromatizaci při výrobě hořkých toniků a likérů [40].

Šalvěj muškátová

Extrakty se široce využívají v potravinářském průmyslu jako aromatické přísady do nealkoholických a alkoholických nápojů, mražených mléčných výrobků, bonbónů, pečiva, želatiny, pudinků, koření a salátů. Běžně se z ní připravuje čaj [116].

Meduňka lékařská

Při výrobě potravinářských výrobků se používají čerstvé, sušené listy, extrakty nebo esenciální olej extrahovaný z listů meduňky. Meduňka lékařská se využívá jako ingredience ke stabilizaci a konzervaci nápojů a potravin, [117] dále jako hlavní ingredience do čajů, koření, nealkoholických a alkoholických nápojů, salátů, koláčů, desertů a jogurtů [118]. Esenciální olej a extrakty meduňky mohou být použity jako přírodní antioxidanty a konzervanty pro prodloužení trvanlivosti nápojů, koláčů a sýrů [113, 119, 120]. Extrakt rozmarýnu a meduňky lékařské řady Origanox, které uvedl na trh izraelský podnik Rad Natural Technologies, se používá ke konzervaci cukrovinek a jemného pečiva [121]. Sirupy a extrakty z meduňky byly úspěšně aplikovány do kysaných mléčných nápojů [122].

Máta peprná

Při výrobě potravinářských výrobků se používají čerstvé, sušené listy nebo esenciální olej extrahovaný z listů máty peprné, případně extrakty nebo jeho jednotlivé komponenty či deriváty. Z listů a stonků máty peprné se dělá čaj, přidává se do nápojů, jehněčího masa, zeleniny, omáček, salátů, pečiva, moučníků, želé, sirupů a zmrzliny. Používá se k výrobě alkoholického nápoje zvaného „Pepermintka“, „Zelená“ a je důležitou ingrediencí čaje Touareg. Mátové extrakty se v potravinářství používají k ochucení a aromatizaci cukrovinek, čokolády, bonbónů, žvýkaček a alkoholických i nealkoholických nápojů. Menthol se aplikuje při výrobě pastilek. Mátový olej lze použít k potlačení kvasinek, které kontaminují potraviny [63, 64]. Sirupy z máty peprné byly aplikovány na ochucení kysaných mléčných nápojů [122]. Extrakty z máty peprné byly využity

k přípravě nových limetkových nápojů [123] a také byly aplikovány pro zvýšení stability slunečnicového oleje během skladování [124].

Šalvěj lékařská

Šalvěj lékařská se používá jako běžná kulinární bylina především k aromatizaci, dále k ochucení např. omáček, masových nebo rybích pokrmů, vzhledem ke svému antimikrobiálnímu působení také jako přírodní konzervační činidlo. Může být přidávána do potravin za předpokladu, že koncentrace thujonů v konečném produktu nepřesahuje $0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [71, 125]. Esenciální olej z šalvěje se přidává do masa, klobásek, omáček, kuřecích náplní, ryb, polévek a konzerv. Lze využít do paštik a fermentovaných salámů jako antioxidant [126]. Ze studie, která se zaměřila na vliv esenciálního oleje šalvěje na zvýšení doby trvanlivosti pečárenských výrobků, vyplývá, že přídavek šalvěje významně snížil peroxidové číslo v porovnání s výrobky bez přídavku [127]. Hydrolát ze šalvěje lékařské, lze využít k výrobě nápojů s přírodními antibiotickými účinky při zažívacích potížích [128]. Extrakty šalvěje byly také použity k prodloužení trvanlivosti másla a olejů [129].

Yzop lékařský

Yzop lékařský se používá jako kulinářská nebo léčivá rostlina. Esenciální olej a extrakt yzopu se používají k aromatizaci a/nebo ochucení alkoholických likérů, čajů, toniků, masných výrobků, omáček a pochutin [130, 131]. I přes nahořklou chuť se využívá k dodání mátového *flavouru*. Listy yzopu se používají jako aromatické koření [81]. Yzop lze používat k aromatizaci čajových směsí do 5 % koncentrace [132]. Byl studován vliv přídavku yzopového esenciálního oleje (aplikována 0,02% max. sensoricky přijatelná koncentrace) na prodloužení trvanlivosti mletého hovězího masa. Bylo zjištěno, že yzop zabraňuje rozvoji nežádoucích sensorických změn (prodloužení přijatelnosti až o 3 dny) a inhibuje růst *Enterobacteriaceae* [133].

Jestřabina lékařská

Běžně je nazývána jako kozí tráva, vzhledem k jejímu tradičnímu použití ke krmení zvířat. Usušená se podává formou nálevu ke snižování hladiny cukru v krvi a působí také silně močopudně [88]. V potravinářském průmyslu nemá zatím velké využití. Extrakt z jestřabiny byl aplikován pouze do jogurtů [134].

Ostropestřec mariánský

Ostropestřec lze v potravinářském průmyslu využít v různých formách: ve formě celého semene nebo prášku, řezané byliny, práškové formě byliny, ve formě čajových sáčků, alkoholických extraktů, esenciálního oleje, kapsulí a měkkých gelů. Právě celá semena, esenciální olej a prášková forma semen se aplikují do doplňků stravy. Listy a mladé stonky se konzumují jako jedlá zelenina v arabských zemích, Sardinii a Španělsku. Ve Španělsku se listy přidávají do salátů, upravují vařením nebo fritují. Z opylovaných květů se také vyrábí med [135]. Ze semen se vyrábí olej, který se konzumuje za studena nebo se přidává do másla a sádla jako antioxidant v případě, že obsahuje 0,8 % silymarinu. Fermentovaná semena ostropestřce byla také aplikována pro zlepšení kvality pšeničného chleba [136]. Dalším produktem je mouka, která splňuje požadavky světové

zdravotnické organizace pro 2 až 5leté děti, avšak obsahuje nedostatek lyzinu, methioninu a cysteinu, které by mohly být doplněny z jiných zdrojů [137].

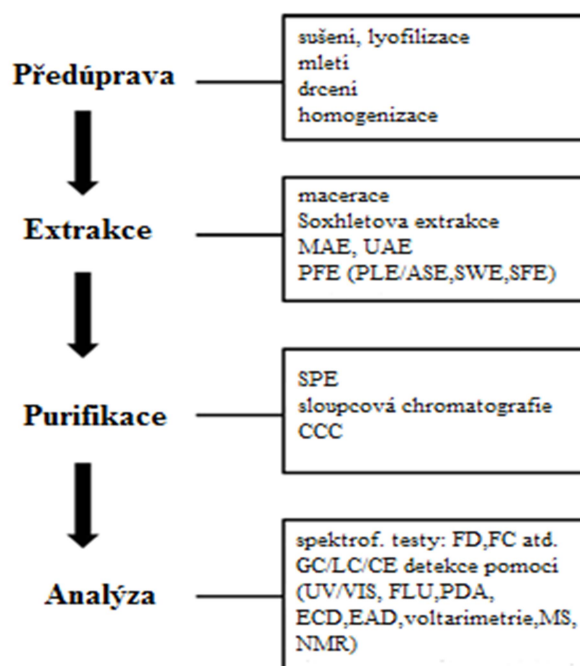
2.2 STANOVENÍ FENOLICKÝCH SLOUČENIN LÉČIVÝCH ROSTLIN

Vzhledem k tomu, že stěžejní část dizertační práce je zaměřena na stanovení fenolických sloučenin a minerálních látek, následující kapitoly jsou zaměřeny na přehled metod a instrumentálních technik využívaných pro jejich charakterizaci.

2.2.1 Příprava vzorku

Všeobecně není zavedena jednotná příprava vzorku pro stanovení fenolických sloučenin léčivých rostlin. Proto je vhodné volit optimální způsob předběžného zpracování podle chemické struktury a vlastností stanovované sloučeniny. Příprava vzorku pro stanovení fenolických sloučenin závisí především na povaze matrice vzorku, chemických vlastnostech fenolických látek, včetně molekulární struktury, polaritě, koncentrace, počtu aromatických kruhů a hydroxylových skupin [13, 138]. Na Obr. 1 jsou znázorněny možnosti přípravy a charakterizace fenolických sloučenin rostlinných materiálů.

Důležitým aspektem při stanovení fenolických sloučenin je, zda se stanovení zaměřuje na cílové sloučeniny v jejich konjugované formě nebo na jejich aglykony. U rostlinných produktů, potravin a biologických materiálů se obvykle stanovuje obsah intaktních konjugátů, v případě stanovení aglykonů je nutná hydrolýza. Nejčastěji se používá acidická ($1\text{--}2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ HCl}$, 1 hod), bazická ($1\text{--}4 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaOH}$ 1–24 hod) nebo enzymatická hydrolýza (s využitím celulas, pektinas a amylas) [139, 140].



Obr. 1: Možnosti přípravy a charakterizace fenolických sloučenin rostlinných materiálů [141]

Zkratky: MAE – mikrovlnná extrakce; UAE – ultrazvuková extrakce; PFE – vysokotlaká extrakce; ASE – zrychlená extrakce rozpouštědly; SWE – subkritická vodní extrakce; SFE – superkritická fluidní extrakce; SPE – extrakce na tuhou fázi; CCC – protiproudá chromatografie; FD – Folin Denisova metoda; FC – Folin-Ciocalteuho metoda; GC – plynová chromatografie; LC – kapalinová chromatografie; FLU – fluorescence; PDA – detektor s fotodiodou; ECD – elektrochemický detektor; MS – hmotnostní spektrometrie; NMR – nukleární magnetická rezonance

2.2.2 Extrakční metody

Extrakce je prvním důležitým krokem při kvalitativním nebo kvantitativním stanovení fenolických sloučenin léčivých rostlin. V ideálním případě má být extrakční postup dostatečně účinný pro extrakci chemických látek, které mají být separovány a charakterizovány. Rychlý, jednoduchý, levný, vhodný pro rutinní analýzu, a také vhodný pro automatizaci. Parametry, které ovlivňují výtěžnost extrakce, jsou: doba extrakce, teplota, pH, poměr rozpouštědla a vzorku, počet opakování extrakcí a typ rozpouštědla [138, 142, 143]. Všeobecně se nedoporučuje dlouhá doba a zvýšená teplota při extrakci, vzhledem k tomu, že může docházet k degradaci nebo enzymatické oxidaci fenolických látek [13, 138].

K tomuto účelu se používá řada klasických i moderních extrakčních metod. Ke klasickým extrakčním postupům řadíme maceraci nebo extrakci pomocí Soxhletova extraktoru. K moderním technikám patří superkritická fluidní extrakce (SFE – Supercritical Fluid Extraction), subkritická vodní extrakce (SWE – Subcritical Water Extraction), mikrovlnná extrakce (MAE – Microwave Assisted Extraction), vakuová mikrovlnná extrakce (VMAE – Vacuum Microwave-Assisted Extraction), vysokotlaká extrakce (HPE – High Pressure Extraction), mikroextrakce na tuhou fázi (SPME – Solid Phase Microextraction), extrakce pomocí pulzních polí (PEF – Pulse Electric Field Assisted Extraction), enzymaticky asistovaná extrakce (EAE – Enzyme Assisted Extraction), zrychlená extrakce rozpouštědly (ASE – Accelerated Solvent Extraction) a sekvenční alkalická extrakce (SAE – Sekvence Alkaline Extraction) [13, 138, 140]. Moderní extrakční techniky mají značné výhody oproti konvenčním způsobům přípravy vzorků, např. snížení spotřeby organických rozpouštědel, snížení degradace složek, zvýšení účinnosti extrakce, selektivity, zrychlení procesu a snadná automatizace [13, 138]. Tab. 3, 4 a 5 přehledně shrnují výhody a nevýhody metod.

Z Tab. 3 je zřejmé, že z konvenčních metod má pro extrakci fenolických sloučenin značné výhody dynamická macerace, která je také jednou z nejpoužívanějších konvenčních metod pro výzkum i průmyslové aplikace vzhledem k její jednoduchosti provedení a minimálním finančním prostředkům.

V rámci moderních metod pak mají značné výhody pro aplikaci ve výzkumu a potravinářském průmyslu SFE a SWE. SFE je dokonce považována za nejvhodnější způsob výroby přírodních antioxidantů pro použití v potravinářském průmyslu, vzhledem k tomu, že je citlivá vůči životnímu prostředí. Naopak SWE je použitelná pouze pro výzkumné aktivity, nikoli do průmyslu, protože zařízení pro velké objemy by mělo velké nároky na těsnění a bezpečnost. Obě extrakční metody však mají vyšší vstupní a provozní náklady.

V rámci předložené práce jsme se proto rozhodli pro levnější variantu aplikace dynamické extrakce rozpouštědly pro extrakci léčivých rostlin.

Tab. 3: Přehled výhod a nevýhod konvenčních extrakčních metod

Metoda	Princip	Výhody	Nevýhody	Rozpouštědla	Zdroj
Statická macerace	Extrakce rozpouštědlem bez míchání	Jednoduchá Levná	Neúplná extrakce Remacerace Dlouhá doba (5–14 dní)	Voda, methanol, ethanol, propanol, aceton, acetonitril, ethylacetát, dimethylsulfoxid a jejich směsi s vodou iontové kapaliny	[13, 138, 142, 144-146]
Dynamická macerace	Extrakce rozpouštědlem s mícháním	Jednoduchá Levná Kratší doba než u statické (1–12 hodin)	Použití organických rozpouštědel, nutné nakládat s odpady		
Turboextrakce	Extrakce rozpouštědlem s mícháním o vysokých otáčkách	Jednoduchá Levná Redukce velikosti částic	Desintegrace buněk Rozklad sloučenin Problémy při filtraci		
Soxhletova extrakce	Extrakce za využití Soxhletova extraktoru	Opakovaný kontakt byliny s čerstvým rozpouštědlem Není potřeba filtrace po extrakci	Dlouhá doba extrakce Rozklad sloučenin Velká spotřeba rozpouštědel Nemožnost míchání Nutné zakoncentrování	Voda, methanol, ethanol, acetonitril	[13, 138]
Soxtec	Automatická Soxhletova extrakce	Nižší spotřeba rozpouštědel a kratší čas než u Soxhletovy extrakce	Rozklad sloučenin Nutné zakoncentrování		[138]

Tab. 4: Přehled výhod a nevýhod moderních extrakčních metod

Metoda	Princip	Výhody	Nevýhody	Rozpouštědla	Zdroj
UAE	Extrakce rozpouštědly využívající ultrazvukové energie, s frekvencí mezi 20 až 100 kHz	Vysoká efektivita extrakce, jednoduchá, levná, časová nenáročnost	Změna a rozklad sloučenin, tvorba volných radikálů	Voda, methanol, ethanol, butanol, aceton, ethylacetát	[147, 148]
SFE	Extrakce využívající nadkritický CO ₂	Krátká doba extrakce (do 30 minut) nedochází k degradaci tepelně labilních složek použití bezpečného netoxického CO ₂	Vstupní náklady na zařízení vysoké	Nadkritický CO ₂ s modifikátorem (ethanol, methanol, acetonitril, kaprylová kyselina nebo ester kyseliny kaprylové)	[13, 111, 149-151]
SWE	Extrakce využívající nadkritickou vodu	Krátká doba extrakce (do 30 minut) Extrakce polárních, nepolárních sloučenin citlivá k životnímu prostředí, nižší spotřeba rozpouštědla	Vstupní náklady na zařízení vysoké Omezení aplikace v potravinářském průmyslu	Voda	[76, 152]
MAE	Extrakce rozpouštědly využívající mikrovlnnou energii	Krátká doba extrakce (do 30 minut) Nižší spotřeba rozpouštědel	Omezení pro extrakci termostabilních sloučenin Omezení použití pouze na fenolické kyseliny Rozklad a oxidace	Polární rozpouštědla (voda, methanol, ethanol), nepolární rozpouštědla neabsorbují mikrovlnnou energii	[13, 153].
VMAE	Mikrovlnná extrakce rozpouštědly prováděná ve vakuovém systému	Krátká doba extrakce (do 30 minut) Nedochází k rozkladu a oxidaci sloučenin	Speciální zařízení na extrakci Náklady na zařízení	Polární rozpouštědla (voda, methanol, ethanol)	[154]

Tab 5: Přehled výhod a nevýhod moderních extrakčních metod - pokračování

Metoda	Princip	Výhody	Nevýhody	Rozpouštědla	Zdroj
HPE	Extrakce rozpouštědly za vysokých tlaků 10–1 000 MPa	Úspora energie bezpečnost provedení Nedochází k rozkladu sloučenin	Speciální zařízení Náklady na zařízení vysoké	Methanol, ethanol, destilovaná voda, CO ₂	[139, 149]
SPME	Sorpce složek vzorku na stacionární fázi pokrývající křemenné vlákno, desorpce v nástřikovém portu plynového chromatografu	Jednoduchá, rychlá, Bez rozpouštědel	Náklady na SPME vlákna Aplikace s plynovou chromatografií	Bez rozpouštědel	[155]
PEF	Extrakce pomocí pulzních polí o elektrické intenzitě 0,5–3 kV/cm a trvání 1–400 μS	Rychlá Netepelná Vysoce účinná metoda pro extrakci intracelulárních látek	Náklady na zařízení	Ethylacetát	[156, 157]
EAE	Extrakce rostlinných materiálů s přídavkem amylas, pektinas, celulas a hemicelulas	Jednoduchá, environmentálně šetrná metoda	Náklady na enzymy	Polární rozpouštědla s přídavkem amylas, celulas, hemicelulas, pektinas	[158, 159]
ASE	Extrakce rozpouštědly v dusíkové atmosféře při vysoké teplotě a tlaku	Snížení spotřeby rozpouštědel Kratší doba extrakce	Náklady na zařízení	Polární rozpouštědla	[13, 138]
SAE	Extrakce rozpouštědly následovaná alkalickou extrakcí v dusíkové atmosféře	Použití k extrakci volných a vázaných fenolických sloučenin	Velká spotřeba chemikálií	Polární rozpouštědla, hydrolýza pomocí NaOH a HCl	[138]

2.2.3 Purifikační a izolační metody

Některé extrakční techniky (Soxhletova extrakce, MAE nebo HPE), mají často za následek neselektivní koextrakce a relativně velké množství nežádoucích složek (např. lipidů, sterolů, chlorofylů atd.), které mohou ovlivnit separaci a následnou chromatografickou detekci; proto je vhodné zařadit purifikační metody, mezi které řadíme extrakci na tuhou fázi (SPE – Solid Phase Extraction), extrakci disperzní tuhou fází (MSPD – Matrix Solid Phase Dispersion), sloupcovou chromatografii a protiproudou chromatografii (CCC – Counter Current Chromatography) [138].

SPE je založena na kationtové nebo aniontové výměně. Využívá se k čištění zejména rostlinných materiálů s vysokým obsahem vody nebo jejich výtažků. Nejčastěji používané materiály k purifikaci polyfenolů jsou Sephadex LH-20, silikagel, polyamid, Amberlite, styren-divinylbenzen (XAD 4, XAD16, EXA-90, EXA 118, SP70) a akrylové pryskyřice. Výhodou této metody je možnost přímého spojení s kapalinovou chromatografií [138, 139].

MSPD se skládá z více kroků prováděných v jednom procesu: homogenizace matrice s fází oxidu křemičitého, narušení buněk, extrakce a purifikace. Výhodou této metody je, že je levná, dochází k omezené spotřebě organických rozpouštědel, probíhá za mírných extrakčních podmínek a je možná purifikace a extrakce v jednom kroku [138, 160-162].

Sloupcová chromatografie se používá k frakcionaci fenolických látek. Je to časově náročná metoda, která vyžaduje větší spotřebu rozpouštědel, ale poskytuje větší množství frakcí pro následnou izolaci a identifikaci. Nejčastěji používané sorbenty jsou RP-C18, Toyopearl, LH-20 a polyamidové pryskyřice. K eluci se běžně využívají ethanol, methanol, aceton, destilovaná voda a směsi rozpouštědel s vodou [139].

CCC je založena na rozdělování vzorku mezi dvě nemísitelná rozpouštědla, je to alternativní kapalinová chromatografická metoda pro frakcionaci vzorků bez použití pevné fáze [139]. Tab. 6 ukazuje přehled aplikací na vzorky léčivých rostlin.

Tab. 6: Aplikace purifikačních metod na vzorky léčivých rostlin

Rostlinná matrice	Metoda	Fenolické sloučeniny	Zdroj
Meduňka lékařská	SPE	fenolické kyseliny	[163]
Třezalka tečkovaná	SPE	flavonoidy a fenolické kyseliny	[164]
Léčivé rostliny	SPE	isoflavony	[138]
Meduňka lékařská	MSPD	fenolické kyseliny	[165]
Máta peprná	MSPD	fenolické kyseliny	[138]
Třezalka tečkovaná	CCC	flavonoidy	[166]

2.3 INSTRUMENTÁLNÍ TECHNIKY VHODNÉ PRO STANOVENÍ FENOLICKÝCH SLOUČENIN

Volba správné strategie pro studium fenolických sloučenin v rostlinných materiálech závisí na účelu studie, povaze vzorku a analytu. Testy používané pro stanovení fenolických látek jsou obvykle klasifikovány na testy pro stanovení celkového obsahu fenolických látek, nebo pro stanovení specifických fenolických skupin nebo konkrétních sloučenin. Kvantifikace fenolických látek v rostlinném extraktu je ovlivněna chemickou povahou analytu, použitou metodou, výběrem standardů a přítomností interferujících látek [139].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie a plynová chromatografie, příp. jejich kombinace s hmotnostní spektrometrií, jsou nejvíce používané metody pro kvantifikaci konkrétních fenolických sloučenin. Pro sledování celkových obsahů fenolických sloučenin se používá ultrafialová viditelná spektroskopie [138, 139].

2.3.1 UV-VIS spektroskopie

UV-VIS spektroskopie (UV-VIS – UltraViolet-Visible Spectroscopy) je založena na absorpci elektromagnetického záření v rozsahu vlnových délek 200–400 nm (UV oblast) a 400–800 nm (VIS oblast) molekulami vzorku. Je to jedna z jednoduchých technik pro kvantifikaci fenolických sloučenin, u níž jsou nízké finanční náklady na provedení experimentu (i když vstupní investice, cena specializovaných zařízení, je poměrně vysoká). Jedná se o rychlou, nedestruktivní metodu, která nevyžaduje náročnou přípravu vzorku. Spektrofotometrické testy poskytují jednoduché a rychlé screeningové metody na kvantifikaci fenolických sloučenin. Nicméně vzhledem ke složitosti rostlinných fenolických látek a jejich různé reaktivitě se zkušebními činidly, se používá velké množství testů, které často nelze porovnat [138, 139]. V případě analýzy léčivých rostlin se využívá ke kvantifikaci celkového obsahu fenolických látek, flavonoidů, proanthokyanidinů, anthokyanů a hydrolyzovaných taninů.

2.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) představuje nejpobulárnější a nejspolehlivější techniku pro stanovení fenolických látek a to převážně anthokyanů, proanthokyanidinů, hydrolyzovaných taninů, flavonolů, flavan-3-olů, flavanonů, flavonů a fenolických kyselin. Má mnoho výhod, jako je vysoká citlivost, reprodukovatelnost, dobrá separační účinnost, linearita, schopnost stanovit více složek najednou společně s jejich deriváty nebo rozkladnými produkty, a snadnost automatizace [138, 167].

Při samotné separaci fenolických látek se aplikuje hlavně kapalinová chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC – Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography), při níž se využívají kolony s nepolární stacionární fází, nejčastěji silikagel s chemicky vázanou uhlíkovou skupinou C18; kolony o délce 10–30 cm, o vnitřním průměru 3,9–4,6 mm a velikosti částic 3–10 μm . Nicméně u pokročilejších HPLC technik, jako je ultra-účinná kapalinová chromatografie (UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography) a dvourozměrná kapalinová chromatografie (2-D LC – Two Dimension Liquid Chromatography), se k detekci fenolických sloučenin používají i nové kolony (monolitické nebo kolony s povrchově porézními částicemi) o délce 3–25 cm, vnitřních průměrech 1–4,6 mm a velikosti částic 1,7–10 μm [138, 139].

Mobilní fáze (MP – Mobile Phase) jsou polární, využívá se hlavně methanol a acetonitril. V některých případech byly použity i ethanol, tetrahydrofuran a propan-2-ol. Je možná isokratická i gradientová eluce, gradientová je preferovanější. Volba MP závisí na počtu a typu stanovovaných látek a povaze matrice. Doporučuje se pH mobilní fáze udržovat v rozmezí pH 2–4, aby se zabránilo ionizaci fenolických látek a při identifikaci chvostování píků. Za tímto účelem se k MP přidává malé množství kyseliny octové, mravenčí, fosforečné, trichloroctové, chloristé, příp. fosfátový, citrátový pufr nebo octan amonný [138, 139, 167].

K detekci fenolických látek se využívají zejména UV detektory, detektory s diodovým polem (DAD – Diode Array Detector), detektor s fotodiodou (PDA – Phodiode Array Detector) lze ale také použít elektrochemický detektor, fluorimetrický detektor, hmotnostní spektrometr (MS – Mass Spectrometry) a nukleární magnetickou rezonanci (NMR – Nuclear Magnetic Resonance). NMR a MS detekce se používají především k identifikaci fenolických sloučenin. HPLC-MS (High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry) je oproti HPLC s UV detekcí vhodnější technika s vysokou účinností separace a možností pro identifikaci složek bylin, zejména pro mikro a stopové analýzy. Nejčastěji využívanými ionizačními technikami jsou elektrosprej (ESI – Electro Spray Ionization) a ionizace urychlenými atomy (FAB – Fast Atom Bombardment). Novými moderními metodami při stanovení fenolických sloučenin jsou HPLC s využitím hydrofilních kolon (HILIC – Hydrophilic Interaction Chromatography) a 2-D LC. HILIC se ukázala být užitečná při analýze polárních komponentů ve složitých maticích. 2-D LC umožňuje separaci a identifikaci látek s podobnou strukturou, vč. minoritních složek z komplexních matic. 2D-LC s využitím HILIC kolon a 2D-LC s využitím kolon s RP byla použita k detekci polárních a semi-polárních frakcí u vzorků tradiční čínské medicíny [138, 139, 167].

V současnosti lze najít řadu studií zaměřených na identifikaci a kvantifikaci fenolických sloučenin pomocí HPLC ve vzorcích levandule [28, 168, 169], měsíčku [32, 170-172], třezalky [169, 170, 173-176], šalvěže muškátové [57, 177], meduňky [169, 178-182], máty [35, 183-187], šalvěže lékařské [169, 170, 188-192], yzopu [82, 193], jeřábiny [194] a ostropestřce [97, 195-197] se začínou variabilitou extrakčních podmínek, použitých kolon, mobilních fází a experimentálních podmínek. V Tab. 7 jsou uvedeny nejnovější studie s důrazem na studované matrice.

Tab. 7: Aplikace HPLC na studované vzorky léčivých rostlin

Matrice	Extrakce	Kolona	Mobilní fáze	Detekce	Zdroj
Sušená levandule	70% ethanol macerace	Eclipse XDB-C18 (150 × 4,6 mm, 5 μm)	A) 1% octová B) acetonitril 1 ml·min ⁻¹ , gradient	DAD 280, 320, 370 nm	[198]
Sušená máta	methanol macerace	Eclipse XDB-C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)	A) 1% mravenčí B) methanol 1 ml·min ⁻¹ , gradient	PDA 280, 320 nm	[187]
Sušená šalvej, měsíček, třezalka	methanol macerace	Phenomenex C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)	A) 1% mravenčí B) 1% mravenčí v acetonitrilu 1 ml·min ⁻¹ , gradient	DAD 260, 280, 320 nm	[170]
Sušená meduňka	70% methanol, macerace, UAE	Nucleosil 100 C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)	A) 1% octová B) acetonitril C) methanol 1,3 ml·min ⁻¹ , gradient	DAD 260, 270, 280, 320, 330 nm	[179]
Sušený yzop	70% ethanol UAE	Zorbax SB-C18 (100 × 3 mm, 5 μm)	A) 0,1% mravenčí B) methanol 1 ml·min ⁻¹ , gradient	DAD 330, 370 nm	[82]

2.3.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC – Gas Chromatography) se široce používá pro separaci, identifikaci a kvantifikaci fenolických kyselin, flavonoidů a kondenzovaných taninů. Největším problémem při GC analýze je, že fenolické sloučeniny mají nízkou těkavost. Při jejich kvantifikaci v potravinách jsou jednak nutné čisticí postupy k odstranění lipidů z extraktu, dále uvolnění fenolických látek z jejich glykosidů a esterů za použití enzymatické, alkalické nebo kyselé hydrolyzy, a transformace fenolických sloučenin na těkavější deriváty. K vytvoření methyl a ethylesterů fenolických sloučenin se používá řada činidel: methyl-chlorformiát, diazomethan a dimethylsulfoxid v kombinaci s methyljodičnanem; k vytvoření trimethylsilyl derivátů se používají: trifluoroacetymid, N-(terc-butyl-dimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamid [138, 139].

Trimethylsilylová činidla mají značné výhody, protože poskytují vysoce těkavé sloučeniny a při reakci nedochází k tvorbě nežádoucích vedlejších produktů. Pro GC analýzu se nejčastěji používají křemenné kapilární kolony o délce 30 m s vnitřním průměrem 25–32 μm a s vrstvou filmu 0,25 μm . Existují však i výjimky, kdy byly použity kolony o délce 15 m s vrstvou filmu 10 μm . Nejčastěji se k detekci fenolických sloučenin používá plamenově ionizační detektor (FID – Flame Ionization Detector) a hmotnostní spektrometrie. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS – Gas Chromatography Mass Spectrometry) je ideální nástroj pro identifikaci fenolických sloučenin s vysokou citlivostí a selektivitou [138, 139].

Z publikovaných prací lze uvést např. práci Proestos a Komaitis [182], kteří použili GC-MS pro identifikaci fenolických sloučenin u meduňky, dobromysli a eukalyptu. Chu a kol. [138] vyvinuli rychlou metodu pro derivatizaci fenolických kyselin za použití mikrovlňného ozařování, GC-MS použili k identifikaci. Proestos a kol. [199] optimalizovali derivatizační proces pro identifikaci fenolických sloučenin pomocí GC-MS u pěti vybraných aromatických rostlin.

2.3.4 Další instrumentální techniky

Kapilární elektroforéza (CE – Capillar Electrophoresis) je vysoce rozlišovací technika vhodná k identifikaci látek s nízkou a střední molekulovou hmotností. Výhodou této metody je použití velmi malého objemu vzorku i reagensů. Micelární elektrokinetická chromatografie, kapilární elektrochromatografie a kapilární zónová elektroforéza (CZE – Capillar Zone Electrophoresis) v kombinaci s UV detekcí, detekcí pomocí elektrochromatografie a hmotnostní spektrometrie se používají nejčastěji [138, 139]. Z relevantních prací lze uvést studie Helmja a kol. [200], kteří kvantifikovali fenolické sloučeniny u extraktů třezalky, studii Cao a kol. [201], kteří optimalizovali CZE pro stanovení sedmi fenolických kyselin ve třech druzích šalvěže a studii Roblové a kol. [202], kteří použili CZE ke klasifikaci produktů z máty.

Papírová chromatografie (PC – Paper Chromatography) a chromatografie na tenké vrstvě jsou méně využívané separační techniky ke stanovení fenolických sloučenin. PC byla použita k separaci a identifikaci fenolických sloučenin z čajových lístků [139].

Tenkovrstvá chromatografie (TLC – Thin Layer Chromatography) je výkonnější metoda pro stanovení fenolických sloučenin v surových rostlinných extraktech než PC. Výhodou této metody je nízká cena, rychlost a možnost detekce více látek najednou [138, 139]. Z publikovaných prací lze uvést studii Altana a kol. [203], kteří validovali TLC pro kvantifikaci rozmarýnové kyseliny u různých druhů šalvěže.

2.4 METODY VHODNÉ PRO STANOVENÍ FENOLICKÝCH LÁTEK

2.4.1 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Pro stanovení celkového obsahu fenolických látek (TPC – Total Phenolic Content) se používá řada metod, např. Folin-Denisova metoda, metoda Folin-Ciocalteuho, manganometrická titrace a kolorimetrické stanovení ze solí železa. Nejvíce preferována je Folin-Ciocalteuho (FC) metoda, která je založena na chemické reakci fenolických sloučenin s redukčním činidlem, které se skládá ze směsi wolframanu a molybdenanu ve vysoce zásaditém prostředí, při níž dochází k tvorbě modrého fosfomolybdenového/fosfowolframového komplexu s intenzivní absorbcí při vlnové délce 765 nm. Omezením metody je, že reagencie nereagují specificky jen s polyfenoly, ale např. také s aminy, proteiny, cukry a kyselinou askorbovou. Gallová kyselina je široce používaným standardem u této metody [138, 139, 204, 205].

2.4.2 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Spektrofotometrický test založený na tvorbě komplexu při reakci chloridu hlinitého s flavonoidy je nepoužívanější postup pro stanovení celkového obsahu flavonoidů (TFC – Total Flavonoid Content) u vzorků léčivých rostlin. Nejčastěji se používají dva následující postupy: při prvním postupu se ke vzorku přidává roztok $AlCl_3$ o koncentraci 2–10 % v přítomnosti kyseliny nebo roztoku octanu. Měření se provádí po 2 až 60 minutách po přidavku roztoku $AlCl_3$ při 404–430 nm. Jako standardy se používají kvercetin, rutin, kvercitrin, galangin, katechin. Při druhém postupu se vytváří komplex v přítomnosti $NaNO_2$ v alkalickém prostředí. Po přidání chloridu hlinitého se tvoří žlutý komplex, který se po přidání roztoku hydroxidu hlinitého mění na červeně zbarvený komplex. Měření se provádí při 510 nm a katechin se používá jako standard. Dále se pro stanovení flavonoidů využívá test založený na reakci 2-aminoethyl-difenylborátu s flavonoidy, při níž dochází k tvorbě žlutě zbarveného chelátu, měření absorpce se provádí při vlnové délce 404 nm, TFC je vztažen na rutin [206, 207].

2.4.3 Stanovení celkového obsahu anthokyanů

Nejčastější využívanou metodou pro zjištění celkového obsahu anthokyanů (TAC – Total Anthocyanin Content) je pH diferentní metoda, která je založena na změně absorpčního spektra anthokyanů při změně pH. Měří se změna absorpce při pH 1 a 4,5 při vlnových délkách 510 nm a 700 nm. Při pH 1 převažuje barevná oxoniová forma a při pH 4,5 bezbarvá hemiketalová forma. TAC se vztahuje na nejvíce dominantní anthokyanin ve vzorku, nejčastěji na kyanidin-3-glukosid, malvidin-3-glukosid a pelargonidin-3-glukosid. Metoda umožňuje rychlé a přesné stanovení celkových monomerních pigmentů a to i za přítomnosti polymerních, degradovaných pigmentů a dalších rušivých sloučenin [208].

2.4.4 Stanovení celkového obsahu proanthokyanidinů

Různé kolorimetrické metody se používají k měření celkového obsahu proanthokyanidinů. Vanilinový test je založen na kondenzaci resorcin nebo floroglucin dílčích struktur flavanolu s vanilinem v kyselém prostředí. Sleduje se absorpce při 500 nebo 550 nm [209]. Katechin se často používá jako standard.

U dimethylaminocinnamaldehydového (DMCA – Dimethylaminocinnamaldehyd) testu se používá obdobný mechanismus jako v případě vanilinového testu – terminální jednotky proanthokyanidinů reagují s DMCA. Tyto metody poskytují informace o stupni polymerace a hydroxylace a stereometrie flavan-3-olových podjednotek [138]. Metody jsou citlivé na struktury analytů, i na vnější faktory jako je teplota, doprovodné látky, rozpouštědla, přítomnost oxidačních činidel atd. Pro minimalizaci rušivých vlivů a k získání reprodukovatelných výsledků se ukázalo být užitečné čištění proanthokyanidinů před kvantifikací [139]. Přesto jsou tyto metody omezeny v důsledku nízkého výtěžku a/nebo tvorby vedlejších reakčních produktů.

V poslední době byl zaveden tzv. methyl celulosový srážecí test. Při tomto testu se proanthokyanidiny vysráží ze vzorku tím, že vytvoří nerozpustný polymer-taninový komplex s methyl celulosou a jejich koncentrace se stanoví odečtením obsahu fenolických látek ve vzorku měřením absorbance při 280 nm před a po ošetření methyl celulosou [138, 139]. Používá se také metoda s využitím hovězího sérového albuminu, při níž se nerozpustný tannin-proteinový komplex vysráží po přidání hovězího sérového albuminu. Komplex se poté rozpustí v alkalickém roztoku dodecylsírany sodného a triethanolaminu a nechá se následně zreagovat s roztokem chloridu železitého za vzniku fialového komplexu s maximální absorbancí při 510 nm [138].

2.4.5 Stanovení celkového obsahu hydrolyzovaných taninů

Hydrolyzované taniny se kvantifikují pomocí řady metod: za použití jodičnanu draselného, rhodanidu nebo dusitanu sodného; z nichž metoda za použití jodičnanu draselného je nejvíce používána. Je založena na reakci methylesteru galátu s jodičnanem draselným za vzniku červeného chromoforu s maximální absorbancí při 500 nm a 550 nm [138, 139]. Rhodanidová metoda se používá pro zjištění obsahu gallotaninů ve vzorku, při ní se testuje obsah gallové kyseliny kyselou hydrolyzou za anaerobních podmínek, aby bylo zabráněno oxidaci. Test s použitím dusitanu sodného se používá pro kvantifikaci kyseliny ellagové ve vzorku hydrolyzátu. Tento test však vyžaduje velké množství pyridinu, který představuje riziko toxicity [139].

2.5 INSTRUMENTÁLNÍ TECHNIKY VHODNÉ PRO STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

Vzhledem k tomu, že fenolické sloučeniny LAKR mají antioxidační potenciál, často se testuje spolu s TPC a TFC i antioxidační aktivita těchto sloučenin; ke stanovení antioxidační aktivity se používá velké množství metod. Jejich rozmanitost vyplývá z faktu, že nízkomolekulární antioxidyanty mohou působit různými mechanismy. Jedná se o přímou reakci s radikály, nebo reakci s přechodnými kovy. Nejčastěji využívanými instrumentálními technikami jsou UV-VIS spektroskopie a elektronová paramagnetická rezonance, ojediněle se využívá cyklická voltametrie, fluorimetrie a HPLC [210, 211].

2.5.1 UV-VIS spektroskopie

UV-VIS spektroskopie (viz kap. 2.3.1) je jednoduchá a rychlá technika pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Spektrofotometrické metody jsou založeny na reakci barevných roztoků radikálů, radikálových kationtů nebo komplexů s antioxidantem, který je schopen působit jako donor atomu vodíku [210].

2.5.2 Elektronová paramagnetická rezonance

Elektronová paramagnetická rezonance (EPR – Electron Paramagnetic Resonance) je založena na absorpci mikrovlnného záření částicemi s nepárovým elektronem v silném magnetickém poli [212]. Umožňuje kvalitativní a kvantitativní stanovení paramagnetických sloučenin a studium reakční kinetiky [213]. EPR se využívá jako nástroj ke kontrole stability/trvanlivosti potravin, k charakterizaci antioxidačních vlastností potravin [214-219] a příp. k detekci ozářených potravin [220-225]. Výhodou EPR při studiu antioxidačních vlastností oproti UV-VIS spektroskopii je, že monitoruje EPR signál radikálu i ve vzorcích, které jsou bezbarvé nebo zakalené a u nichž nedochází k interferenci s ostatními barevnými látkami v systému [208].

Citlivost EPR umožňuje studovat i radikálové meziprodukty s krátkou dobou života v chemických a biochemických systémech. Zředěné roztoky kapalin jsou častým objektem EPR studií. Přímá detekce volných radikálů v roztocích je možná pouze v případě, že se vyskytují ve vysoké koncentraci a mají dostatečnou stabilitu. Za tímto účelem se používají spinové značky, což jsou stabilní radikály přidávané záměrně do reakčního systému. Prostřednictvím sledování fyzikálně-chemických vlastností systému v přítomnosti spinové značky je možné určit různé kvalitativní i kvantitativní parametry reakčního systému, např. sledovat kinetiku radikálových reakcí. Volba spinové značky závisí na charakteru prostředí a vlastnostech reakčního systému. Při výběru vhodné spinové značky jsou důležitým kritériem strukturní vlastnosti spinových značek a jejich vliv na reaktivitu. Běžně se využívají např. deriváty kyseliny stearové, deriváty 3-karbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-N-oxylu (PROXYL), deriváty spinové značky 2,2,6,6-tetramethylpiperidinyln-N-oxylu (TEMPO), stabilní radikál 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) a kation-radikál 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonové kyseliny) (ABTS^{•+}) [208, 213].

Většina volných radikálů však má krátkou dobu života a vyskytují se ve velmi nízkých koncentracích, detekce u těchto systémů je limitována spodním prahem detekovatelnosti EPR spektroskopie (10^{-8} mol·dm⁻³). Hranice detekce lze v takových případech posunout pomocí metod nepřímé detekce, nejběžněji pomocí tzv. metody spinových lapačů. Metoda spinových lapačů („spin trapping“) je založena na transformaci kyslíkatých a organických radikálů s krátkou dobou života na spinové adukty, které se vyznačují delší dobou života [226, 227]. Sloučeniny, na něž se radikály adují, se nazývají spinové lapače („spin trapy“), nejčastěji na bázi nitronů, pyrolinoxidů nebo nitrososloučenin [208, 226, 227]. Běžně používanými spinovými lapači jsou: 5,5-dimethylpyrrolin N-oxid (DMPO), 5-tertbutoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxid (BMPO), 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxid (DEPMPO), α -(4-pyridyl N-oxid)-N-tert-butylnitron (POBN) a fenyl-tert-butylnitron (PBN) [208]. Z původně diamagnetických lapačů se stávají paramagnetické sloučeniny. Záchyt volných radikálů na spinové lapače v experimentálním systému se provádí prostřednictvím chemické reakce, tepelným rozkladem nebo fotochemickou excitací [214]. Analýza hodnot štěpících konstant a g-faktoru zachyceného spinového aduktu umožňuje následnou identifikaci zachyceného radikálu [208, 214].

2.6 METODY VHODNÉ PRO STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

Postupy hodnotící míru antioxidačního působení jsou založeny na různých principech. Obecně mohou být rozděleny na metody hodnotící schopnost eliminovat syntetické, kyslíkové radikály, metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace a na metody posuzující redoxní vlastnosti látek

[208, 211]. Testování antioxidační aktivity by nemělo být založeno pouze na jednom testovacím modelu. V praxi se k posouzení antioxidační aktivity vzorku používá vždy několik testů [228].

2.6.1 Metody založené na eliminaci syntetických radikálů

Metody jsou založeny na schopnosti vzorku vychytávat volné radikály, které mohou být v reakční směsi generovány přímo (chemickou reakcí nebo termicky) nebo záměrně do systému přidávány. Používají se syntetické radikály: \cdot DPPH, $\text{ABTS}^{+\cdot}$, TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl), $\text{DMPD}^{+\cdot}$ (N,N-dimethyl-p-fenylendiamin), galvinoxyl a Fremyho sůl [208, 211, 228].

\cdot DPPH test je založen na reakci stabilního 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikálu s donory vodíku (antioxidanty), při níž dochází k redukci syntetického radikálu za vzniku difenylpikrylhydrazinu DPPH-H [228-230]. Jedná se o rychlou, jednoduchou, levnou a široce používanou metodu pro posouzení celkové antioxidační aktivity (TAA – Total Antioxidant Activity) [231, 232]. \cdot DPPH test je citlivý na Lewisovy báze a polární rozpouštědla i na přítomnost kyslíku [232]. Lineární vztah mezi \cdot DPPH a $\text{ROO}\cdot$ platí jen v aprotickém rozpouštědle [205]. Není vhodný pro měření antioxidační aktivity plazmy, protože proteiny se srážejí v alkoholu, který se používá k jeho rozpouštění [232]. Nejčastěji je reakce pozorována spektrometricky při 515–530 nm [205, 230] výjimečně při 330 nm. Účinnost antioxidantu lze vyjádřit jako hodnotu IC nebo EC 50, určující koncentraci substrátu, která způsobuje 50% pokles absorbance (aktivity \cdot DPPH). Reakci lze sledovat i metodou EPR nebo HPLC. Detekce za použití HPLC je výhodná u barevných vzorků, které by mohly rušit spektrometrické stanovení. Aktivita směsných vzorků se někdy vztahuje na aktivitu kyseliny askorbové nebo Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylovou kyselinu). Jsou známé i aplikace \cdot DPPH testu na TLC, vhodné pro stanovení TAA směsných vzorků [211, 231, 232].

Metoda $\text{ABTS}^{+\cdot}$, označovaná také jako TEAC (TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), je jednou ze základních a nejpoužívanějších metod pro stanovení TAA. Metoda je založena na zhášení syntetického stabilního kation radikálu $\text{ABTS}^{+\cdot}$ v přítomnosti látek s antioxidačním potenciálem [210]. Výsledná antioxidační aktivita je srovnávána se standardní látkou Troloxem, butylhydroxytoluenem, rutinem, kyselinou askorbovou nebo gallovou kyselinou. V reakční směsi se kation-radikál $\text{ABTS}^{+\cdot}$ generuje oxidací ABTS. Používá se systém $\text{ABTS}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{peroxidasa}$ nebo $\text{ABTS}/\text{methmyoglobin}/\text{H}_2\text{O}_2$ [228, 229, 231]. Je však možná chemická oxidace pomocí anorganických oxidačních činidel, např. peroxodisíranu draselného [218, 219, 233, 234] nebo oxidu manganického [205, 210]. $\text{ABTS}^{+\cdot}$ má silný absorpční pás v rozsahu vlnových délek 600–750 nm, proto se zhášení $\text{ABTS}^{+\cdot}$ sleduje spektrofotometricky, nejčastěji se měří absorbance při maximu pásu 730 nm, nebo se reakce pozoruje s využitím EPR. Tato metoda je levná a snadno použitelná, rychlá, má široké uplatnění od hodnocení antioxidační aktivity látek různého původu až po směsné vzorky. Výhodou je, že není ovlivněna iontovou silou a umožňuje zjištění hydrofilních i lipofilních antioxidantů [233-235].

2.6.2 Metody založené na eliminaci kyslíkových radikálů

Mezi metody založené na eliminaci kyslíkových radikálů, tedy schopnosti vychytávat peroxylové, hydroxylové, superoxidové-anion radikály, se řadí metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), HORAC (Hydroxyl Radical Averting Capacity) metody založené

na vychytávání $\cdot\text{OH}$ radikálů, $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikálů, singletového kyslíku, H_2O_2 , metoda pro stanovení kyseliny chlorné a metody založené na odbarvování β -karotenu nebo krocínu [211].

ORAC test je založen na generaci peroxylových volných radikálů a měření poklesu fluorescence v přítomnosti antioxidantů. β -fykoerytrin se využívá ke sledování poklesu fluorescence, AAPH (2,2-azobis 2-amidopropan dihydrochlorid) ke generaci peroxylových radikálů a Trolox jako standard [210, 228]. β -fykoerytrin však má při stanovení antioxidační aktivity polyfenolů určitá omezení, vzhledem k jeho nižší fotostabilitě. Vhodnější je použití fluoresceinu, dichlorofluoresceinu, červeného pyrogallolu [205, 236]. Metodu lze použít ke stanovení jak hydrofilních (H-ORAC), tak i lipofilních antioxidantů (L-ORAC). Ke stanovení lze použít BODIPY 581/591 nebo BODIPY 665/676 jako fluorescenční sondu a AMVN (2,2-azobis-2,4-dimethylvaleronitril) jako lipofilní iniciátor peroxylových radikálů [236, 237].

Při metodách založených na vychytávání $\cdot\text{OH}$ radikálů jsou $\cdot\text{OH}$ radikály generovány Fentonovou reakcí, UV fotolýzou peroxidu vodíku, fotolýzou nebo termolýzou syntetických derivátů. Detekce je založena na vychytávání radikálů látkami, jejichž reakční produkty lze snadno stanovit. Antioxidanty vychytávající $\cdot\text{OH}$ snižují tvorbu těchto produktů. Jedním z možných postupů je vychytávání $\cdot\text{OH}$ salicylovou kyselinou. Vznikají hydroxylované produkty salicylové kyseliny, které lze detekovat pomocí HPLC s UV detekcí. Dále lze použít DMPO jako lapač $\cdot\text{OH}$ radikálů. Výsledný $\cdot\text{DMPO-OH}$ adukt lze detekovat pomocí EPR nebo HPLC s elektrochemickou detekcí. Další možností je vychytávání $\cdot\text{OH}$ deoxyribosou, jejíž degradační produkty jsou stanovovány reakcí s thiobarbiturovou kyselinou. Výhodou je možnost stanovit antioxidační i prooxidační vlastnosti látek [211, 213].

2.6.3 Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace

Rozsah lipidové peroxidace může být stanoven řadou metod, které lze rozdělit na ty, které měří primární produkty lipidové peroxidace, jako jsou hydroperoxydy, a ty, které měří sekundární štěpné produkty hydroperoxidů, jako jsou malondialdehyd, 4-hydroxynonenal a těkavé uhlovodíky. Na tomto principu je založeno velké množství metod: thiokyanátová metoda, stanovení uvolněného jódu, metoda rancimat, stanovení hydroperoxidů lipidů, konjugovaných dienů, uhlovodíků a cytotoxických uhlovodíků, stanovení TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances), metoda LPO-586 nebo stanovení hexanalů a příbuzných konečných produktů [205, 209].

TBARS test se používá pro kvantifikaci peroxidace lipidů. Metoda je založena na reakci thiobarbiturové kyseliny (TBA) s malondialdehydem (MDA), který je jedním z oxidačních produktů nenasycených lipidů. Za kyselých podmínek a při vysokých teplotách TBA a MDA reagují a tvoří růžové barevné adukty se silnou absorpcí při 532 nm a fluorescenční emisí při 553 nm. Nevýhodou této metody je, že nebere do úvahy kinetiku a stechiometrii reakce, další limitací je, že TBA reaguje i s dalšími sloučeninami, které se nepodílejí na lipidové peroxidaci a MDA reaguje s aminy za vzniku Schiffových bází, které mohou ovlivňovat odhad antioxidační aktivity [205, 238].

2.6.4 Metody založené na redukční schopnosti látek

Neenzymové antioxidanty jsou redukční činidla, která mohou redukovat radikály, a tím je inaktivovat. Proto se aktivita antioxidantů dá odhadnout i podle jejich redoxních vlastností. Řadíme sem hlavně metodu FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential), CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity), fosfomolybdenovou metodu a metodu stanovení redukující síly [208].

Metoda FRAP je založena na redukcí železitého komplexu (Fe^{3+} -(2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin – Fe^{3+} -TPTZ) antioxidanty přítomnými v systému na intenzivně modře zbarvenou železnatou formu Fe^{2+} -TPTZ. Nárůst absorpance při 593 nm, který odpovídá množství komplexu Fe^{2+} -TPTZ, je mírou antioxidační aktivity studovaného systému. Reakci lze sledovat spektrofotometricky. Nevýhodou této metody je, že stanovení probíhá při nefyziologické hodnotě pH (3,6), komplex nezachycuje pomalu reagující látky (polyfenoly, thioly, glutathion a proteiny) a navíc Fe^{2+} je jedním z produktů Fentonovy reakce [205, 229, 231].

2.7 PŘEHLED STUDIÍ FENOLICKÉHO PROFILU A ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY LÉČIVÝCH ROSTLIN

Studii zaměřených na sledování fenolického profilu studovaných léčivých rostlin je řada. Nejčastěji se komplexně studuje obsah celkových fenolických sloučenin, flavonoidů, taninů, anthokyanů pomocí UV-VIS spektrometrie a zároveň i kvantifikace a identifikace konkrétních fenolických kyselin a flavonoidů s využitím HPLC. Spolu s těmito parametry se zařazuje i stanovení antioxidační aktivity. Vzhledem k velkému množství publikací jsou v následujícím přehledu vybrány pouze některé nejnovější studie zaměřené na sledování více parametrů s důrazem na použité metody.

Adaszyńska-Skwirzyńska a Dziecioł [28] sledovali odrůdové rozdíly dvou kultivarů levandule. Byl sledován obsah TPC a TFC a konkrétní fenolické kyseliny a flavonoidy pomocí HPLC a UPLC u různých částí těchto rostlin. Nurzyńska-Wierdak a Zawisłak [239] studovali různé části levandule z hlediska fenolického profilu (TPC, TFC, TAC, obsah taninů), antioxidační aktivity (DPPH test) a obsahu esenciálního oleje. Zjistili pozitivní korelaci mezi TPC a TAA, TAA s obsahem esenciálního oleje, ale také negativní korelaci mezi TFC a TAA.

García-Risco a kol. [240] se zaměřili na porovnání SFE a UAE ethanových extraktů u vzorků měsíčku a meduňky. Testovali obsah TPC, TFC, obsah těkavých sloučenin pomocí GC-MS, a antioxidační (DPPH test) vlastnosti. UAE extrakty v 50% ethanolu měly vyšší obsah fenolických sloučenin a antioxidační aktivitu než SFE extrakty u obou bylin. Ashraf a kol. [241] komplexně prostudovali různé extrakty z měsíčku (80% methanol, ethyl acetát, hexan, chloroform, butanol), zaměřili se na následující parametry – TPC, TFC, antioxidační vlastnosti (DPPH, FRAP test), test procenta inhibice oxidace linolenové kyseliny a testy cytotoxicity. Nejlepší výtěžnosti v případě TPC a TFC byli u methanolových extraktů, nejnižší u hexanových.

Helmja a kol. [200] zjistili zásadní vliv geografické lokality na fenolický profil (TPC, TFC, konkrétních fenolických kyselin a flavonoidů), obsah těkavých sloučenin esenciálního oleje a minerálních látek u třezalky. Hernández-Saavedra a kol. [170] prostudovali komplexně čaje připravované z třezalky, měsíčku a šalvěje lékařské z hlediska obsahu TPC, TFC, obsahu fytoosterolů, saponinů, alkaloidů, obsahu těkavých sloučenin esenciálního oleje pomocí GC-MS, tak konkrétních fenolických sloučenin pomocí HPLC-DAD a HPLC-MS. Dále byl sledován

antioběžný a hypolipidemický efekt čajů. Studie naznačuje použití těchto čajů při alternativní léčbě kardiovaskulárního onemocnění souvisejícího s obezitou.

Safaei-Ghomi a kol. [56] se zaměřili na prostudování esenciálních olejů a methanolových extraktů z květů a listů šalvěje muškátové pocházející z Iránu s důrazem na TPC, antioxidační aktivitu (DPPH, β -karotenový test), obsah těkavých látek pomocí GC-MS a antimikrobiální aktivitu. Methanolové extrakty měly vyšší TAA než esenciální oleje připravované z květů a listů. Květy měly vyšší TAA než listy. Jeshvaghani a kol. [242] zaznamenali druhové rozdíly u různých vzorků šalvěje, mj. šalvěje muškátové a lékařské. Charakterizovali obsah TPC, antioxidační vlastnosti (DPPH, β -karotenový, FRAP test). Šalvěj lékařská měla vyšší TAA než šalvěj muškátová.

Duda a kol. [26] zjistili, že doba sklizně má zásadní vliv na fenolický profil (TPC, TFC, obsah konkrétních fenolických kyselin a flavonoidů) i antioxidační aktivitu (DPPH, FRAP test) u vzorků meduňky a levandule; u obou byly zaznamenány vyšší obsahy sledovaných parametrů v případě sklizně v průběhu květu. Kasparavičienė a kol. [243] sledovali vliv extrakčních podmínek na TPC a antioxidační aktivitu (DPPH test). Byly testovány dva extrakční systémy; voda, 50% ethanol, různá doba UAE extrakce (5, 10, 15 a 30 min) a poměr vzorku a rozpouštědla 1:10, 1:20 a 1:30. 50% ethanol byl účinnější než voda. Poměr 1:10 byl nejvhodnější u ethanolových a 1:30 u vodných extraktů. Nejvyšší TAA vykazovaly ethanolové extrakty s poměrem 1:10 při 15minutové extrakci.

Uribe a kol. [68] komplexně charakterizovali sušené vzorky máty, zaměřili se na sledování následujících parametrů: TPC, TFC, barevné charakteristiky, antioxidační vlastnosti (DPPH, ORAC test), vitamin C, obsah chlorofylů, cukrů a minerálních látek. Sarikurkcü a kol. [244] se zaměřili na charakterizaci ethanolových extraktů máty peprné z hlediska fenolického zastoupení (TPC, TFC, celkových flavonolů), obsahu saponinů, antioxidační aktivity (fosfomolybdenový, β -karotenový, DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP test), zastoupení mastných kyselin a sledování enzymové inhibiční aktivity. Byly zaznamenány silné korelace fenolických sloučenin s TAA.

Uletić-Laušević a kol. [245] zaznamenali rozdíly v TPC, TFC a antioxidačních vlastnostech (DPPH, ABTS a FRAP test) u vzorků šalvěje lékařské pocházejících ze dvou různých lokalit, sklizených ve dvou různých obdobích jednoho roku (léto, zima) a také variabilitu parametrů v rámci použitých extrakčních systémů (dichloromethan, chloroform, ethyl acetát a ethanol).

Nile a kol. [246] studovali vliv různých extrakčních technik (MAE, UAE, Soxhletova extrakce a macerace) na TPC, TFC, antioxidační vlastnosti (DPPH, β -karotenový test, test redukční síly), enzymové inhibiční aktivity yzopu. Byly také zjištěny silné korelace mezi TPC a TAA a enzymovou inhibiční aktivitou. Karakaş a kol. [194] zjistili rozdíly ve fenolickém profilu (TPC, obsah konkrétních fenolických kyselin a flavonoidů pomocí LC-ESI-MS/MS) u listů sušené jeřábiny pěstované *in vitro* a za běžných podmínek.

Mhamdi a kol. [97] charakterizovali semeno ostropestřce z hlediska obsahu fenolických sloučenin (TPC, TFC, obsah taninů, konkrétní fenolický profil pomocí RP-HPLC), antioxidačních vlastností (DPPH test, test redukční síly), dále obsahu těkavých sloučenin a mastných kyselin pomocí GC-MS. Lucini a kol. [247] se zaměřili na sledování TPC, TFC, celkových flavonolů, konkrétních fenolických sloučenin pomocí LC-ESI-MS/MS i antioxidační aktivity (DPPH, FRAP, ORAC) u 15 různých kultivarů ostropestřce mariánské.

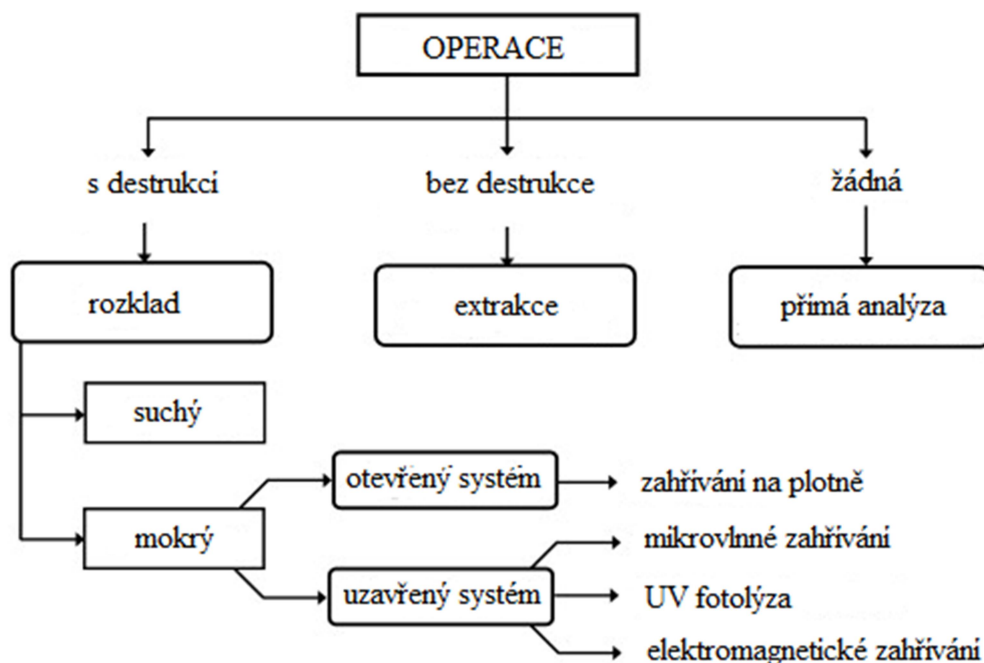
2.8 STANOVENÍ MINERÁLNÍCH LÁTEK

2.8.1 Příprava vzorku

Příprava vzorku záleží na cíli analýzy; vzorek pro prvkovou analýzu musí být reprezentativní, homogenní a nekontaminovaný. Kontaminace povrchu rostlin je nejčastěji způsobena prachem, půdou a případně solemi ze závlahové vody. Čerstvý vzorek se nejprve očistí mechanicky, a je-li to nutné, opere se krátce pod proudem deionizované vody nebo v 1–2% roztoku neionogenního nefosfátového detergentu s následným oplachem deionizovanou vodou. Po opláchnutí se suší v sušárně při 80 °C po dobu 24 hodin a rozdrtí na jemný prášek [248, 249], nebo se zpracovává nepraný, vysušený na vzduchu nebo v sušárně při 60 °C po dobu 24 hodin, příp. do konstantní hmotnosti [248, 250] a poté je homogenizován. Čerstvé vzorky mohou být také jen rozdrceny, extrahovány a extrakty použity k analýze. Čerstvé nebo sušené vzorky jsou drceny za použití třecí misky a tloučku, mlecích mlýnů, mixéru nebo drtiče z nerezové oceli. Připravený vzorek lze dále mineralizovat nebo extrahovat a použít pro prvkovou analýzu [248-250].

2.8.2 Metody mineralizace

Metod mineralizace existuje celá řada a můžeme je klasifikovat dle několika kritérií. Nejčastěji se rozdělují podle způsobu rozkladu: suchou nebo mokrou cestou. Jednotlivé techniky jsou dále klasifikovány podle dalších kritérií: teplota (vysoká/nízká), tlak (normální/za zvýšeného tlaku), komunikace s okolím (uzavřený/otevřený systém), režim (statický/dynamický), typ ohřevu (na plamenu, na elektroindukční plotně, vodní či jiná lázeň, ohřev mikrovlnným zářením). Obr. 2 shrnuje možnosti úpravy vzorku pro prvkovou analýzu [248].



Obr. 2: Metody přípravy vzorku pro prvkovou analýzu [248]

Suchý rozklad

Při suchém rozkladu dochází k termálnímu rozkladu za současného zkoncentrování netěkavých prvků a nakonec ke vzniku popela, který je následně vyluhován v roztoku silné anorganické kyseliny a použit pro analýzu. Při suchém rozkladu se organické látky rozkládají při nižší teplotě, působením tepla, v dostatečně dlouhém čase, postupným a pomalým zpopelňováním. Je to standardní procedura doporučovaná Asociací analytických chemiků, při níž se 0,5 g vzorku umístí do keramického kelímku a kelímek se nechá zpopelnit v muflové peci při teplotě 450 °C po dobu 3 hodin. Residua jsou sloučena s 5 ml 6 mol·dm⁻³ roztoku kyseliny chlorovodíkové, kelímek je dán na horkou plotnu a rozložen na čirý roztok. Zbylá rezidua se rozpouští v 0,1 mol·dm⁻³ HNO₃ a doplní se na odpovídající objemy (25 nebo 50 ml). Tento pracovní postup je často modifikován, rozdíly jsou hlavně v navážce vzorku, teplotách, době zpopelnění, příp. typu rozpouštědla použitého pro rozpouštění popela. Nevýhody suchého rozkladu jsou ztráta těkavých prvků, např. Hg, As, Se, při vysokých teplotách a při dlouhé době rozkladu [248, 251].

Mokrý rozklad v otevřených systémech

Mokrý kyselinový rozklad patří ke klasickým, velmi rozšířeným postupům. Jedná se o rozklad organické matrice v koncentrované kyselině, která má oxidační vlastnosti. Používají se především silné anorganické kyseliny jako kyselina dusičná, sírová, chloristá, fluorovodíková nebo jejich kombinace (HNO₃-HCl, HNO₃-HClO₄, HNO₃-H₂SO₄, HNO₃-H₂O₂, HNO₃-HCl-HF), přičemž nejčastěji je preferovaná kombinace HNO₃ s HClO₄ [248, 251-254]. Směsi kyselin jsou všeobecně pro destrukci organické hmoty více účinné než kyseliny samotné. Oxidaci organických látek lze zesílit přidáním dalších oxidačních nebo pomocných činidel, jako KI nebo H₂O₂ katalyzovaný Fe²⁺ solemi. Ve většině případů probíhá ve skleněných kádinkách, které jsou konvenčně zahřívány na plotně nebo v pískové lázni [248, 255] v teflonových tubách, ultra čistých křemenných nádobách nebo za využití aparatury pro reflux vybavené chladičem a rozkladným blokem dle Klejdala.

Nejčastěji se k rozkladu používá 0,5 g [248, 255] nebo 1 g [248, 256] a více než 10 ml oxidačních činidel a konečné objemy připravených vzorků jsou v rozmezí 10–100 ml, obvykle 25 ml [248, 257]. Vzorky se zahřívají při teplotách 80–200 °C po dobu několika hodin, obvykle ne méně než 2 hodiny. Výhodou této metody je rychlost, a dochází k menší ztrátě těkavých minerálů než v případě suchého rozkladu. Nevýhodou je, že je pracná a vyžaduje speciální digestoře na odtažení, vzhledem k tomu, že se používají anorganické kyseliny, které dráždí sliznice [258]. Jedná se o časově náročnou metodu, při níž je potřeba velkého množství koncentrovaných činidel, další nevýhodou je, že může docházet k úbytku analytů nebo ke kontaminaci vzorků [252].

Mikrovlnný rozklad v uzavřených systémech

Mikrovlnný rozklad se nejčastěji provádí v tlakových teflonových nádobách za použití mikrovln nebo v rozkladných bombách. Poskytuje efektivní a úplný rozklad vzorku za kontrolovaných teplot a se značným snížením doby rozkladu, spotřeby činidel a počtu manipulací. Navíc aplikace uzavřených teflonových nádob brání kontaminaci vzorku a zabraňuje ztrátě těkavých prvků. K rozkladu se využívá koncentrovaná HNO₃, nebo kombinace koncentrované HNO₃ s H₂O₂ nebo s kyselinou chlorovodíkovou. Používají se také komplexní

směsi, tj. HNO_3 s HCl a HF nebo HNO_3 s H_2O_2 , HClO_4 a HF . Doba rozkladu je kratší než 15 min a probíhá při pokojové teplotě. Po dokončení rozkladu je směs převedena do odměrné baňky a doplněna vodou na stanovený objem, obvykle 20–25 ml nebo 50 ml [248].

Alternativní metody mokrého rozkladu

Jako alternativní metoda mokrého rozkladu se nejčastěji používá UV fotolýza. Faktory, které ovlivňují UV rozklad, jsou nejčastěji: množství vzorku, množství činidla, teplota a doba rozkladu. Elektromagnetická technika je další alternativou. Rozkladný blok se skládá z elektromagnetické topné kolony vložené do elektromagnetické indukční pece. Při rozkladu se využívají opět silné anorganické kyseliny a jejich směsi s přísadkou oxidizačních činidel jako je např. H_2O_2 [248].

2.8.3 Extrakční metody vhodné pro prvkovou analýzu

Kromě komplexní mineralizace vzorku je možná extrakce minerálů za použití rozpouštědel [248] nebo jejich zkoncentrování pomocí SPE [259-261]. Při extrakci rozpouštědly se nejčastěji používají zředěné roztoky kyselin (1 nebo 10% HNO_3 nebo HCl), 5% vodné roztoky terciárních aminů, demineralizovaná voda nebo ethanol [262].

SPE se používá k zkoncentrování stopových prvků, doporučuje se vzhledem k její jednoduchosti, vysoké citlivosti, selektivitě, malému množství používaných rozpouštědel, krátké době extrakce, citlivosti k životnímu prostředí a zvýšené schopnosti zkoncentrování ve srovnání s ostatními koncentračními metodami [248, 259, 263]. Nejčastěji používané materiály SPE kolon jsou uhlíkové nanotrubičky, Ambrelite XAD pryskyřice, aktivní uhlí, uhlíková nanovlákná, chelatační pryskyřice, křemenné materiály, absorbenty na bázi nanočástic a molekulárně značené polymery [259, 264]. Vzhledem k vysoké povrchové měrné ploše a hydrofóbnímu povrchu mají uhlíkové nanotrubičky vysokou absorpční kapacitu a vysoký potenciál při zkoncentrování prvků [259, 265].

2.9 INSTRUMENTÁLNÍ TECHNIKY VHODNÉ PRO STANOVENÍ MINERÁLNÍCH LÁTEK

Pro stanovení obsahu prvků v léčivých rostlinách se používají hlavně spektrometrické techniky. Největší zastoupení má atomová adsorpční spektrometrie (AAS – Atomic Absorption Spectrometry) plamenová (FAAS – Flame Atomic Absorption Spectrometry) i elektrotermická (ETAAS – Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry); atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES – Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry), optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES – Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS – Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) a rentgenová fluorescenční spektrometrie (XRF – X-Ray Fluorescence). Z uvedených technik ty založené na indukčně vázaném plazmatu jsou více efektivní při multielementární analýze [248, 266, 267]. Tab. 8 shrnuje srovnání všech instrumentálních technik [267].

Tab. 8: Analytické charakteristiky a náklady u technik využívaných pro elementární analýzu

	FAAS	ETAAS	ICP-OES	ICP-MS	XRF
výkon	10–15 s (prvek)	3–4 min (prvek)	6–60 prvků·min ⁻¹	2–5 min (všechny prvky)	10–15 min (všechny prvky)
rozsah	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ⁵ –10 ⁸	10 ⁴ –10 ⁶
přesnost	< 10 %	1–10 %	1–5 %	< 5 %	1–10 %
interference spektrální/ chemické	velmi málo mnoho	velmi málo velmi mnoho	mnoho velmi málo	málo nějaké	málo nějaké
množství vzorku	ml	μl–μg	ml	ml	mg–g
semiQ informace	ne	ne	ano	ano	ano
izot. analýza	ne	ne	ne	ano	ne
jednoduchost	jednoduché	střední	jednoduché	střední	jednoduché
automatizace	ne	ano	ano	ano	ano
vstupní cena	nízká	střední	vysoká	velmi vysoká	střední/vysoká
provozní cena	nízká	střední	vysoká	velmi vysoká	nízká
cena analýzy	nízká	vysoká	střední	střední	nízká/střední

2.9.1 Atomová absorpční spektrometrie

Hlavní výhodou AAS je, že je to metoda rychlá, levná, s velmi dobrou opakovatelností, citlivostí a s malým množstvím interferencí. Navzdory tomu při multielementární analýze prvků v léčivých rostlinách se její použití omezuje a to především proto, že má limitovaný dynamický rozsah a umožňuje jen jednoprvkovou analýzu, což značně prodlužuje dobu analýzy [267, 268].

2.9.2 Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

ICP-OES je jednou z nejčastěji používaných metod pro stanovení prvků v potravinářských vzorcích nebo při multielementární analýze biologických vzorků. Umožňuje rychlou detekci toxických stopových prvků a tím pádem může být používána pro účely forenzní a klinické toxikologie [269]. ICP-OES umožňuje rychlé a současné stanovení různých prvků v širokém dynamickém rozsahu koncentrací v řádech μg·l⁻¹ až mg·l⁻¹. Tato technika je široce používána jako oficiální metoda stanovení prvků dle norem ISO. Nevýhodou této techniky je možnost vzniku interferencí a vysoké náklady na provoz (spotřeba argonu a elektřiny) [267].

2.9.3 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

ICP-MS je v současné době nejvýkonnější instrumentální technika pro stanovení makro, mikro a stopových prvků v léčivých rostlinách. Má vysokou citlivost, nízké detekční limity (v řádu ng·l⁻¹), široký lineární dynamický rozsah a umožňuje současnou detekci více elementů. ICP-MS má i své nevýhody: jednak může docházet k spektrálním a nespektrálním interferencím, další limitací je vysoká pořizovací cena a provozní náklady. Spektrální interference mohou vznikat při překrývání mono a polyatomických iontů. Nespektrální interference jsou matricové, kdy interferující ionty mohou být přítomny v samotném vzorku nebo mohou být tvořeny v plazmovém

zdroji. Technologie kolizních cel nabízí nové možnosti pro odstranění polyatomických interferencí [266, 267, 270]. Kromě toho, ve srovnání s ICP-OES, ICP-MS poskytuje jednodušší spektrální interpretaci a umožňuje i zjištění izotopů [248, 266, 267, 271].

2.9.4 Rentgenová fluorescenční spektrometrie

XRF je založena na emisi charakteristického rentgenového záření analyty při jejich ozáření za pomoci rentgenového paprsku. Tato technika se už dlouho používá pro stanovení makro, mikro a stopových prvků u pevných vzorků; lze ji aplikovat i na kapalné vzorky, avšak před samotnou analýzou je nutné zkoncentrování. Hlavní výhodou XRF je velký dynamický rozsah, nízká provozní cena a možnost provádět rychlou multielementární analýzu s minimální přípravou vzorku [267, 272, 273].

2.10 PŘEHLED STUDIÍ MINERÁLNÍHO SLOŽENÍ LÉČIVÝCH ROSTLIN

Studii zaměřených na sledování celkového obsahu minerálu v bylinách po rozkladu matrice je řada, avšak studií zaměřených na sledování minerálního obsahu v extraktech u studovaných léčivých rostlin je podstatně méně.

Studii o minerálním složení levandule je poměrně málo. Většina je zaměřena na sledování obsahu minerálů v esenciálním oleji [274, 275] a celkového obsahu prvků v bylině [276]. Studie zaměřené na obsah prvků v extraktech chybí. V sušené levanduli pocházející z Tureckého obchodu byl zjištěn obsah Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr a Pb [276] a u sušené levandule z Rumunska byl zjištěn obsah makro a mikroprvků (K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Rb, Sr a Zn), i obsah potenciálně toxických prvků (Al, As, Ba, Co, Sb, Cr a V) [277].

V případě měsíčku je studií více: Gogoasa a kol. [37] uvádí celkový obsah mikroprvků Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Cr, Pb a Cd v sušených květech měsíčku. Dále byl zjišťován obsah minerálů v ethanolových extraktech (70%, 95%) připravených ze sušené byliny; v 70% ethanolu byly zaznamenány vyšší obsahy makro a mikroprvků než v 90%. V této studii byla zjištěna korelace mezi kovy a flavonoidy, mezi TPC, TFC a antimikrobiálními testy a také přímá korelace Al, Ca a Cu s TFC, která naznačuje schopnost chelace [38]. Ahmad a kol. [278] také sledovali obsah minerálů (Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Ni, Co, Pb, Cr a Cd) ve vodných a ethanolových extraktech ze sušené celé byliny, květů, listů i kořenů měsíčku. Ve vodných extraktech byly zaznamenány vyšší obsahy prvků. Senila a kol. [279] validovali a aplikovali ICP-OES metodu pro stanovení esenciálních a neesenciálních prvků v sušeném měsíčku i jeho vodných extraktech.

Helmja a kol. [200] ukazují vliv geografické lokality na variabilitu minerálních látek sušené třezalky pocházející z Estonska. V této studii byly také charakterizovány vodné a ethanolové extrakty ze sušené třezalky a byl zjištěn vyšší obsah K, Pb, Zn, Mn, Mg, Co a Cr u vodných extraktů. Owen a kol. [51] se ve své studii zaměřili na zjištění minerálního profilu sušené třezalky, tablet a kapsulí z třezalky pomocí ICP-OES, pomocí analýzy hlavních komponent úspěšně oddělili vzorky, přičemž pro diskriminaci byl nejdůležitější obsah Ba, Ca, Cd, Fe, Ni, Sr a Y. Pavlova a kol. [49] zjišťovali minerální profil v sušené třezalce, methanolovém extraktu i v čaji u vzorků, které pocházely z různých lokalit, kromě toho byla v této studii zaznamenána korelace TFC s obsahem Mn u methanolových extraktů.

Szentmihályi a kol. [280] studovali obsah Al, B, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, V, Zn v různých částech sušené šalvěje muškátové (list, květ, stonek, kališní lístek) a v esenciálním oleji získaném z květů. V květech byly zaznamenány vyšší obsahy Ca, K a P oproti stonkům a listům. Szentmihályi a Then [58] zjistili, že geografická poloha má vliv na celkové minerální složení u různých druhů šalvěje, mj. i šalvěje muškátové a lékařské, byl také stanoven obsah vybraných minerálů ve vodných extraktech těchto bylin.

Frąszczak a kol. [62] se zaměřili na sledování makro a mikroprvků u meduňky, která rostla za různých světelných podmínek. Vyšší obsah makro a mikro nutrientů byl u meduňky, která rostla pod LED lampou ve srovnání s fluorescenční lampou. Dzida a kol. [281] uvádí rozdíly obsahu makroprvků v meduňce a šalvěji lékařské u sušené byliny v průběhu dvou produkčních roků. Další studie jsou zaměřeny na sledování obsahu makro, mikroprvků a toxických prvků v sušené meduňce a jejich čajích [53, 282, 283].

Uribe a kol. [68] zjistili rozdíly v minerálním složení čerstvé a sušené máty. Sušené vzorky měly vyšší obsah minerálů. U čerstvých a sušených vzorků byly zjištěny vysoké obsahy K, Ca, Na, Mg a P. Arslan a kol. [284] zaznamenali rozdíly v minerálním složení u čerstvých a sušených vzorků máty, sušených různými způsoby (v troubě, na slunci, pomocí mikrovln). Sušené vzorky měly zvýšené obsahy minerálů. Čerstvé a sušené vzorky měly vyšší obsah K, Ca, P, Mg, Fe a Al. U mikrovlnného ošetření byl nižší pokles Ag, Al, B, Na, Mn, Mg a Zn. Další studie ukazují obsah makro, mikroprvků a toxických prvků v sušené máte a jejich čajích [53, 69, 285].

Then a kol. [286] uvádí minerální zastoupení ethanolových extraktů (20% a 40%) ze šalvěje lékařské. Vysoký obsah K, Ca a S byl zjištěn u 20% ethanolových extraktů. Obsah minerálů se snižoval u extraktů s vyšším obsahem ethanolu. Obsahy makro, mikroprvků a toxických prvků v sušené šalvěji lékařské a jejich infuzích jsou nejčastěji studovány [52, 53, 78, 287, 288].

V případě yzopu chybí studie zaměřené na sledování obsahu minerálů v extraktech. Většina studií je zaměřena na sledování obsahu toxických prvků v bylině [85, 289].

Minerální profil jestřabiny a ostropestřce jsou nejméně prostudovány. Pouze studie Beležentiené a Mikulioniené [92] sleduje obsah makro a mikroprvků v sušené jestřabině. Yaldiz [99] zase uvádí obsah makro a mikro prvků ve vodných extraktech ze semen ostropestřce a Ionescu a kol. [100] celkový obsah minerálů v semenech.

2.11 SENZORICKÁ ANALÝZA

Senzorická analýza (senzorické hodnocení) je vědecká metoda, při níž se senzorické vlastnosti potravin posuzují výhradně pomocí lidských smyslů. Senzorickou analýzu provádí hodnotitelé (posuzovatelé), kteří se vybírají podle účelu senzorického testování a výsledky se vyhodnocují statisticky [290, 291].

Pro provádění senzorického hodnocení je vypracována řada metod, jejichž hlavním cílem je na základě subjektivních názorů hodnotitelů získat objektivní informace o vzorcích. Metody používané při senzorickém hodnocení lze obecně rozdělit na tři základní typy: rozdílové zkoušky (používané ke zjištění rozdílů, podobností mezi předkládanými vzorky), deskriptivní zkoušky, (používané k identifikaci a kvantifikaci jednotlivých senzorických znaků přítomných ve vzorku) a zkoušky používající stupnice nebo kategorie (používané k určování pořadí nebo velikosti rozdílů). Značná část metod, jejich průběh a požadavky jsou normalizovány v rámci příslušných ČSN ISO norem [290-292].

Nejčastěji se při sensorickém hodnocení používají kategorové ordinální (pořadové) stupnice, které umožňují rozhodnout, zda je mezi sledovanými vzorky rozdíl. Stupnice mohou být sestaveny intenzitně (posuzování intezity sensorické vlastnosti – deskriptoru) nebo hedonicky (posuzování příjemnosti). Stupnice jsou často doprovázeny definicí, dostatečným slovním popisem nebo grafickým vyjádřením. Zkoušky s použitím stupnic jsou v praxi nejrozšířenější, vzhledem k tomu, že jsou jednoduché, srozumitelné a lze jimi nejlépe kvantitativně vyjádřit rozdíly mezi vzorky [291, 292].

Užitečným typem testu je profilový test, který hodnotí vzorky na základě několika dílčích sensorických vlastností – deskriptorů. Jde o vysoce sofistikovanou metodu, pomocí které lze provést důkladnou sensorickou analýzu různých vzorků a je vhodné ho použít např. při vývoji nových výrobků. Používá se také pro určení charakteru a intenzity deskriptorů, které mohou pozitivně nebo negativně ovlivnit celkový vjem z produktu. Kompletní vyjádření sensorického profilu je však velmi složité a časově náročné vzhledem k tomu, že je potřeba sledovat velké množství parametrů, proto se častěji sleduje jen částečný sensorický profil, který obsahuje jen vybrané sensorické vlastnosti, např. sensorický profil *flavouru*. *Flavour* je sensorický vjem zahrnující kombinaci chuti, vůně, pocitu bolesti, tepla a chladu a taktilních počitků. Pro označení nepřírozené, změněné vůně a/nebo chuti se používá anglický pojem *off-flavour* nebo české termíny cizí chuť a vůně, přípach a pachut' [290-292].

Z produktů související s problematikou řešenou v rámci této práce je velmi dobře dokumentováno především sensorické hodnocení různých typů čajů z léčivých rostlin [293-297], studií zaměřených na sensorické hodnocení nápojů s přídavkem bylin je poměrně málo. Özcelik a kol. [298], Yerenova a kol. [113] se věnovali sensorickému hodnocení nealkoholických nápojů s přídavkem bylin, Karabegović a kol. [299] hodnocení bylinných likérů a Leskošek-Čukalović a kol. [300] hodnocení piva s přídavkem bylinných extraktů. Sensorická analýza byla využita v poslední aplikační části této dizertační práce k výběru vhodné receptury a příchutě jednodruhových a dvoudruhových sirupů s přídavkem bylinných extraktů.

3 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Informace uvedené v předchozích kapitolách slouží jako teoretický podklad pro vypracování dizertační práce, která je realizována z velké části na pracovištích Výzkumného ústavu potravinářského v Bratislavě a na Ústavu chemie potravin a biotechnologií Fakulty chemické VUT v Brně. Vzorky pro komplexní analýzu léčivých rostlin poskytla pracoviště Centra léčivých rostlin Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně a Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně. Vzorky pro následnou aplikaci poskytla firma Calendula a.s.

Cíle dizertační práce je možné rámcově definovat následovně:

1. Pomocí kombinace moderních analytických, spektroskopických a statistických metod komplexně prostudovat složení a vlastnosti vybrané skupiny nejvýznamnějších běžně dostupných léčivých rostlin.
 - a) Komplexně charakterizovat extrakty vybraných léčivých rostlin pocházejících ze dvou lokalit připravených dynamickou extrakcí do vody, 50% ethanolu a dimethylsulfoxidu (DMSO).
 - b) Posoudit efektivitu rozpouštědel v případě různé úpravy vzorku (mražení vs. sušení).
 - c) Posoudit vliv geografických podmínek a roků produkce na vybrané charakteristiky léčivých rostlin.
2. Navrhnout postupy šetrné izolace a následné aplikace vybraných komponentů léčivých rostlin do potravinářských produktů (nápoje).
3. Ve spolupráci s ověřovacím pracovištěm experimentálně ověřit realizovatelnost navrhovaných postupů izolace složek léčivých rostlin a jejich aplikace do potravinářských komodit.

Analytické cíle dizertační práce budou dosaženy pomocí metod ultrafialové viditelné spektroskopie, elektronové paramagnetické rezonance, kapalinové chromatografie a optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Extrakční a izolační postupy byly realizovány v laboratorním měřítku a pro vybrané rostliny také v podmínkách experimentálního ověřování.

Hlavním cílem analytické části práce je vybrat vhodné technologické zpracování (způsob úpravy léčivé rostliny a extrakčního rozpouštědla) a vhodné druhy léčivých rostlin pro izolaci funkčních složek (hlavně fenolických sloučenin, flavonoidů, látek s antioxidačním potenciálem) při následné aplikaci do potravin.

Doposud nebyla v podmínkách ČR/SR a ani v širším prostoru realizována tak obsáhlá experimentální studie s přímou aplikací/ověřením výsledků v podmínkách poloprovozu, což je jeden z hlavních originálních přínosů předložené dizertační práce.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 LABORATORNÍ VYBAVENÍ

4.1.1 Pomůcky

Bylo využito běžné laboratorní sklo Simax (Kavalier, ČR), automatické pipety 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1 ml, 5 ml a 10 ml (Eppendorf, USA; Biohit, Finsko), křemenné kyvety pro UV/VIS oblast (Hellman, Německo), plochá křemenná kyveta pro EPR vnitřní objem 500 μ l (Bruker, Německo), kolona Agilent Poroshell 120 EC-C18 150 \times 4,6 mm, 2,7 μ m (Agilent Technologies, USA), plastové centrifugační zkumavky 50 ml (VWR International, USA), plastové vialky 5 ml (Fisher, SK), skleněné vialky 2 ml s plastovým uzávěrem, septa (Agilent Technologies, USA), plastové zkumavky 10 ml (FL Medical, Itálie), třecí miska s tloučkem, nylonové mikrofiltry 0,22 μ m (Chromservis, ČR), kvantitativní filtrační papíry s velikostí pórů 0,45 μ m, jednorázové stříkačky, stojan na zkumavky, stojan na vialky, plastové Petriho misky, zkumavky 2 ml (Eppendorf, Německo), keramický nůž, plastová deska na krájení, sítko na čaj, trychtýř, tkanina, nerezový extraktor, velká mísa na navažování, nádobí a pomůcky pro senzorkou analýzu.

4.1.2 Chemikálie

Při experimentech byly použity následující chemikálie: Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma Aldrich, Německo), uhličitan sodný, p.a. (Lachema, ČR), 2-aminoethyl-difenylborát p.a. (Sigma Aldrich, Německo), sůl 2,2'-azino-bis(3-ethylbenthiazolin-6-sulfonové kyseliny) (Polysciences, Inc., Velká Británie), peroxidisíran draselný, p.a. (Fluka, Švýcarsko), 5,5-dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (Sigma Aldrich Ltd, Německo), hydroxid sodný, p.a. (Mikrochem, SK), hydrogenfosforečnan draselný, p.a. (Mikrochem, SK), ethanol pro HPLC (Sigma Aldrich, Německo), ethanol potravinářský, dimethylsulfoxid pro GC (VWR International, USA), acetonitril pro HPLC (Sigma Aldrich, Německo), kyselina mravenčí p.a. (98 %, Lach-Ner, ČR), kyselina dusičná p.a. (Analytika, ČR), kyselina chlorovodíková p.a. (Analytika, ČR), standardy prvků 1 g \cdot l $^{-1}$ (Analytika, ČR), gallová kyselina, p.a. (97,5 %, Sigma Aldrich, Německo), kyselina kávová, p.a. (99 %, Alfa Aesar, USA), kyselina *p*-kumarová p.a. (98 %, Sigma Aldrich, Německo), kyselina *trans*-ferulová p.a. (99 %, Sigma Aldrich, Německo), kyselina sinapová p.a. (98 %, Sigma Aldrich, Německo), kyselina vanilová p.a. (97 %, Sigma Aldrich, Německo), kyselina chlorogenová p.a. (Cayman Chemical Company, USA), (\pm)-katechin p.a. (Sigma Aldrich, Německo), rutin hydrát p.a. (94 %, Sigma Aldrich, Německo), kvercetin dihydrát (98 %, Sigma Aldrich, Německo), myricetin (98 %, Sigma Aldrich, Německo), hesperidin (80 %, Sigma Aldrich, Německo), naringin (95 %, Sigma Aldrich, Německo), luteolin (97 %, Alfa Aesar, USA), argon, sada kalibrační pufrů.

4.1.3 Přístroje

Příprava vzorků: Analytické váhy AP-110 (Ohaus, Švýcarsko) a GR-202 (HELAGO, Itálie), laboratorní centrifuga s možností chlazení 2-16 KC (Sigma, Německo) a EBA 21 (Hettich, Německo), laboratorní třepačka Innova 2000 Platform Shaker (New Brunswick Scientific, USA)

a UNIMAX 1010 (Heidolph, Německo), sušínové váhy IR120 (Denver Instrument, Německo), pH metr Hach (Hach, USA), ultrazvuková lázeň (Kraintek, SK), přístroj pro přípravu deionizované vody UltraPur (Watrex, ČR), sušárna (Memmert, Německo), chladnička s mrazničkou ERB 36300 X (Electrolux, Švédsko).

Charakterizace vzorků: UV-VIS-NIR (UltraViolet-Visible Near-Infrared Spectroscopy) spektrofotometr Shimadzu 3600 (Shimadzu, Japonsko), X-pásmový EPR spektrometr e-scan (Bruker, Německo), kapalinový chromatograf Agilent Infinity 1260 (Agilent Technologies, USA), optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Horiba Ultima 2 (Horiba Scientific, Francie).

4.1.4 Vzorky léčivých rostlin pro komplexní charakterizaci

Pro komplexní analýzu bylo vybráno následujících deset druhů léčivých rostlin: levandule lékařská (LA – *Lavandula angustifolia*), měsíček lékařský (CO – *Calendula officinalis*), třezalka tečkovaná (HP – *Hypericum perforatum*), šalvěj muškátová (SS – *Salvia sclarea*), meduňka lékařská (MO – *Melissa officinalis*), jeřábina lékařská (GO – *Galega officinalis*), yzop lékařský (HO – *Hyssopus officinalis*), máta peprná (MP – *Mentha piperita*), šalvěj lékařská (SO – *Salvia officinalis*) a ostropestřec mariánský (SM – *Silybum marianum*), které byly sbírány v průběhu dvou let 2015 a 2016. Vzorky pocházely ze dvou různých botanických zahrad: z Centra léčivých rostlin Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně a ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně se sídlem v Lednici. Základní charakteristiky vzorků jsou shrnuty v Tab. 9 a 10. Vzorky byly sbírány ručně v plné zralosti, která byla určena zkušenými botaniky v konkrétních botanických zahradách. Léčivé rostliny byly sbírány systematicky jednak ze začátku, prostředku a konce jednotlivých řádků přímo do přepravek.

Následně byly vzorky posklizňově upravovány dvěma způsoby: sušením a zmrazováním. Při úpravě sušením byly vzorky ihned po sběru uloženy na lísky nebo štoly a sušeny studeným vzduchem při teplotě 25–30 °C. Po vysušení byly vzorky třizeny, separovány na jednotlivé části a uchovávány odděleně v papírových sáčcích ve skříni bez přístupu světla. Při úpravě mražením byly vzorky po sběru ihned transportovány do laboratoře, třizeny a separovány na jednotlivé části a ihned uchovávány při teplotách –18 °C. Veškeré operace probíhaly maximálně do 3 hodin od sběru.

Celkem bylo analyzováno 76 vzorků, veškeré výsledky jsou uváděny na obsah sušiny bez ohledu na způsob zpracování.

Tab. 9: Seznam vzorků léčivých rostlin z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně

Zkratka	Botanické jméno	Čeď	Část	Sběr	Instituce
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně rok 2015 – zmražené</i>					
LAMZ15	<i>Lavandula angustifolia</i>	Laminaceae	květ	15. 6. 2015	MU
COMZ15	<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	květ	22. 6. 2015	MU
HPMZ15	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericaceae	nať	15. 6. 2015	MU
SSMZ15	<i>Salvia sclarea</i>	Laminaceae	nať	15. 6. 2015	MU
MOMZ15	<i>Melissa officinalis</i>	Laminaceae	list	15. 6. 2015	MU
GOMZ15	<i>Galega officinalis</i>	Fabaceae	nať	15. 6. 2015	MU
HOMZ15	<i>Hyssopus officinalis</i>	Laminaceae	nať	8. 7. 2015	MU
MPMZ15	<i>Mentha piperita</i>	Laminaceae	list	8. 7. 2015	MU
SOMZ15	<i>Salvia officinalis</i>	Laminaceae	list	8. 7. 2015	MU
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně rok 2015 – sušené</i>					
LAMS15	<i>Lavandula angustifolia</i>	Lamiaceae	květ	15. 6. 2015	MU
COMS15	<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	květ	22. 6. 2015	MU
HPMS15	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericaceae	nať	15. 6. 2015	MU
SSMS15	<i>Salvia sclarea</i>	Lamiaceae	nať	15. 6. 2015	MU
MOMS15	<i>Melissa officinalis</i>	Lamiaceae	list	15. 6. 2015	MU
GOMS15	<i>Galega officinalis</i>	Fabaceae	nať	15. 6. 2015	MU
HOMS15	<i>Hyssopus officinalis</i>	Lamiaceae	nať	8. 7. 2015	MU
MPMS15	<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	list	8. 7. 2015	MU
SOMS15	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae	list	8. 7. 2015	MU
SMMS15	<i>Silybum marianum</i>	Asteraceae	semeno	9. 9. 2015	MU
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně rok 2016 – zmražené</i>					
LAMZ16	<i>Lavandula angustifolia</i>	Laminaceae	květ	30. 6. 2016	MU
COMZ16	<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	květ	30. 6. 2016	MU
HPMZ16	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericaceae	nať	30. 6. 2016	MU
SSMZ16	<i>Salvia sclarea</i>	Laminaceae	nať	30. 6. 2016	MU
MOMZ16	<i>Melissa officinalis</i>	Laminaceae	list	30. 6. 2016	MU
GOMZ16	<i>Galega officinalis</i>	Fabaceae	nať	30. 6. 2016	MU
HOMZ16	<i>Hyssopus officinalis</i>	Laminaceae	nať	30. 6. 2016	MU
MPMZ16	<i>Mentha piperita</i>	Laminaceae	list	30. 6. 2016	MU
SOMZ16	<i>Salvia officinalis</i>	Laminaceae	list	15. 9. 2016	MU
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně rok 2016 – sušené</i>					
LAMS16	<i>Lavandula angustifolia</i>	Lamiaceae	květ	30. 6. 2016	MU
COMS16	<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	květ	30. 6. 2016	MU
HPMS16	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericaceae	nať	30. 6. 2016	MU
SSMS16	<i>Salvia sclarea</i>	Lamiaceae	nať	30. 6. 2016	MU
MOMS16	<i>Melissa officinalis</i>	Lamiaceae	list	30. 6. 2016	MU
GOMS16	<i>Galega officinalis</i>	Fabaceae	nať	30. 6. 2016	MU
HOMS16	<i>Hyssopus officinalis</i>	Lamiaceae	nať	30. 6. 2016	MU
MPMS16	<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	list	30. 6. 2016	MU
SOMS16	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae	list	30. 6. 2016	MU
SMMS16	<i>Silybum marianum</i>	Asteraceae	semeno	15. 9. 2016	MU

Tab. 10: Seznam vzorků léčivých rostlin ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně

Zkratka	Botanické jméno	Čeleď	Část	Sběr	Instituce
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně r. 2015 – zmražené</i>					
LAZZ15	<i>Lavandula angustifolia</i>	Lamiaceae	květ	19. 6. 2015	ZU
COZZ15	<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	květ	19. 6. 2015	ZU
HPZZ15	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericaceae	nať	19. 6. 2015	ZU
SSZZ15	<i>Salvia sclarea</i>	Lamiaceae	nať	19. 6. 2015	ZU
MOZZ15	<i>Melissa officinalis</i>	Lamiaceae	list	19. 6. 2015	ZU
GOZZ15	<i>Galega officinalis</i>	Fabaceae	nať	19. 6. 2015	ZU
HOZZ15	<i>Hyssopus officinalis</i>	Lamiaceae	nať	19. 6. 2015	ZU
MPZZ15	<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	list	12. 7. 2015	ZU
SOZZ15	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae	list	19. 6. 2015	ZU
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně r. 2015 – sušené</i>					
LAZS15	<i>Lavandula angustifolia</i>	Lamiaceae	květ	19. 6. 2015	ZU
COZS15	<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	květ	19. 6. 2015	ZU
HPZS15	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericaceae	nať	19. 6. 2015	ZU
SSZS15	<i>Salvia sclarea</i>	Lamiaceae	nať	19. 6. 2015	ZU
MOZS15	<i>Melissa officinalis</i>	Lamiaceae	list	19. 6. 2015	ZU
GOZS15	<i>Galega officinalis</i>	Fabaceae	nať	19. 6. 2015	ZU
HOZS15	<i>Hyssopus officinalis</i>	Lamiaceae	nať	19. 6. 2015	ZU
MPZS15	<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	list	12. 7. 2015	ZU
SOZS15	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae	list	19. 6. 2015	ZU
SMZS15	<i>Silybum marianum</i>	Asteraceae	semeno	14. 9. 2015	ZU
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně r. 2016 – zmražené</i>					
LAZZ16	<i>Lavandula angustifolia</i>	Lamiaceae	květ	28. 6. 2016	ZU
COZZ16	<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	květ	28. 6. 2016	ZU
HPZZ16	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericaceae	nať	28. 6. 2016	ZU
SSZZ16	<i>Salvia sclarea</i>	Lamiaceae	nať	28. 6. 2016	ZU
MOZZ16	<i>Melissa officinalis</i>	Lamiaceae	list	28. 6. 2016	ZU
GOZZ16	<i>Galega officinalis</i>	Fabaceae	nať	28. 6. 2016	ZU
HOZZ16	<i>Hyssopus officinalis</i>	Lamiaceae	nať	28. 6. 2016	ZU
MPZZ16	<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	list	28. 6. 2016	ZU
SOZZ16	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae	list	28. 6. 2016	ZU
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně r. 2016 – sušené</i>					
LAZS16	<i>Lavandula angustifolia</i>	Lamiaceae	květ	28. 6. 2016	ZU
COZS16	<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	květ	28. 6. 2016	ZU
HPZS16	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericaceae	nať	28. 6. 2016	ZU
SSZS16	<i>Salvia sclarea</i>	Lamiaceae	nať	28. 6. 2016	ZU
MOZS16	<i>Melissa officinalis</i>	Lamiaceae	list	28. 6. 2016	ZU
GOZS16	<i>Galega officinalis</i>	Fabaceae	nať	28. 6. 2016	ZU
HOZS16	<i>Hyssopus officinalis</i>	Lamiaceae	nať	28. 6. 2016	ZU
MPZS16	<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	list	28. 6. 2016	ZU
SOZS16	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae	list	28. 6. 2016	ZU
SMZS16	<i>Silybum marianum</i>	Asteraceae	semeno	12. 9. 2016	ZU

4.1.5 Vzorky půd

Předmětem analýz byl také obsah minerálních látek ve vzorcích půd odebraných z místa, kde rostly léčivé rostliny. Pro vzorkování byla zvolena metoda odběru z výšky do 25 cm od povrchu, vždy z řady, kde rostly příslušné léčivé rostliny, a to ze začátku, ze středu a konce řádku. Takto vytvořený směsný vzorek odpovídající jednotlivé rostlině byl transportován v plastových pytlech do laboratoře. Vzorky byly po transportu sušeny 48 hodin při laboratorní teplotě, následně sítovány přes 1mm síto a kvartovány. Takto připravený laboratorní vzorek byl využit k mineralizaci.

4.2 UV-VIS EXPERIMENTY

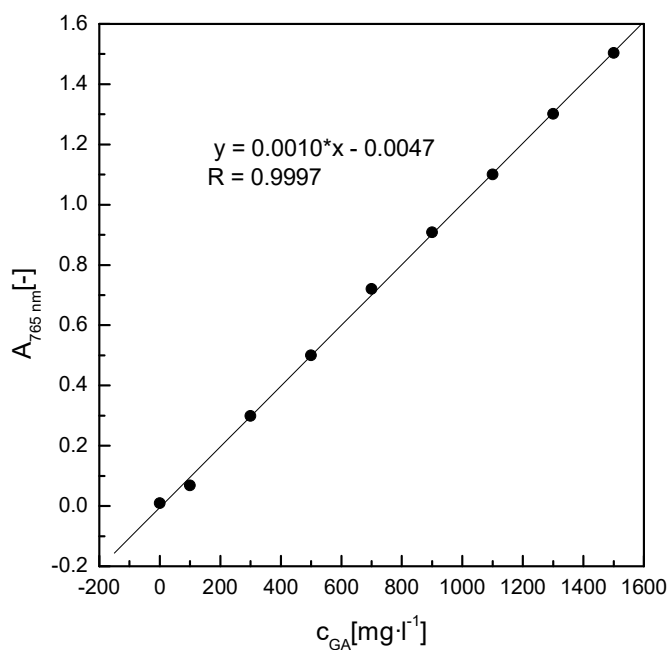
Všechny UV-VIS experimenty byly realizovány pomocí UV-VIS-NIR spektrofotometru Schimadzu 3600 s příslušenstvím.

4.2.1 Příprava extraktů pro komplexní charakterizaci léčivých rostlin

Přibližně 3 g zmražených/sušených léčivých rostlin bylo rozmixováno v mixeru pomocí nerezových kotoučů. Následně byl zmražený vzorek nejemno nasekán pomocí nože nebo dodatečně rozdrčen v třecí misce s tloučkem/sušený vzorek rozdrčen v třecí misce tloučkem. Poté bylo do plastové centrifugační zkumavky naváženo na analytických váhách 0,5 g homogenizovaného vzorku. K navážce bylo přidáno 20 ml rozpouštědla (deionizovaná voda, 50% ethanol, resp. dimethylsulfoxid – DMSO). Směs byla hodinu třepána při 150 ot·min⁻¹ na laboratorní třepačce a poté centrifugována při 5000 ot·min⁻¹ 10 min a teplotě 20 °C. Supernatant byl následně filtrován přes kvantitativní filtrační papír přímo do tmavé vialky o objemu 50 ml a mezi měřeními uchováván v lednici a/nebo v tmavé skříni (v případě DMSO). Z každé léčivé rostliny byly paralelně přichystány vždy čtyři extrakty.

4.2.2 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

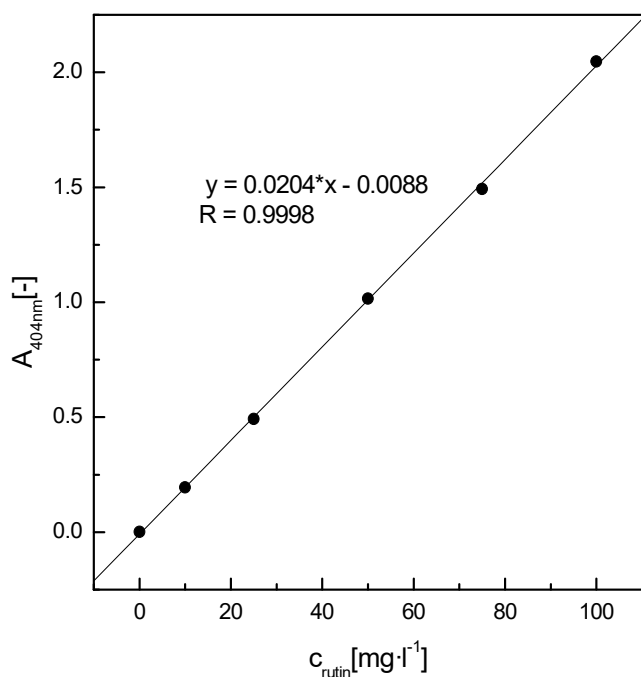
Celkový obsah fenolických látek byl stanoven modifikovanou metodou s využitím Folin-Ciocalteuova činidla [219]. Do vialky bylo napipetováno 200 µl vzorku, 15,8 ml deionizované vody a 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Směs byla po promíchání ponechána 10 minut stát a poté byly přidány 3 ml 20% roztoku uhličitanu sodného. Směs byla opět promíchána a ponechána hodinu zreagovat. Po uplynutí doby byla změřena absorbance při vlnové délce 765 nm oproti referenci (příslušné extrakční činidlo). Stejným postupem byla připravena kalibrační křivka s použitím standardních roztoků kyseliny gallové v koncentračním rozpětí 0–1 500 mg·l⁻¹ (Obr. 3). Celkový obsah fenolických látek byl zjištěn z kalibrační přímky kyseliny gallové v mg·l⁻¹. Tato koncentrace byla přepočítána a vyjádřena v g·kg⁻¹ na suchou hmotu.



Obr. 3: Kalibrační přímka standardních roztoků gallové kyseliny – závislost absorbance při 765 nm na koncentraci gallové kyseliny

4.2.3 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Celkový obsah flavonoidů ve vzorcích byl stanoven modifikovanou metodou s využitím 2-aminoethyl-difenylborátu [219]. Přesně 150 μl 1% roztoku 2-aminoethyl-difenylborátu v ethanolu bylo smícháno s 3 ml extraktu léčivé rostliny přímo v křemenné UV-VIS kyvetě. Směs byla důkladně promíchána a po 10 minutách byla změřena absorbance roztoku při 404 nm proti referenci (příslušné extrakční činidlo). Identickým postupem byla připravena kalibrační přímka s využitím standardních roztoků rutinu v ethanolu v koncentračním rozmezí 0–100 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (Obr. 4). Výsledky byly vyjádřeny v $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ na suchou hmotu.



Obr. 4: Kalibrační přímka standardních roztoků rutinu – závislost absorbance při 404 nm na koncentraci rutinu

4.2.4 Stanovení barevných charakteristik v systému CIE L*a*b*

Do 1mm křemenné kyvety byl napipetován příslušný extrakt. Jako blank bylo použito odpovídající extrakční činidlo. Spektrum vzorku bylo snímáno při vlnové délce 200–1 000 nm v 0,5nm intervalu a šířkou štěrbinu 1 nm. Pro vyhodnocení barevnosti byla využita viditelná oblast naměřených spekter od 380 do 780 nm; (posun ± 20 nm od uvedeného rozsahu pro viditelnou oblast) a vyhodnocení bylo realizováno v podmínkách 10° pozorovatel a standardní zdroj osvětlení Illuminant D65, který představuje denní světlo, teplota barvy tohoto zdroje je 6 500 K.

Barevné deskriptory byly vypočítány pomocí softwaru Panorama Advanced Colorlite (Labcognition Schimadzu, Japonsko). Z množiny barevných ukazatelů byly pro účely objektivního hodnocení barevnosti a jejich změn vybrány trichromatické parametry systému CIE L*a*b* (L* – měrná světlost od 0 (černé) do 100 bílé; a* – odstín mezi zelenou (-a*) a červenou (+a*), b* – odstín mezi modrou (-b*) a žlutou (+b*). Další parametry jako chromaticita (C*), úhel barevného odstínu (h°) a index hnědnutí (BI – Browning Index) byl vypočten podle Korei a kol. [301] Hodnoty chromaticity udávají saturaci barvy a hodnoty barevného odstínu 0°, 90°, 180° a 270° udávají červenou, žlutou, zelenou a modrou barvu (v tomto pořadí).

4.3 EPR EXPERIMENTY

Všechny EPR experimenty byly realizovány pomocí X-pásmového přenosného EPR spektrometru e-scan (Bruker, Německo) s příslušenstvím.

4.3.1 Příprava extraktů pro EPR experimenty

Extrakty byly připravovány postupem uvedeným v kapitole 4.2.1.

4.3.2 Stanovení antioxidační aktivity s využitím kation radikálu ABTS⁺

Radikál-zhášecí aktivita extraktů byla testována pomocí roztoku stabilního kation radikálu ABTS⁺, připraveného podle Tobolkové a kol. [218] Přesně 300 μ l příslušného extraktu, podle potřeby zředěného, bylo smícháno se 700 μ l roztoku 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ABTS⁺ ve vodě. V případě referenčního systému bylo do reakční směsi místo vzorku přidáno příslušné extrakční činidlo. Směs příslušného radikálu a vzorku byla následně promíchána 2 ml vzduchu a umístěna do ploché EPR kyvety.

4.3.3 Stanovení antioxidační/prooxidační aktivity s využitím techniky spinových lapačů v přítomnosti DMPO/K₂S₂O₈

Přesně 100 μ l DMPO (25 μ l DMPO/840 μ l deionizované vody), 200 μ l 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru (pH = 7), 300 μ l bylinného extraktu a 250 μ l 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku peroxodisíranu sodného bylo smícháno. Směs byla následně promíchána 2 ml vzduchu a ihned umístěna do ploché EPR kyvety. Časový průběh 15 EPR spekter po dobu 30 minut byl monitorován přesně 3 minuty od přidavku peroxodisíranu sodného. Každé spektrum představuje akumulaci 30 individuálních scanů. Při použití tohoto systému je sledována antioxidační/prooxidační aktivita jako výsledek konkurenčních reakcí mezi spinovým lapačem DMPO, generovanými radikály a antioxidanty přítomnými ve vzorku prostřednictvím spinových aduktů, dominantně [•]DMPO-OH, pokud není uvedeno v následujících částech jinak.

4.3.4 Parametry EPR analýzy

Všechna měření byla realizována pomocí ploché křemenné kyvety vhodné pro EPR měření. Kyveta s vnitřním objemem 500 µl byla opatřena injekční stříkačkou s objemem 2 ml pro ulehčení plnění měřeným vzorkem. Kyveta byla umístěna do dutiny EPR spektrometru a po nastavení parametrů měření (Tab. 11) se začal sledovat časový vývoj 10 EPR spekter během 15 min resp. 15 EPR během 30 min se začátkem přesně 3 min po přidavku kation radikálu ABTS^{•+} resp. peroxodisíranu sodného do systému.

Tab. 11: Typické parametry EPR spektrometru

Parametr	Hodnota
střed pole	346,2 mT (ABTS ^{•+}) 346 mT (DMPO)
šířka pole	10 mT (ABTS ^{•+}) 9 mT (DMPO)
modulace	0,05 mT (ABTS ^{•+}) 0,15 mT (DMPO)
zesílení	3,99·10 ³ (ABTS ^{•+}) 2·10 ³ (DMPO)
výkon mikrovlnného záření	6 mW
frekvence mikrovlnného záření	9,71 GHz
časový rozdíl mezi spektry	Δt = 1,5 min (ABTS ^{•+}) Δt = 2 min (DMPO)
časová konstanta	10,24 ms
délka 1 scanu	2,62 s
počet scanu	30
počet snímaných spekter	10 (ABTS ^{•+}) 15 (DMPO)

4.3.5 Zpracování experimentálních dat

Naměřená spektra byla zpracována v programech WinEPR (Bruker, Německo) a OriginPro v. 7.0. (MicroCalc, USA). Radikál-zhášecí aktivita extraktů léčivých rostlin oproti kation radikálu ABTS^{•+} byla vyjádřena jako hodnota TEAC, vypočítaná pro hodnoty koncentrace ABTS^{•+} (dvojitý integrál EPR spektra) naměřené v čase 10,5 min po přidání daného radikálu do systému podle vztahu:

$$TEAC_{ABTS^{•+}} = \frac{(c_{0(ABTS^{•+})} - c_{t(ABTS^{•+})}) \cdot V_{(ABTS^{•+})}}{V_{vzorku}} \cdot \nu \cdot F \quad (1)$$

kde $c_{0(ABTS^{•+})}$ je počáteční koncentrace roztoku ABTS^{•+}, $c_{t(ABTS^{•+})}$ je koncentrace roztoku ABTS^{•+} po jejich přidavku do systému ve zvoleném čase t ($t = 10,5$ min), $V_{(ABTS^{•+})}$ je objem ABTS^{•+} přidaného do systému, $V_{(vzorku)}$ je objem vzorku přidaného do systému, ν je stechiometrický koeficient reakce ABTS^{•+} a TROLOX $\nu = 1/2$, F je faktor zředění.

Antioxidační/prooxidační aktivita vzorků testována technikou spinových lapačů v přítomnosti DMPO/K₂S₂O₈ byla vyjádřena jako hodnota RS% (% zhášených radikálů), která přímo vyjadřuje antioxidační/prooxidační schopnost příslušného vzorku, resp. jeho schopnost eliminovat/generovat radikály v experimentálním systému. Hodnota RS% byla vypočítána podle rovnice:

$$RS\% = \left(1 - \frac{I_{sp(15)\cdot OH}}{I_{ref(15)\cdot OH}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

kde: $I_{sp/ref(15)}$ představuje intenzitu 15. EPR spektra $\cdot OH$ příslušného vzorku resp. reference.

4.4 HPLC EXPERIMENTS

4.4.1 Příprava vzorků pro HPLC-DAD analýzu

Přibližně 3 g zmražených/sušených léčivých rostlin bylo rozmixováno v mixeru pomocí nerezových kotoučů. Následně byl zmražený vzorek nejemno nasekán pomocí keramického nože, dodatečně rozdrcen v třecí misce/sušený vzorek rozdrcen v třecí misce tloučkem. Poté bylo do plastové centrifugační zkumavky naváženo na analytických váhách 0,5 g homogenizovaného vzorku. K navážce bylo přidáno 20 ml rozpouštědla (deionizovaná voda, 50% ethanol, dimethylsulfoxid). Směs byla hodinu třepána na laboratorní třepače při 150 ot·min⁻¹ a poté centrifugována při 5 000 ot·min⁻¹ 10 min a teplotě 20 °C. Supernatant byl následně filtrován přes filtrační papír přímo do tmavé 50 ml vialky a následně přefiltrován přes mikrofiltr do tmavé vialky. Z každé léčivé rostliny byly paralelně přichystány vždy čtyři extrakty.

4.4.2 Stanovení koncentrace konkrétních fenolických sloučenin

Pro stanovení konkrétních fenolických sloučenin byl použit HPLC Agilent 1260 Infinity vybavený detektorem s diodovým polem s 10mm absorpční celou, autosamplerem s chlazením, kvarterní pumpou, kolonou, termostatem a degaserem. Individuální fenolické sloučeniny byly separovány na koloně Poroshell 120 Agilent EC-C18 (150 mm × 4,6 mm, velikost částic 2,7 nm) při teplotě 45 °C. Jako mobilní fáze byla použita směs složená z acetonitrilu (rozpuštědlo A) a 2,5% roztoku kyseliny mravenčí (v/v) (rozpuštědlo B). Použitý gradient mobilní fáze pro stanovení fenolických sloučenin byl: 92 % B, 0–25 min; 85 % B, 25–30 min; 88 % B, 30–45 min; 85 % B, 45–53 min; 80 % B, 53–56 min; 92 % B, 56–65 min.

Průtok mobilní fáze byl 0,75 ml·min⁻¹, objem nástřiku 3 μl a vlnové délky pro detekci analytů byly nastaveny na 280, 290, 330, 350 nm. Skenování bylo mezi 190 a 450 nm a data byla sbírána pomocí Agilent 1260 Infinity chromatografického data systému (Agilent Technologies, USA). Identifikace individuálních fenolických sloučenin byla založena na srovnání retenčního času a UV spektra neznámého píku s referenčními autentickými standardy. Kvantifikace individuálních fenolických sloučenin byla pomocí metody vnějšího standardu, za použití kalibrační přímky. Kalibrační přímky byly v kalibračním rozsahu 0–400 mg·l⁻¹. Měření bylo prováděno ve třech opakováních u každé koncentrace.

4.5 ICP-OES EXPERIMENTS

4.5.1 Příprava vzorků léčivých rostlin pro ICP-OES experimenty

Přibližně 3 g zmražených léčivých rostlin bylo rozmixováno v mixeru pomocí nerezových kotoučů. Následně byl vzorek nejmenno nasekán pomocí keramického nože a dodrcen v třecí misce, v případě sušených vzorků rozdrčen v třecí misce tloučkem. Poté bylo do plastové centrifugační zkumavky naváženo na analytických váhách 0,5 g homogenizovaného vzorku. K navážce bylo přidáno 20 ml rozpouštědla (deionizovaná voda, 50% ethanol, dimethylsulfoxid). Směs byla hodinu třepána na laboratorní třepačce a poté centrifugována při $5\,000\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ 10 min a teplotě 20 °C. Supernatant byl následně filtrován přes filtrační papír přímo do centrifugační zkumavky a poté přefiltrován přes mikrofiltr do plastové zkumavky.

4.5.2 Příprava vzorků půdy pro ICP-OES experimenty

3 g homogenizované vysušené půdy bylo naváženo na analytických vahách do 50ml Erlenmayerových baněk, k navážce bylo přidáno 21 ml kyseliny chlorovodíkové a 7 ml kyseliny dusičné. Suspenze byla třepána při $150\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ 16 hodin a poté byl obsah baněk kvantitativně zfiltrován do odměrné baňky a doplněn na celkový objem 100 ml deionizovanou vodou.

4.5.3 Stanovení minerálních látek pomocí ICP-OES

Pomocí ICP-OES Horiba Jobin Yvone, typ Ultima 2 (Horiba Scientific, France) bylo stanovováno 15 prvků v bylinných extraktech a 10 prvků ve vzorcích půdy. Výběr prvků vycházel z dostupných literárních zdrojů. Přístroj generoval plazmu v konfiguraci s radiálním uložením plazmového hořáku. Jako plazmový plyn a plyn pro proplach optické části byl využíván argon. Zařízení bylo spojeno s autosamplermem a čerpání vzorku do zmlžovače bylo realizováno peristaltickou pumpou. Vzorek byl zmlžován pomocí skleněného kónického zmlžovače zavedeného do cyklonické mlžné komory, přímo připojené do plazmového hořáku z křemenného skla. Zařízení standardně poskytovalo možnost kontinuálního skenování vlnových délek v rozsahu 160–800 nm s rozlišením 5 pm. Detekčním systémem byl duální fotonásobič s HDD (High dynamic detection system) systémem, který umožňoval měření v koncentračním rozsahu 10 řádů, díky online tuningu signálu během měření.

Pomocí ICP-OES bylo v bylinných extraktech měřeno 15 prvků (Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb, Zn). V případě vodných extraktů byly prvky Ca, K, Na, Mg a P měřeny separátní metodou (metoda 2) z důvodu relativně nízkého ionizačního potenciálu s ostatními měřenými prvky. V případě 50% ethanolu a DMSO byly prvky měřeny zároveň. U vzorků půd bylo sledováno 10 prvků (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn); vzorky půd byly po mineralizaci měřeny metodou 1. Optimalizace metody byla zaměřena na maximalizaci poměru signálu k šumu (Tab. 12 a 13) na charakteristických vlnových délkách. Vhodné vlnové délky pro měření byly zvoleny na základě studia Atlasu spektrálních interferencí pro ICP spektroskopii [302].

Extrakty léčivých rostlin byly analyzovány neředěné (vzorky v deionizované vodě) nebo byly před analýzou ředěny dvakrát (vzorky v 50% ethanolu) nebo čtyřikrát (vzorky v DMSO) pomocí deionizované vody, z důvodu snížení koncentrace organických rozpouštědel, které mohou způsobovat nestabilitu indukčně vázaného plazmatu. K zabránění tohoto jevu byl použit vyšší

průtok stínícího plynu. U vzorků půd byly mineralizáty měřeny neřaděné, příprava je uvedena v kapitole 4.5.2. Instrumentální nastavení pro jednotlivá rozpouštědla a mineralizáty půdy jsou uvedeny v Tab. 13.

Tab. 12: *Nastavení optické části ICP-OES*

Prvek	Vlnová délka	Vstupní štěrba μm	Výstupní štěrba μm
Al	396,152	20	15
As	193,695	20	15
Ca	422,673	20	15
Cd	214,488	20	15
Co	228,616	20	15
Cr	205,552	20	15
Cu	327,396	20	15
Fe	259,940	20	15
K	766,490	20	15
Mg	285,213	20	15
Mn	257,610	20	15
Na	588,995	20	15
P	213,618	20	15
Pb	216,999	20	15
Zn	206,191	20	15

Tab. 13 : *ICP-OES nastavení*

Parametr	Deionizovaná voda/mineralizáty		50% ethanol	DMSO
	Metoda 1	Metoda 2		
Výkon	1350 W	1350 W	1400 W	1350 W
Plazmový plyn	13 l·min ⁻¹	14 l·min ⁻¹	12,5 l·min ⁻¹	12,5 l·min ⁻¹
Pomocný plyn	0,1 l·min ⁻¹	0,1 l·min ⁻¹	0,1 l·min ⁻¹	0,1 l·min ⁻¹
Plyn nebuliseru	0,85 l·min ⁻¹	0,85 l·min ⁻¹	0,85 l·min ⁻¹	0,85 l·min ⁻¹
Stínící plyn	0,2 l·min ⁻¹	0,6 l·min ⁻¹	0,5 l·min ⁻¹	0,5 l·min ⁻¹
Tlak na nebuliseru	3 bar	3 bar	3 bar	3 bar

4.6 APLIKACE VYBRANÝCH LÉČIVÝCH ROSTLIN DO POTRAVIN

4.6.1 Vzorky léčivých rostlin pro aplikaci do sirupů

Pro aplikační část práce byly vybrány čtyři druhy léčivých rostlin. Na základě předešlých analýz byla vybrána meduňka lékařská, máta peprná, třezalka tečkovaná a šalvěj lékařská vzhledem k vysokým obsahům fenolických sloučenin, antioxidantů a vhodným senzoričtým vlastnostem (vůně/aroma). Vzorky léčivých rostlin dodala firma Calendula a.s. v množství 5 kg v sušené a drcené formě. Sušení probíhalo při teplotách do 30 °C a vzorky byly předupraveny pomocí mlýnu na velikosti části 1–5 mm. Vzorky byly uskladněny ve velkých papírových pytlech v suchém skladu. Každý pytel byl označen latinským názvem rostliny.

4.6.2 Příprava extraktů pro aplikaci do sirupů

V případě přípravné laboratorní části bylo z praktických důvodů naváženo 5 g dodaného materiálu do kádinky o objemu 250 ml, zalito 50 ml 25% ethanolu a ponecháno extrahovat různou dobu (30 minut, 1, 2, 4, 6, 8, 10 a 12 hodin). Poté byl extrakt přefiltrován přes čajové sítko do kádinky a využit k analýze. 25% ethanol byl zvolen (i) protože sensoricky neovlivňuje výsledný potravinářský výrobek, (ii) tato koncentrace je dostatečná pro zabezpečení mikrobiální stability extraktu. Časová výtěžnost extrakce byla testována v laborním měřítku, až poté v poloprovozním měřítku.

V poloprovozu byla extrakce vybraných bylin prováděna s 2 kg sušeného rostlinného materiálu na 20 l 25% ethanolu. Extrakce probíhala jen po zvolenou dobu z předešlého testování v laboratorních podmínkách. Po uplynutí stanovené doby byl materiál přefiltrován přes tkaninu do demižonu o objemu 15 l a uskladněn v chladicím boxu.

4.6.3 Testování extraktů v laboratorních a poloprovozních podmínkách

V rámci laboratorních testů byl testován vhodný poměr materiálu a 25% ethanolu. Byly testovány různé poměry 1:3, 1:5, 1:6, 1:9 a 1:10 rostlinného materiálu vůči rozpouštědлу. Následně byla ve zvoleném poměru ve zvolených intervalech (konkrétně po 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10 a 12 h) testována nasákavost materiálu a dále v časových intervalech (1, 2 a 4 h) výtěžnost extrakce při opakovaném zalití materiálu novým rozpouštědlem. Následně byla výtěžnost extrakce sledována při dlouhodobé extrakci materiálu za účelem výběru vhodné extrakční doby. Parametry pro ověření výtěžnosti extrakce byly radikál-zhášecí aktivita TEAC_{ABTS+} a barevné parametry L*, a* a b*.

V poloprovozním měřítku byla testována výtěžnost extrakce pouze po zvolenou dobu. V rámci této části práce byly testovány barevné charakteristiky L*, a* a b* s využitím UV-VIS-NIR a radikál-zhášecí aktivita pomocí ABTS testu za použití EPR (viz kapitoly 4.2.4 a 4.3.2). Takto vyrobené extrakty byly poté aplikovány pro výrobu jednodruhových a dvoudruhových sirupů.

4.6.4 Výroba sirupového základu a bylinných sirupů

Vzhledem k aplikaci extraktů do sirupů bylo nutné vyrobit sirupový základ (Obr. 5), který byl tvořen 65% roztokem sacharosy okyseleným kyselinou mléčnou, která na rozdíl od častěji využívané kyseliny citrónové má jemnější kyselou chuť. Příklad kyseliny mléčné byl před samotnou výrobou sirupového základu sensoricky zkoušen. Po sensorickém hodnocení byla zvolena koncentrace 2 g·l⁻¹. Nejprve byl roztok sacharosy a kyseliny mléčné na mírném plameni po dobu 4 hodin ohříván do kompletního rozpuštění a vyčeření. Takto připravený základ byl ihned aplikován do připravených vysterilovaných nádob dle zvolených poměrů, uzavřen víčkem a ponechán přes noc zcela vychladnut (Obr. 5).

Po vychladnutí byl k sirupovému základu přidáván zvláště lihový extrakt z máty, meduňky, třezalky a šalvěje. Extrakty byly přidávány ve třech různých poměrech u všech vybraných rostlin. Po smísení byly sirupy řádně protřepány, tak aby vznikl homogenní sirup (Obr. 6). Dvoudruhové sirupy byly pak vyráběny smísením jednodruhových sirupů ve zvolených poměrech, opět byly testovány 3 různé poměry.



Obr. 5: Výroba sirupového základu



Obr. 6: Vyrobené jednodruhové sirupy s přidavkem lihového extraktu (zleva) z meduňky, třezalky, máty a šalvěje

4.7 SENZORICKÉ HODNOCENÍ BYLINNÝCH NÁPOJŮ A SIRUPŮ

Vyrobené jednodruhové a dvoudruhové sirupy a z nich připravené nápoje byly sensoricky hodnoceny. Sensorické hodnocení probíhalo v zasedací místnosti Ústavu chemie potravin a biotechnologií na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně. Pro sensorické hodnocení bylo vybráno 40 hodnotitelů z řad studentů magisterského a doktorského studijního programu Fakulty chemické VUT v Brně, kteří absolvovali seminář sensorické analýzy a také úspěšně absolvovali základní sensorické zkoušky podle požadavků příslušných norem (ČSN ISO 5496, ČSN ISO 8586-1 a 2 a ČSN ISO 3972 [303-306]). Uspořádání sensorického pracoviště bylo v souladu s požadavky ČSN EN ISO 8589 [307]. Jednotlivé vzorky nápojů nebo sirupů značené třímístnými písmennými a číselnými kódy, byly hodnotitelům předkládány při laboratorní teplotě v plastových kelímcích o objemu 40 ml. Pro neutralizaci chuti byla podávána pitná voda.

Senzorické hodnocení bylo prováděno s využitím následujících sensorických zkoušek (testů): pořadové zkoušky (dle ČSN ISO 8587 [308]), profilového testu (dle ČSN EN ISO 13 299 [309]), hodnocení pomocí sedmibodové kategorové ordinální stupnice (dle ČSN ISO 4121 [310]) a párové porovnávací zkoušky (dle ČSN EN ISO 5495 [311]). V případě potřeby bylo hodnocení doplněno popisnou zkouškou. Celkem proběhly čtyři bloky sensorického testování.

Hlavním cílem prvního kola sensorické analýzy byl výběr optimální koncentrace přidavku bylinného extraktu k sirupovému základu pro každou testovanou léčivou rostlinu. Sirupové koncentráty byly k tomuto účelu připraveny ve třech různých poměrech pro každou ze čtyř bylinných příchutí, celkem tedy 12 vzorků. Hodnotitelům byly tyto vzorky předloženy

po desetinásobném naředění pitnou vodou, tedy ve formě hotového nápoje. Úkolem bylo přidělit jednotlivým koncentracím pořadí dle chutnosti/celkové přijatelnosti od nejlepšího vzorku po nejhorší (1 \Rightarrow 3) a pokusit se identifikovat příchuť nápoje. V rámci této analýzy bylo také zhodnoceno složení komise a dosavadní vztah hodnotitelů k nealkoholickým bylinným nápojům. Příslušný formulář uvádí Příloha 1.

Nápoje i sirupy s nejlepším hodnocením z předešlého kola byly ve druhé fázi sensorického hodnocení podrobněji analyzovány (Obr. 7). Nejprve byly hodnotitelům předloženy všechny druhy bylinných nápojů s nejlépe hodnoceným poměrem extraktu:sirupovému základu a tyto čtyři vzorky byly seřazeny od nejlepšího po nejhorší (1 \Rightarrow 4) dle chutnosti/celkové přijatelnosti. V další fázi byly vzorky nápojů podrobeny hodnocení vzhledu a barvy, vůně, chuti a celkové přijatelnosti, a to za použití sedmibodové kategorové ordinální stupnice hedonického typu (1 nepřijatelná \Rightarrow 7 vynikající). Následovala profilová zkouška chuti nápojů s použitím sedmibodové intenzitní stupnice (1 neznatelná \Rightarrow 7 velmi silná), kde byly posuzovány deskriptory sladká, kyselá, bylinná a trpká chuť. Stejné typy testů byly použity pro hodnocení samotných sirupových koncentrátů. Do hodnocení byla v tomto případě zahrnuta i textura, která může ovlivňovat přijatelnost sirupů, profilovým testem byla hodnocena také vůně, a vzhledem k tomu, že základem sirupů byly ethanolové extrakty, do profilového testu byly zařazeny deskriptory lihová chuť/vůně. Formulář vypracovaný pro druhé kolo analýzy je k nahlédnutí v Příloze 2.



Obr. 7: Připravené vzorky jednodruhových nápojů a sirupů pro sensorické hodnocení v druhém kole sensorické analýzy

Pro účely třetího bloku byly vytvořeny směsné dvoudruhové příchutě. Na základě sensorického hodnocení zkušenými hodnotiteli z řad pedagogů Fakulty chemické byl jako základ dvoudruhových sirupů vybrán šalvějový sirup, který byl smíchán s dalšími příchutěmi. Konkrétně byl vyroben sirup šalvějovo-mátový, šalvějovo-meduňkový a šalvějovo-třezalkový. Mísením tří různých poměrů šalvěje a druhé bylinné složky byly vytvořeny tři receptury pro každou příchutě, celkem tedy 9 vzorků. Desetinásobným ředěním vodou byly opět připraveny bylinné nápoje. Každá ze tří příchutěových řad byla následně podrobena pořadovému testu (1 nejlepší \Rightarrow 3 nejhorší) dle chutnosti/celkové přijatelnosti. Formulář určený pro třetí blok analýzy se nachází v Příloze 3.

Ve čtvrté fázi sensorické analýzy byly pořadovým testem seřazeny od nejlepší po nejhorší (1 \Rightarrow 3) tři uvedené dvoudruhové příchutě, přičemž byla vždy použita právě ta koncentrace, která

byla předchozím pořadovým testem ve třetím kole vybrána jako nejlepší. Následně byl párovou porovnávací zkouškou na základě barvy i chuti srovnán vždy tento nápoj s odpovídající variantou, připravenou s přidavkem aróniového koncentrátu (Obr. 8). Závěrem analýzy byl hodnotitelům předložen krátký spotřebitelský dotazník, který je rovněž součástí formuláře (Příloha 4).



Obr. 8: Připravené vzorky dvoudruhových nápojů s/bez přidavku aróniového koncentrátu

4.8 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Veškeré výsledky komplexní charakterizace léčivých rostlin byly zpracovány pomocí softwaru OriginPro v. 7.0 (MicroCalc, USA) a jsou vyjádřeny ve tvaru průměr \pm směrodatná odchylka ($n = 4$). Pro zjištění rozdílů mezi vzorky byla použita parametrická jednofaktorová analýza rozptylu metoda (ANOVA – Analysis of Variance) s využitím Tukeyho HSD-testu, které předcházelo ověření normality dat podle Studentova rozdělení. Za statisticky významné byly považovány rozdíly s hodnotou $P < 0,05$.

Vzhledem k velkému souboru dat byly výsledky zpracovány také metodami vícerozměrné statistiky, metodou hlavních komponent, faktorovou analýzou s rotací Varimax. Diskriminační analýza dat podle zvolených kritérií byla realizována pomocí kanonické diskriminační analýzy (CDA – Canonical Discriminant Analysis) a metodou k-tého nejbližšího souseda.

Výsledky sensorického hodnocení byly graficky zpracovány ve formě sloupcových a pavučinových grafů jako medián hodnocení všech hodnotitelů ($n = 40$). Výsledky hodnocení pomocí stupnic byly statisticky zpracovány Kruskal-Wallisovým testem a následně Nemenyiho vícenásobným párovým porovnáváním. Pořadová zkouška byla vyhodnocena na základě Friedmanova testu, párová porovnávací zkouška pomocí statistické tabulky dle ČSN EN ISO 5495. Pro zkoumání korelací mezi sensorickými znaky byla použita metoda hlavních komponent. Veškeré statistické testování bylo provedeno na hladině statistické významnosti $\alpha = 0,05$ s využitím statistického softwaru Unistat, v. 6.0 (Unistat, Velká Británie).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 KOMPLEXNÍ CHARAKTERIZACE LÉČIVÝCH ROSTLIN

V rámci komplexní charakterizace bylo testováno 10 druhů léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit (MU Brno, ZU Lednice), které byly produkovány v průběhu dvou let (2015, 2016) a posklizňově upravovány dvěma způsoby (zmražení, sušení). Kromě vlivu geografických, klimatických podmínek a posklizňových úprav byl také testován vliv technologického zpracování, konkrétně použitých extrakčních systémů (deionizovaná voda, 50% ethanol a DMSO) na izolaci funkčních složek léčivých rostlin.

Celkem bylo testováno 39 parametrů – konkrétně 4 parametry antioxidační aktivity (celkový obsah fenolických látek, celkový obsah flavonoidů, antioxidační aktivita s využitím kation radikálu ABTS^{•+} a antioxidační/prooxidační aktivita s využitím systému DMPO/K₂S₂O₈, 6 barevných parametrů (barevné parametry L*, a*, b*, C*, h° a BI), 14 konkrétních fenolických sloučenin (obsah gallové, chlorogenové, kávové, *p*-kumarové, ferulové, sinapové, vanilové kyseliny, katechinu, rutinu, kvercetin, myricetinu, hesperidinu, naringinu a luteolinu) a 15 minerálních látek (Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb, Zn) u všech extraktů léčivých rostlin.

Cílem bylo (i) posoudit vliv geografických, klimatických podmínek a technologických operací na obsah funkčních složek léčivých rostlin; (ii) vybrat vhodné technologické zpracování (způsob úpravy léčivé rostliny a extrakčního rozpouštědla) a vhodné druhy léčivých rostlin pro následnou aplikaci do potravin.

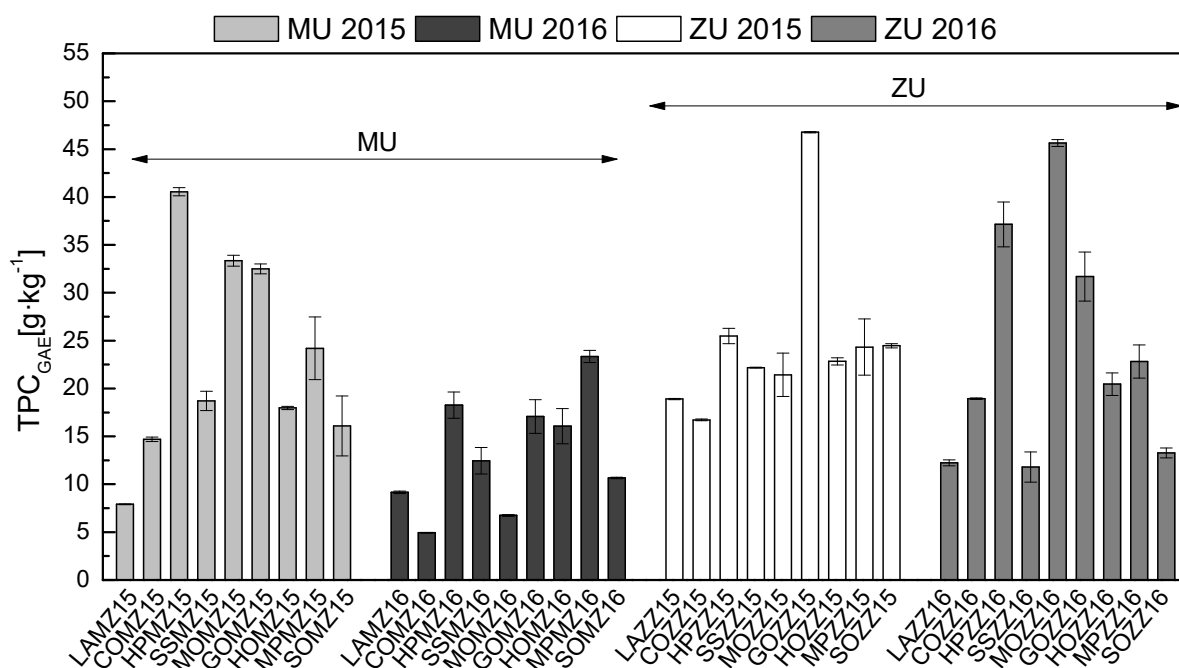
S ohledem na velké množství a variabilitu získaných experimentálních údajů byla všechna data zpracována metodou ANOVA a vícerozměrnými statistickými metodami s cílem diferencovat a klasifikovat léčivé rostliny podle zvolených kritérií – původ, rok produkce, posklizňová úprava a extrakční systém.

5.1.1 Vliv extrakčních podmínek na celkový obsah fenolických látek

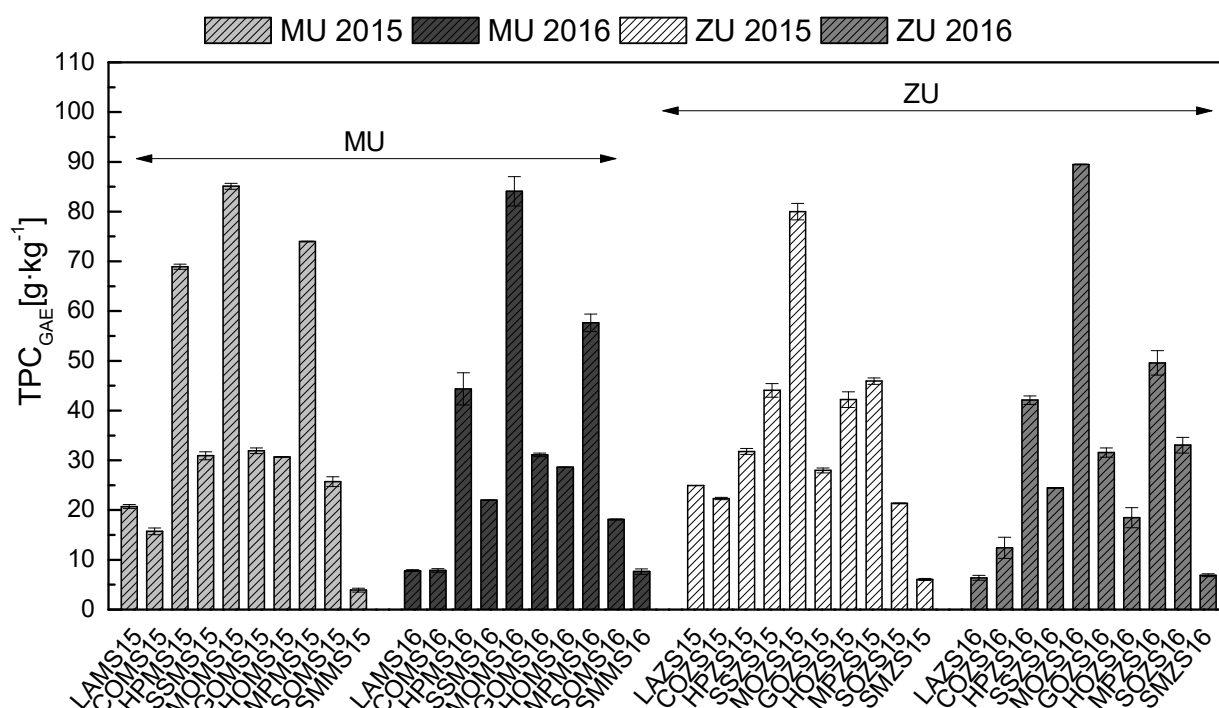
Řada vědeckých studií potvrzuje, že fenolické sloučeniny jsou dominantní biologicky aktivní sloučeniny s antioxidační aktivitou u většiny léčivých rostlin. Celkový obsah fenolických sloučenin se proto efektivně využívá jako rychlá screeningová metoda pro zjištění obsahu fenolických látek i pro ověření korelací s testy antioxidační aktivity. Celkový obsah fenolických sloučenin byl stanoven Folin Ciocalteauo metodou. Kvantifikace byla provedena na základě kalibrační přímky (Obr. 3) a výsledky vyjádřeny jako GAE – Gallic Acid Equivalent.

Vodné extrakty

Celkový obsah fenolických sloučenin stanovený ve vodných extraktech připravených ze zmražených respektive sušených léčivých rostlin je uveden na Obr. 9 a 10. Ze získaných výsledků je zřejmá značná variabilita v obsahu TPC u konkrétních léčivých rostlin, která je dána druhovými rozdíly. TPC se pohyboval u zmražených vzorků pocházejících z MU v roce 2015 v rozmezí od 7,9 do 43,3 g·kg⁻¹, v roce 2016 od 4,9 do 23,3 g·kg⁻¹ a u vzorků pocházejících ze ZU v roce 2015 v rozmezí 18,9–46,8 g·kg⁻¹ a v roce 2016 v rozmezí 12,2–45,6 g·kg⁻¹.



Obř. 9: Celkový obsah fenolických sloučenin ve vodných extraktech připravených ze zmražených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10



Obř. 10: Celkový obsah fenolických sloučenin vodných extraktů připravených ze sušených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

V případě sušených vzorků byly zaznamenány vyšší hodnoty TPC, konkrétně u vzorků pocházejících z MU z roku 2015 v rozmezí 3,9–85,1 g·kg⁻¹, v roce 2016 v rozmezí 7,6–84,1 g·kg⁻¹ a u vzorků pocházejících ze ZU v roce 2015 v rozmezí 6,0–79,9 g·kg⁻¹ a v roce 2016 v rozmezí 6,4–89,5 g·kg⁻¹. Pomocí ANOVY byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi zmraženými a sušenými vzorky ($P = 0,0038$), kdy byly do analýzy zahrnuty oba roky produkce i obě lokality, ukazující významný vliv posklizňových operací na obsah TPC. Nižší obsahy TPC v případě zmražených vzorků mohou být způsobeny tím, že v průběhu zmrazení může dojít k narušení a poškození rostlinných buněk působením enzymů, substrátů a aktivátorů [312]. Mohou být také očekávány nevratné změny v membránových strukturách během zmrazení. Dále může docházet ke krystalizaci v mezibuněčném prostředí, kdy kapalná fáze s nízkou vazebnou energií zamrzne a dochází tak ke zvýšení koncentrace elektrolytů. Vzhledem k rozdílné koncentraci elektrolytů uvnitř a vně buněk dochází k prudkému poklesu enzymů, kyselin a dalších buněčných složek. Poškození způsobené tvorbou krystalů je ovlivněno hlavně rychlostí zmrazení, konečnou teplotou a velikostí zmrazené rostliny [313, 314]. Obdobný trend, kdy zmražené vzorky měly nižší obsahy TPC, byl zaznamenán i u vzorků oregana [315] a čajovníku [316]. Dále je možné, že v případě sušených vzorků dochází k lepší prostupnosti rozpouštědla do materiálu než u vzorků zmražených.

Při porovnání vzorků v rámci lokalit (MU Brno vs. ZU Lednice) jsou na první pohled zřejmé jisté rozdíly v obsahu TPC, kdy výraznější rozdíly jsou u vzorků zmražených. Pomocí ANOVY byly zjištěny vyšší obsahy TPC u zmražených vzorků pocházejících ze ZU v obou sledovaných letech, avšak statisticky významné rozdíly byly pouze u vzorků produkovaných v roce 2016 ($P = 0,0302$). U sušených vzorků jsou rozdíly mezi lokalitami nevýznamné v obou letech produkce. V případě statistické analýzy zahrnující všechny roky produkce a způsoby zpracování však rozdíly mezi institucemi nebyly jednoznačně potvrzeny, což může naznačovat jisté podobnosti lokalit. Vzhledem k faktu, že lokality jsou od sebe vzdáleny 50 km, lze uvažovat, že klimatické podmínky jsou velmi podobné.

Některé studie potvrzují, že především hlavně teplota a množství srážek mají vliv na obsah TPC v rostlinách [317-320]. Obě instituce, které poskytly vzorky pro analýzu, poskytly také meteorologická data. V centru léčivých rostlin MU v Brně byla v letech 2015 a 2016 naměřena průměrná teplota 17,5/17,3 °C a množství srážek 193,7/250,2 mm; v botanické zahradě Zahradnické univerzity v Lednici teplota 17,7/17,2 °C a množství srážek 193,1/308,3 mm. Z meteorologických dat je zřejmé, že průměrná teplota byla velmi podobná v rámci obou produkčních let i institucí, rozdíly byly pouze v množství srážek, kdy v ZU v Lednici bylo v roce 2016 zaznamenáno vyšší množství srážek. Nepatrné rozdíly v obsahu TPC mohou tedy být dány do souvislosti s rozdílnými environmentálními podmínkami: hlavně počasím, množstvím slunce, příp. kvalitou půdy v jednotlivých zahradách.

Ze získaných výsledků jsou na první pohled patrné jisté rozdíly mezi produkčními roky. ANOVA analýza potvrdila, že rok 2015 byl charakteristický vyššími obsahy TPC oproti roku 2016 u obou lokalit, zahrnující oba způsoby posklizňových úprav, avšak i v tomto případě tento rozdíl nebyl ze statistického hlediska významný. Z výše zmíněných meteorologických dat je zřejmé, že rok 2016 byl charakteristický vyšším množstvím srážek a nižšími teplotami, které mohly mít vliv na obsah TPC. Z analyzovaných vzorků jsou bohatým zdrojem TPC vzorky z čeledi Lamiaceae (MO, MP), Hypericaceae (HP), Fabaceae (GO), naopak vzorky z čeledi Astaraceae (CO, SM)

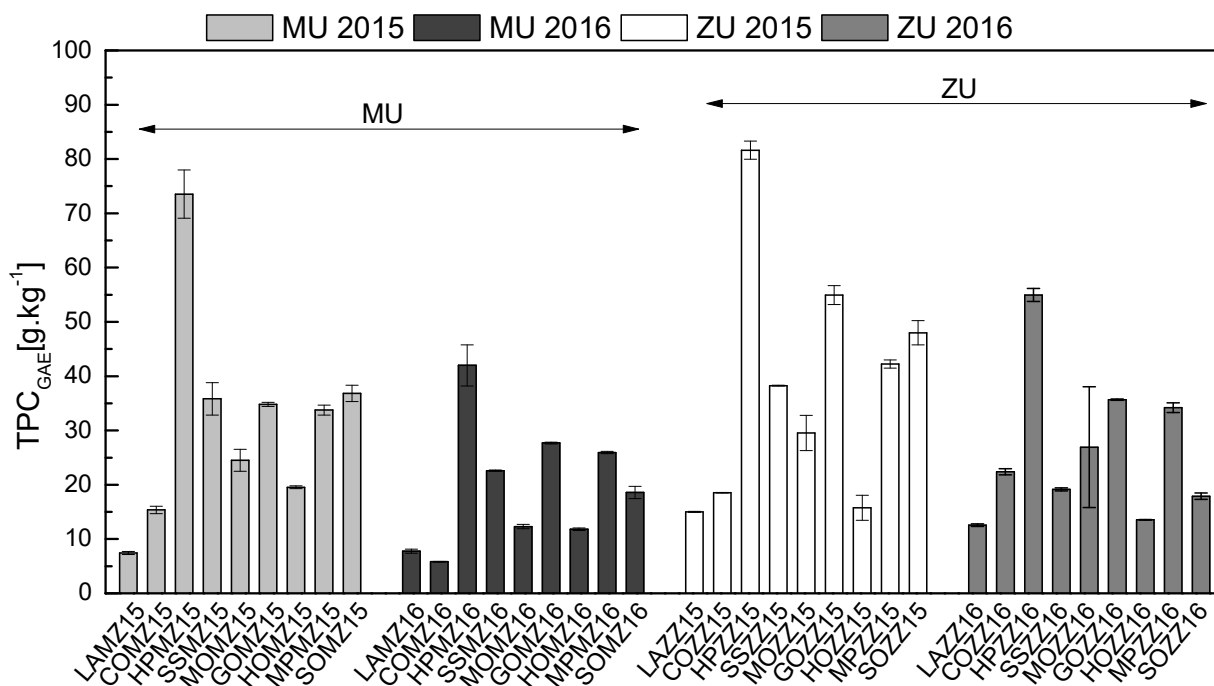
vykazují nízký obsah TPC. Někteří autoři potvrzují, že léčivé rostliny z čeledi Lamiaceae mají vysoký obsah fenolických sloučenin [321-324]. Navíc bylo zjištěno, že především třezalka a jeřábina jsou dobrým zdrojem fenolických sloučenin a mají vysokou antioxidační aktivitu [47, 194, 325].

Ethanolové extrakty

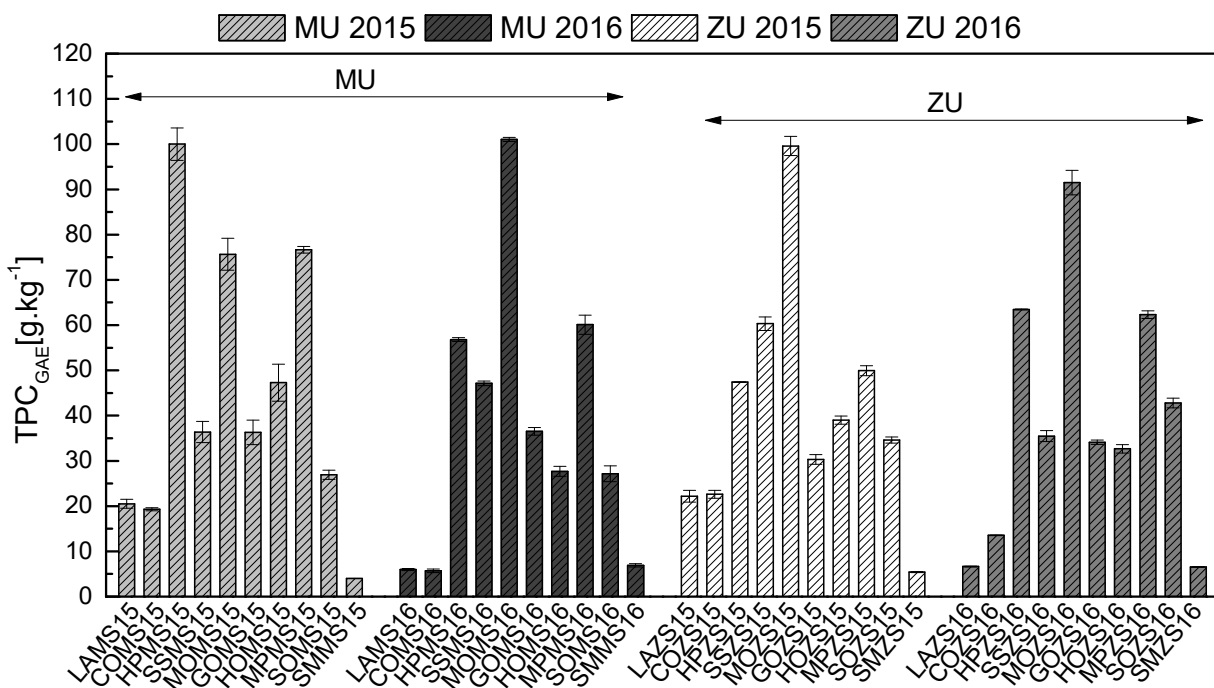
Průměrný celkový obsah fenolických sloučenin (Obr. 11, 12 a Příloha 5) je ze statistického hlediska u ethanolových extraktů vyšší ve srovnání s vodnými extrakty. Do analýzy byly zahrnuty všechny roky produkce, obě instituce i oba způsoby zpracování ($P = 0,0486$). Pozorované rozdíly souvisí především s charakterem jednotlivých rozpouštědel. S ohledem na hodnoty relativní permitivity vody a ethanolu (tabelovaná hodnota při 25 °C $\epsilon_{H_2O} = 78,3$ a $\epsilon_{ETOH} = 24,3$) [326], lze pozorované rozdíly dát do souvislosti s rozdílnou polaritou rozpouštědel. V případě ethanolových extraktů, vzhledem k nižší polaritě oproti vodným extraktům, došlo pravděpodobně k extrakci i méně polárních sloučenin. Vyšší obsahy TPC u ethanolových extraktů mohly být způsobeny také možnou tvorbou komplexů některých fenolických sloučenin. Tyto mohou mít více fenolových skupin nebo vyšší molekulovou hmotnost než fenolické sloučeniny ve vodných extraktech [327]. Výsledky jsou v souladu s výsledky TPC u podobných studií meduňky lékařské [243] šalvěje lékařské [328] a bahnatky voňavé [327].

Obdobně jako u vodných extraktů byly zjištěny statisticky vyšší obsahy TPC u sušených vzorků oproti zmraženým ($P = 0,0333$) při zahrnutí obou roků produkce a lokalit, ukazující, že agronomické a technologické postupy mají velký vliv na kvalitu léčivých rostlin. V případě geografických faktorů (vliv lokalit) byly zjištěny kopírující trendy s vodnými extrakty, kdy vyšší obsahy TPC byly zjištěny u ZU u zmražených vzorků v průběhu obou produkčních let. Stejný trend jako u vodných extraktů byl zachován v rozdílech mezi produkčními roky, kdy opět byly zjištěny vyšší obsahy TPC v roce 2015. Geografické a klimatické faktory však ze statistického hlediska nebyly významné, i když ANOVA umožnila určit, které vzorky mají vyšší obsahy TPC.

V rámci jednotlivých druhů byly u zmražených vzorků zjištěny vyšší obsahy TPC u HP, GO a MP, naopak nižší u vzorků HO, CO a LA. V případě sušených vzorků je trend odlišný, kdy vyšší obsahy byly zaznamenány u MO, MP, HP, naopak nižší u vzorků CO, LA a SM. Obsah TPC se u ethanolových extraktů snižoval v následujícím pořadí: $HP > GO > MP > SS > SO > MO > HO > CO > LA$ u zmražených a $MO > MP > HP > SS > GO > HO > SO > CO > LA$ a SM sušených vzorků léčivých rostlin. Obdobně jako u vodných extraktů čeledi Lamiaceae, Hypericaceae, Fabaceae mají i v ethanolových extraktech vyšší obsahy TPC než čeleď Astaraceae (kde zařazujeme druhy CO a SM). Studie Sytara a kol. [324] a Garcio-Risca [240] potvrzují naše výsledky, že čeleď Lamiaceae má vyšší obsahy TPC než čeleď Astaraceae.



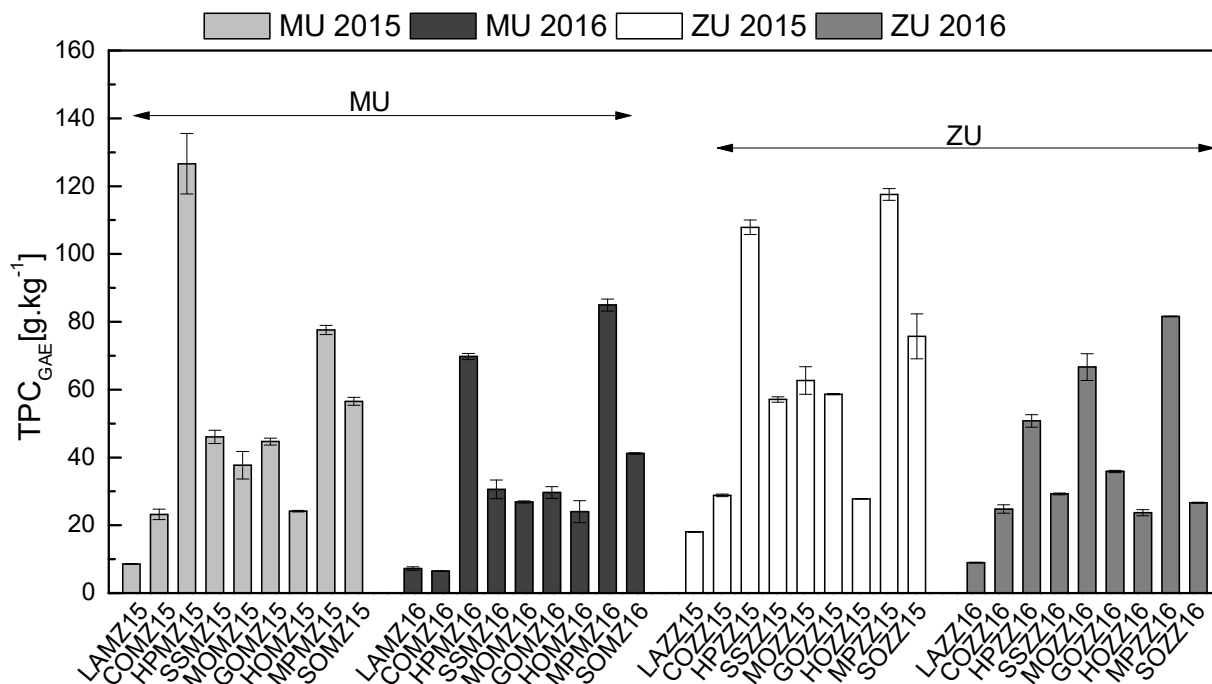
Obř. 11: Celkový obsah fenolických sloučenin v ethanolových extraktech připravených ze zmražených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10



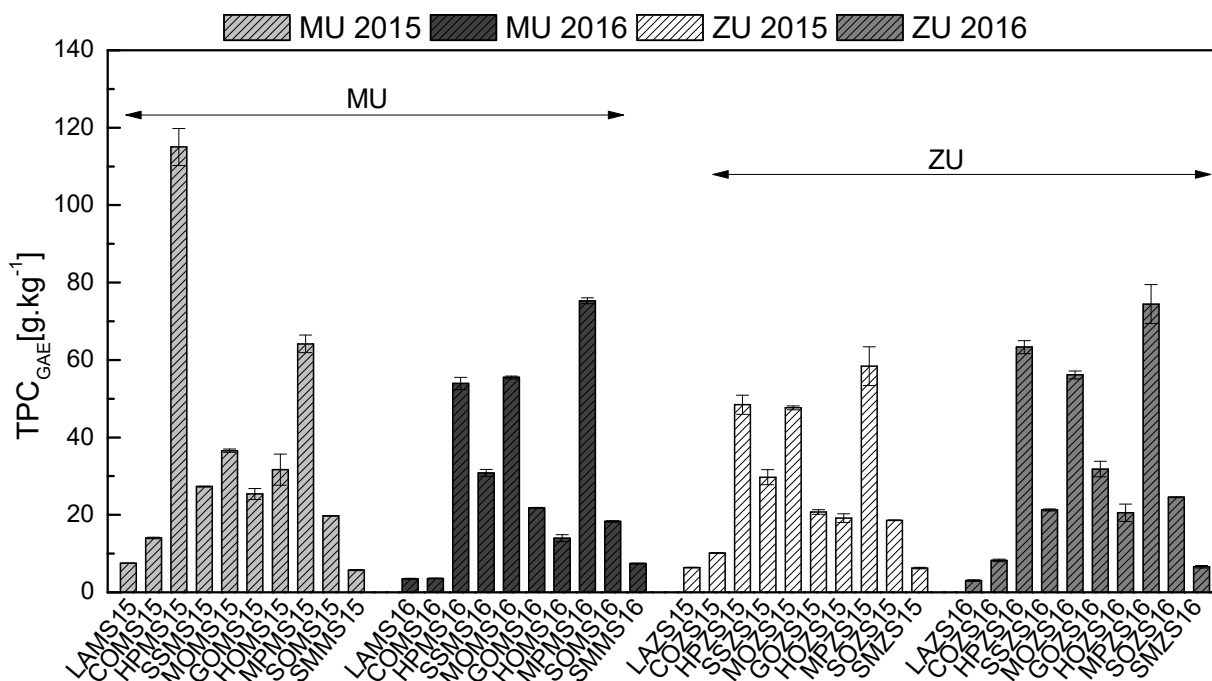
Obř. 12: Celkový obsah fenolických sloučenin v ethanolových extraktech připravených ze sušených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

Extrakt v DMSO

Získané výsledky celkových obsahů fenolických sloučenin pro extrakt v DMSO jsou uvedeny na Obr. 13 a 14.



Obr. 13: Celkový obsah fenolických sloučenin DMSO extraktů připravených ze zmražených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit a produkováných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10



Obr. 14: Celkový obsah fenolických sloučenin DMSO extraktů připravených ze sušených léčivých rostlin, pocházejících ze dvou různých lokalit a produkováných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

V případě porovnání hodnot TPC u DMSO extraktů s ethanolovými a vodnými extrakty byly zjištěny u zmražených vzorků v DMSO statisticky vyšší obsahy TPC oproti ethanolovým ($P = 0,0020$) i vodným extraktům ($P = 0,0000$), zahrnující obě instituce i roky produkce. Obsah TPC u zmražených vzorků byl v pořadí $\text{DMSO} > 50\% \text{ ETOH} > \text{H}_2\text{O}$, ukazující (Příloha 5), že polární aprotické rozpouštědlo (DMSO), umožňující extrakci jak polárních tak nepolárních sloučenin, je z hlediska výtěžnosti TPC u vzorků s obsahem vody vhodnější než protická rozpouštědla (voda, 50% ethanol), která přednostně extrahují polární sloučeniny. Podobný trend byl zaznamenán u zmražených a následně lyofilizovaných vzorků citrusové kůry [145] a zmražených vzorků arónie a muchovníku [329, 330]. U sušených vzorků však byl u obou institucí i roků produkce trend odlišný, TPC se snižoval v pořadí $50\% \text{ ETOH} > \text{H}_2\text{O} > \text{DMSO}$ (Příloha 5), kdy protická rozpouštědla byla vhodnější pro extrakci fenolických sloučenin. Rozdíly v extrakčních systémech však byly v případě statistické analýzy u sušených vzorků nevýznamné, naznačující jisté podobnosti v extrakční účinnosti. Drobné rozdíly, které zaznamenala ANOVA, mohou být dány polaritou rozpouštědla, ale mohou také souviset se specifickými vlastnostmi vody (tvorba vodíkových můstků, dipólových interakcí atd.) [331].

U DMSO extraktů však byly zjištěny v rámci posklizňových úprav opačné trendy oproti ethanolovým a vodným extraktům. Statisticky vyšší obsahy byly zaznamenány u zmražených vzorků ($P = 0,0139$) při zahrnutí obou roků a lokalit, ukazující, že pravděpodobně méně polární sloučeniny budou více citlivé na vyšší teploty. DMSO je také vhodným extrakčním systémem pro extrakci chlorofylových barviv [332], které jsou např. citlivé k degradaci při vyšších teplotách [316, 333]. Otázkou také je, vzhledem k limitacím TPC testu, do jaké míry další chemické sloučeniny (proteiny, cukry, aminy, kyselina askorbová) [205] v extratech ovlivňují stanovení TPC. V případě vlivu lokalit byly zjištěny kopírující trendy s protickými rozpouštědly (vodou i 50% ethanolem), kdy vyšší obsahy TPC byly zjištěny u ZU u zmražených vzorků v průběhu obou produkčních let. V roce 2015 byly zaznamenány vyšší obsahy TPC u zmražených a sušených vzorků u obou institucí. Opět však vliv lokality a ročníkové skladby na obsah TPC byl ze statistického hlediska nevýznamný.

Obsah TPC se u DMSO extraktů snižoval v následujícím pořadí: $\text{MP} > \text{HP} > \text{SO} > \text{MO} > \text{GO} > \text{SS} > \text{HO} > \text{CO} > \text{LA}$ u zmražených $\text{MP} > \text{HP} > \text{MO} > \text{GO} > \text{HO} > \text{SO} > \text{CO} > \text{LA} > \text{SM}$ u sušených vzorků léčivých rostlin. Ve všech rozpouštědlech bylo potvrzeno, že čeledě Lamiaceae (MP, MO) Hypericeae (HP) a Fabaceae (GO) mají vyšší obsahy TPC než čeleď Astaraceae (CO, SM).

5.1.2 Vliv extrakčních podmínek na obsah celkových flavonoidů

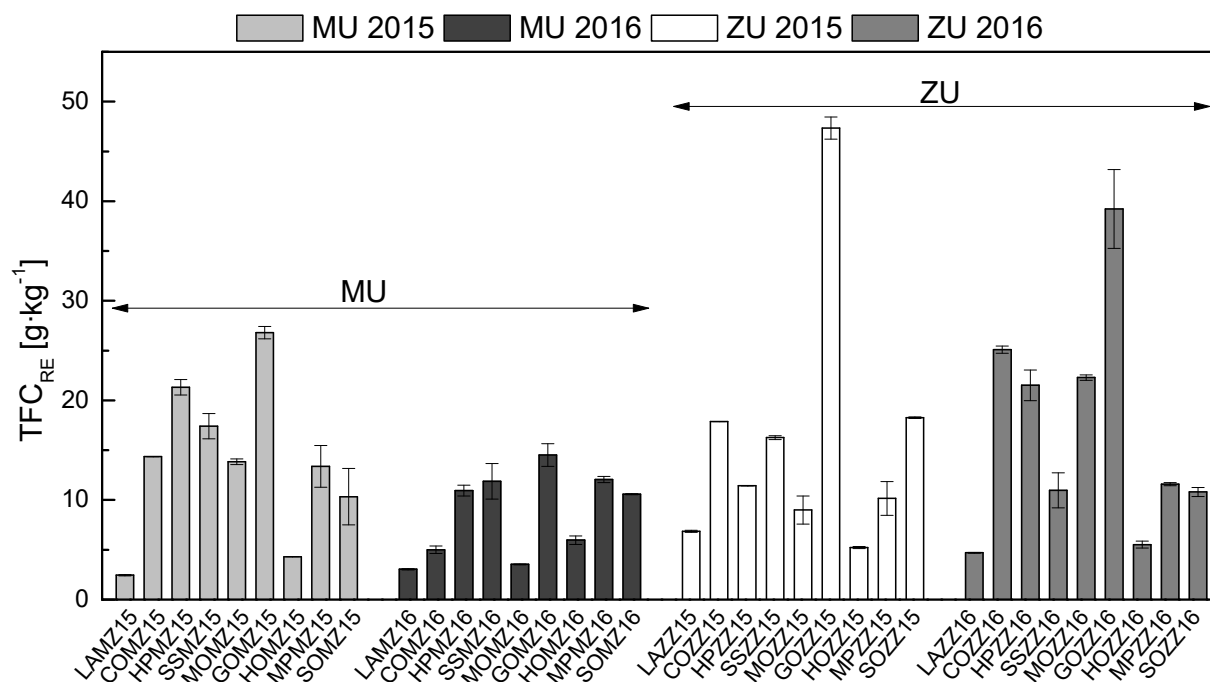
Celkový obsah flavonoidů v připravených extraktech byl stanoven pomocí 2-aminoethyl-difenylborátu, kvantifikace byla provedena na základě kalibrační přímky (Obr. 4) a výsledky byly vyjádřeny jako rutin ekvivalent.

Vodné extrakty

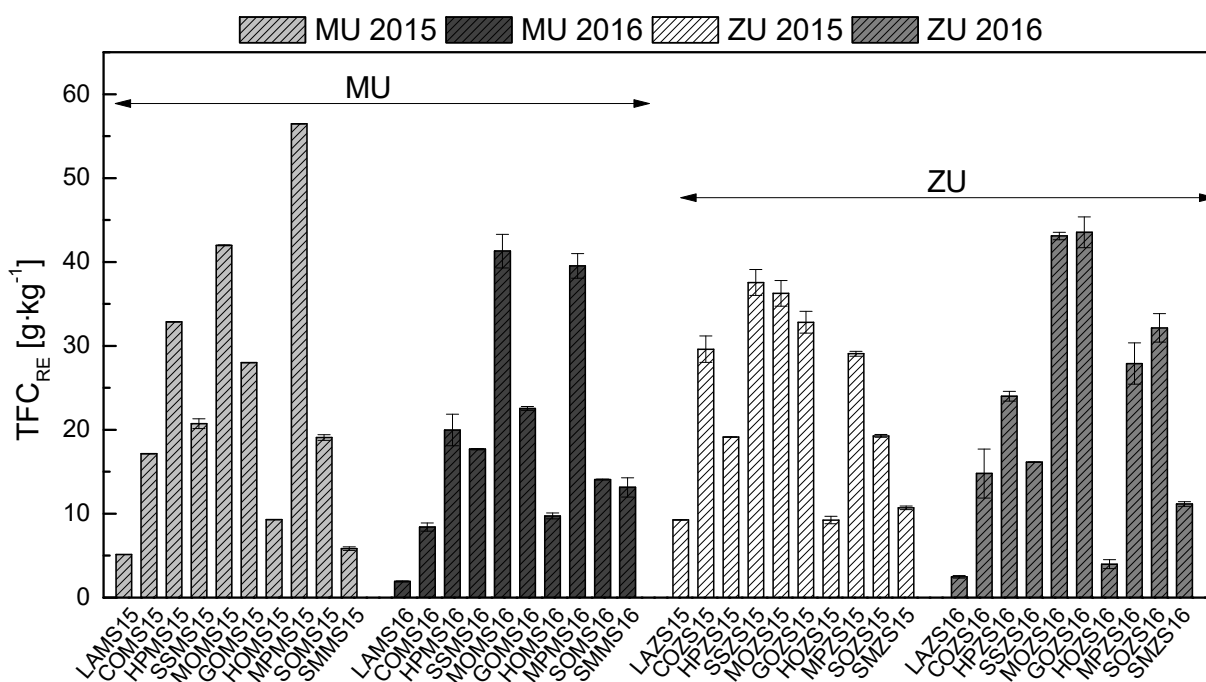
Hodnoty TFC se pohybovaly u zmražených vzorků ve vodných extraktech pocházejících z MU v roce 2015 v rozmezí 2,5–26,8 g·kg⁻¹, v roce 2016 v rozmezí 3,0–14,5 g·kg⁻¹ a u vzorků pocházejících ze ZU v roce 2015 v rozmezí 5,2–47,3 g·kg⁻¹ a v roce 2016 v rozmezí 4,7–39,2 g·kg⁻¹ (Obr. 15 a 16).

U sušených vzorků byly zaznamenány statisticky vyšší hodnoty TFC bez ohledu na instituci a rok produkce ($P = 0,0038$). TFC se pohyboval u sušených vzorků pocházejících z MU z roku 2015 v rozmezí 5,1–56,2 g·kg⁻¹, v roce 2016 v rozmezí 1,9–41,3 g·kg⁻¹ a u vzorků pocházejících ze ZU v roce 2015 v rozmezí 9,2–37,6 g·kg⁻¹ a v roce 2016 v rozmezí 2,5–43,5 g·kg⁻¹. U sušených vzorků pravděpodobně při vysušení došlo k inhibici peroxidasy a polyfenoloxidas, kdežto v případě zmražených vzorků byly tyto enzymy v průběhu zpracování rostlin, zmražování či opětovném rozmražení vzorků aktivní, což způsobilo vyšší pokles fenolických sloučenin, mj. i flavonoidů [334, 335]. Obsahy flavonoidů jsou ve srovnání s celkovými obsahy fenolických sloučenin nižší; ale zároveň jsou to převládající fenolické sloučeniny. Zaujímají ve vodných extraktech jednotlivých druhů léčivých rostlin (u zmražených i sušených) přibližně 40 až 75 % z celkových fenolických sloučenin. Korelační analýza potvrdila silné korelace mezi obsahem TPC a TFC ve vodných extraktech ze zmražených ($R_{\text{TPC/TFC}} = 0,7282$) respektive sušených ($R_{\text{TPC/TFC}} = 0,8005$) bylin v případě, že analýza byla provedena bez ohledu na instituci a rok produkce, potvrzující fakt, že flavonoidy jsou skupinou fenolických sloučenin [336].

V případě geografických faktorů (vliv lokalit na TFC) byly zjištěny kopírující trendy s vodnými extrakty jako v případě parametru TPC. Vyšší obsahy TFC byly zjištěny u ZU u zmražených vzorků v průběhu obou produkčních let. Stejný trend byl také zachován v rozdílech mezi produkčními roky, kdy opět byly zjištěny vyšší obsahy TFC v roce 2015. Geografické a klimatické faktory však ze statistického hlediska také u parametru TFC nebyly významné, naznačující velmi podobné klimatické a geografické podmínky v botanických zahradách. V rámci jednotlivých druhů léčivých rostlin byl u vodných extraktů ze zmražených léčivých rostlin zjištěn vysoký obsah TFC u GO, HP a SS a v případě sušených léčivých rostlin u MP, MO, HP a GO, naopak nižší obsahy TFC byly zjištěny u LA, HO a SM.



Obr. 15: Celkový obsah flavonoidů ve vodných extraktech připravených ze zmražených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

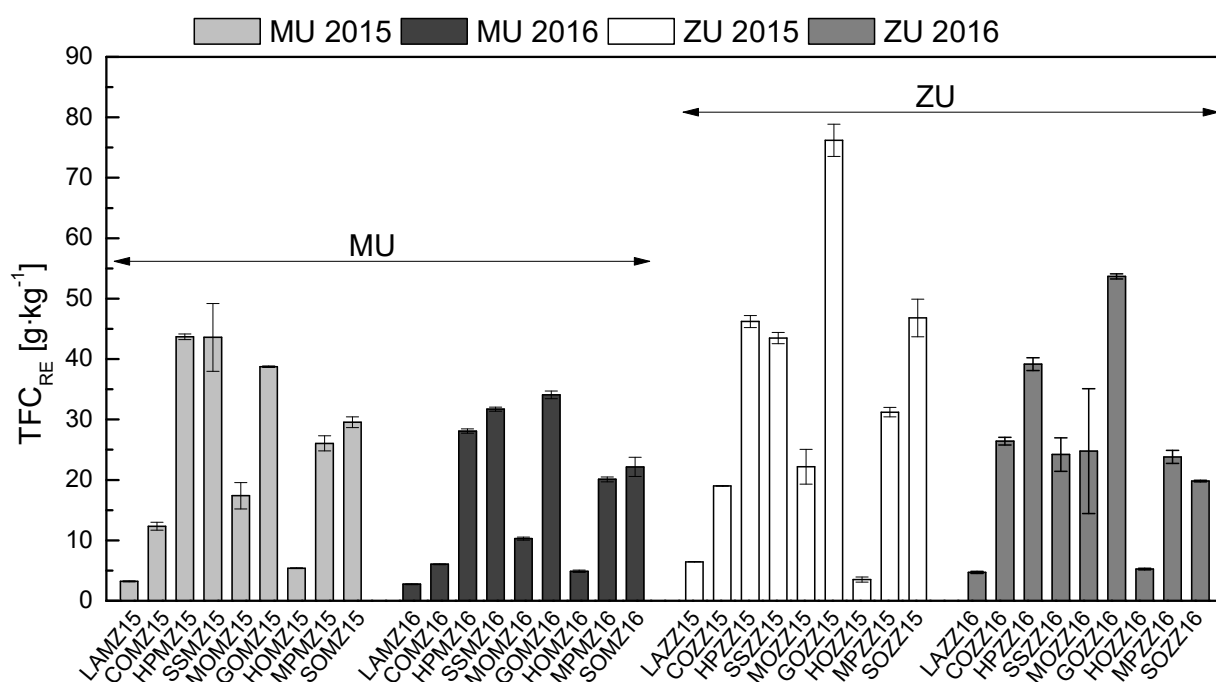


Obr. 16: Celkový obsah flavonoidů ve vodných extraktech připravených ze sušených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

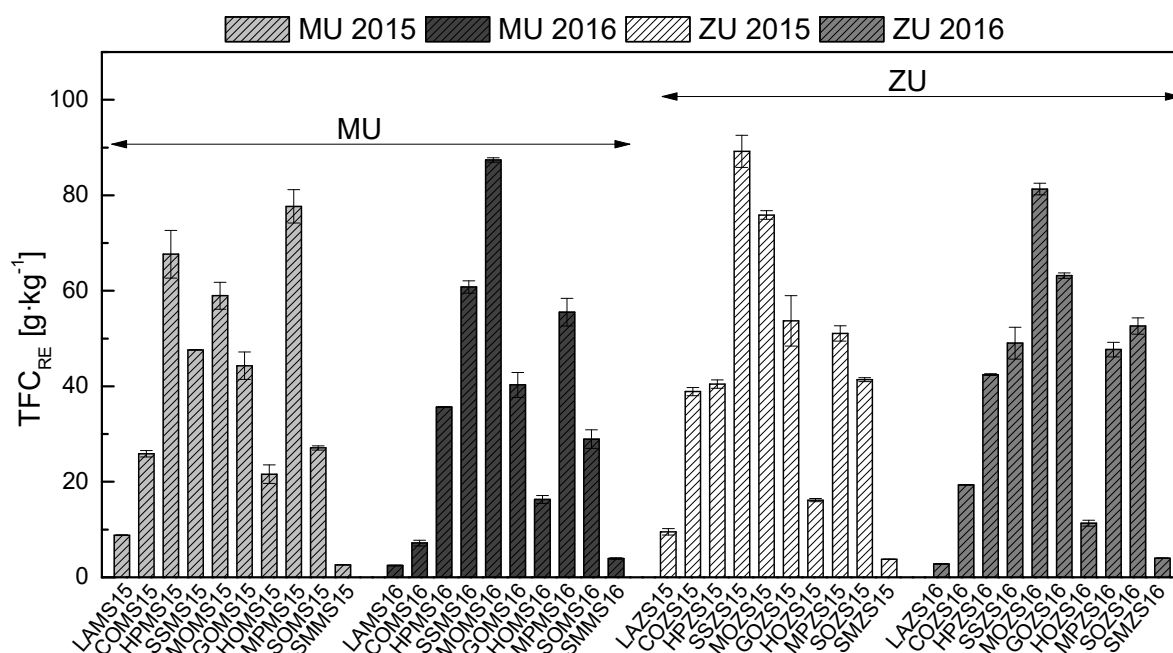
Ethanolové extrakty

Obdobně jako v případě TPC byl 50% ethanol (Obr. 17, 18 a Příloha 6) statisticky účinnějším extrakčním činidlem pro extrakci flavonoidů než voda ($P = 0,0004$), v případě, že analýza byla provedena bez ohledu na způsob zpracování, instituci a rok produkce. Publikované práce potvrzují, že směsi organických rozpouštědel jsou účinnější než čistá voda pro extrakci flavonoidů [327, 330, 337]. Rozdíly v rámci těchto systémů jsou detailně komentovány v kapitole 5.1.1. Způsob zpracování významně ovlivňoval také obsahy TFC v ethanolových extraktech a obdobně jako u vodných extraktů, statisticky na tom byly lépe sušené vzorky léčivých rostlin ($P = 0,0132$). Korelační analýza potvrdila silné korelace mezi obsahem TPC a TFC také v ethanolových extraktech ze zmražených ($R_{\text{TPC/TFC}} = 0,7994$) respektive sušených ($R_{\text{TPC/TFC}} = 0,8516$) bylin v případě, že analýza byla provedena bez ohledu na instituci a rok produkce. Pearsonovy korelační koeficienty u ethanolových extraktů však byly vyšší oproti vodným extraktům, což může souviset s lepší extrakční účinností v případě ethanolových extraktů.

V rámci rozdílů mezi stanovišti byly zjištěny u ethanolových extraktů vyšší obsahy TFC u vzorků ze ZU v Lednici v případě obou roků produkce i způsobů zpracování. Dle očekávání v případě porovnání roků produkce byly zjištěny vyšší obsahy TFC v roce 2015 ve srovnání s rokem 2016, naznačující nepatrný vliv počasí na obsah TFC. Ze statistického hlediska však tyto rozdíly byly zanedbatelné a lokality i roky produkce velmi podobné. GO, HP, SS a SO měly vysoké obsahy TFC v případě úpravy mražením, a MO, SS a GO při úpravě sušením u obou institucí i v rámci produkčních let.



Obr. 17: Celkový obsah flavonoidů v ethanolových extraktech připravených ze zmražených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10



Obr. 18: Celkový obsah flavonoidů v ethanolových extraktech připravených ze sušených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

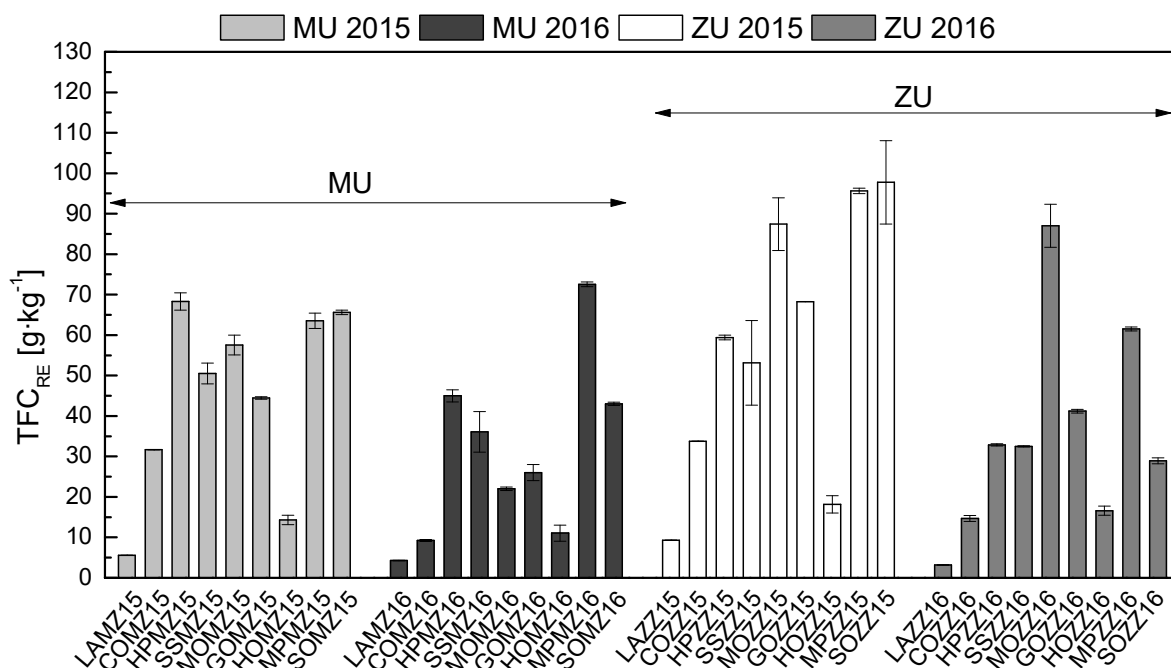
Extrakt v DMSO

Výsledky stanovení celkových obsahů flavonoidů pro extrakt v DMSO jsou shrnuty na Obr. 19 a 20. Obsah TFC se u DMSO extraktů snižoval v následujícím pořadí: MP > MO > SO > HP > GO > SS > CO > HO > LA u zmražených MO > SS > MP > GO > SO > HP > CO > HO > LA > SM u sušených vzorků léčivých rostlin. U všech rozpouštědel bylo potvrzeno, že čeledě Lamiaceae, Hypericeae a Fabaceae mají vyšší obsahy TFC než čeleď Astaraceae.

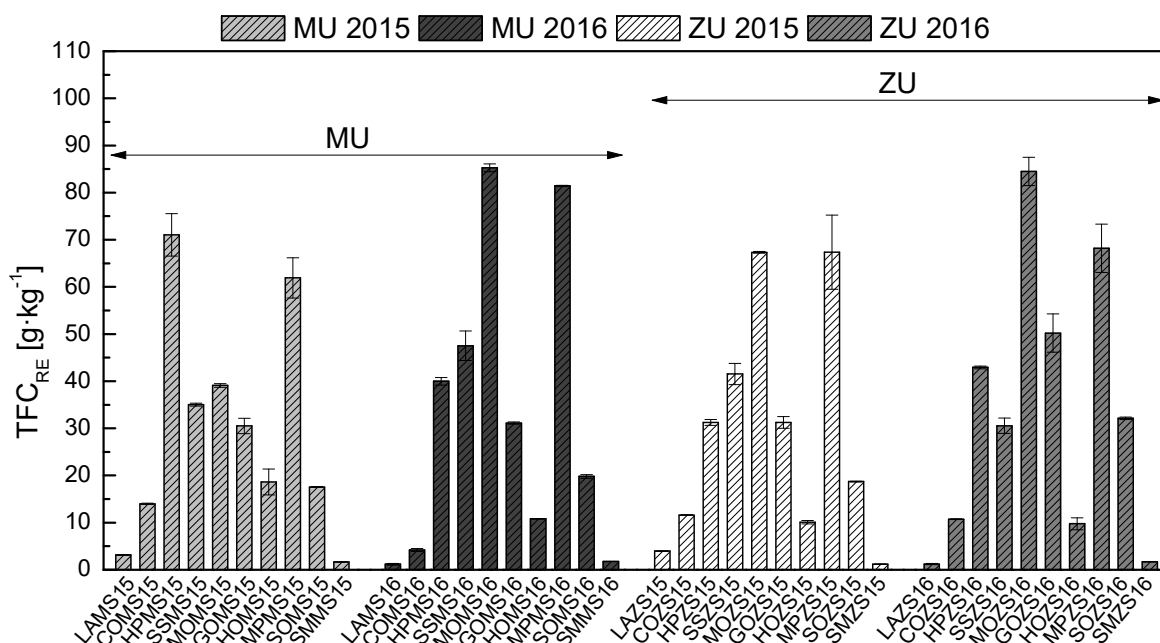
V případě porovnání hodnot TFC u DMSO extraktů s ethanolovými a vodnými byly zjištěny u zmražených vzorků v DMSO statisticky vyšší obsahy TFC oproti vodným ($P = 0,0000$) i ethanolovým extraktům ($P = 0,0009$), zahrnující obě instituce i roky produkce. Obsah TFC u zmražených vzorků byl tedy v pořadí DMSO > 50% ethanol > H₂O (Příloha 6), což kopíruje trendy s TPC. V případě sušených vzorků bylo pořadí 50% ethanol > DMSO > H₂O (Příloha 6), ale statisticky významné rozdíly byly pouze mezi 50% ethanol a vodou ($P = 0,0058$). DMSO a 50% ethanol ve všeobecnosti byly vhodnějšími systémy pro extrakci flavonoidů u obou posklizňových úprav ve srovnání s vodou.

Způsob zpracování významně ovlivňoval také obsahy TFC v DMSO extraktech, kdy obdobně jako u TPC mražení bylo vhodnější úpravou pro tento extrakční systém. Obdobně jako u ostatních rozpouštědel i v DMSO byly zaznamenány silné korelace mezi obsahem TPC a TFC u zmražených ($R_{\text{TPC/TFC}} = 0,8334$) respektive sušených ($R_{\text{TPC/TFC}} = 0,8582$) bylin. Statistická analýza byla provedena bez ohledu na instituci a rok produkce. U DMSO byly tyto korelace nejsilnější, u sušených vzorků byly ve všech rozpouštědlech korelace vyšší ve srovnání se zmraženými vzorky. Při porovnání TFC u jednotlivých institucí – vzorky ze ZU byly charakteristické vyššími obsahy TFC a to jak u zmražených, tak sušených bylin. V případě roků produkce byly vyšší obsahy TFC v roce 2015 u zmražených i sušených vzorků, tyto rozdíly

můžeme dát také do souvislosti s rozdílným počasím, nebo také s manipulacemi s rostlinami během sklizně a po sklizni. Avšak ze statistického hlediska regionální a klimatické faktory byly i u DMSO nevýznamné.



Obr. 19: Celkový obsah flavonoidů v DMSO extraktech připravených ze zmražených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10



Obr. 20: Celkový obsah flavonoidů v DMSO extraktech připravených ze sušených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

5.1.3 Vliv extrakčních podmínek na barevné charakteristiky

Barevné koordináty L^* , a^* , b^* byly naměřené pomocí UV-VIS-NIR spektrofotometru použitím zdroje osvětlení Illuminant D65. Z těchto charakteristik pak byly vypočítány další tři barevné parametry: chromaticita C^* , úhel barevného odstínu h° a index hnědnutí BI. Vzhledem k velkému množství parametrů majících vliv na vlastnosti extraktů byla získaná data statisticky zpracována jednorozměrnou metodou ANOVA a metodami korelační analýzy s cílem sledování jednotlivých rozdílů nebo vzájemných vztahů jednotlivých experimentálních parametrů na vlastnosti extraktů.

Vodné extrakty

Hodnoty barevných parametrů vodných extraktů léčivých rostlin připravených ze zmražených a sušených vzorků zahrnující oba roky produkce jsou pro vzorky pocházející z MU prezentovány v Příloze 7 a pro vzorky ze ZU v Příloze 8.

Jak vyplývá z naměřených výsledků, při porovnání chromatické složky L^* vodných extraktů ze zmražených a sušených bylin, hodnoty L^* u sušených vzorků jsou statisticky nižší než u zmražených vzorků ($P = 0,0002$), ukazující (a potvrzující senzorické pozorování), že extrakty ze sušených bylin byly tmavší. Tyto rozdíly jsou hlavně způsobeny vyšší vlhkostí u zmražených vzorků, která měla následně vliv na světlost extraktů. Podobný fenomén vyšší tmavosti extraktů ze sušených bylin byl již dříve zaznamenán některými autory, např. při konvenčním sušení v sušárně u vzorků máty peprné, rozmarýny a meduňky lékařské [284, 338-340]. Dále byly zjištěny jisté rozdíly v L^* hodnotách u jednotlivých institucí i roků produkce, i když i u tohoto parametru nebyly tyto rozdíly statisticky významné. Bylo zjištěno, že extrakty ze ZU jsou tmavší a také vzorky z roku 2015 jsou charakteristické vyšším obsahem barviv.

V případě barevné koordináty a^* byly u většiny zmražených vzorků zjištěny kladné hodnoty, což ukazuje dominantní zastoupení červené barvy, která je způsobena pravděpodobně přítomností anthokyanů nebo betalainů [341]. U sušených vzorků naopak byly zjištěny záporné hodnoty a^* značící, že se také extrahují zelená chlorofylová barviva. Když vezmeme do úvahy rozdíly v hodnotách a^* mezi zmraženými a sušenými vzorky ve vodných extraktech, tak nepatrně vyšší hodnoty byly zjištěny u zmražených vzorků, avšak ze statistického hlediska tento rozdíl nebyl významný ($P = 0,2253$). Při porovnání výsledků vzorků z jednotlivých institucí a roků produkce byly zjištěny vyšší hodnoty a^* u ZU a rok 2016 byl také charakteristický vyššími hodnotami a^* , ze statistického hlediska však tyto rozdíly byly opět nevýznamné.

Pokud jde o hodnoty b^* , ve všech extraktech dosahovaly kladných hodnot, značící dominantní žlutou barvu extraktů, která je ovlivněna především přítomností karotenoidů, xantofylů, flavonoidů a chlorofylu b [341]. V rámci posklizňových úprav byly zjištěny statisticky vyšší hodnoty b^* u sušených vzorků ve srovnání se vzorky zmraženými ($P = 0,0000$). Vyšší hodnoty b^* byly zjištěny u vzorků pocházejících ze ZU a rok 2015 byl z hlediska tohoto parametru na tom lépe, i když statisticky tyto rozdíly opět nebyly významné.

Hodnoty chromaticity byly statisticky vyšší u extraktů ze sušených léčivých rostlin v porovnání se zmraženými ($P = 0,0000$), což značí, že extrakty ze sušených bylin mají sytější barvu s nedostatkem barvy šedé. O účincích sušení na parametr C^* léčivých rostlin existují protichůdné údaje. Někteří autoři dospěli k podobnému závěru, např. Rubinskiene a kol. [340] pro listy máty peprné sušené aktivním větráním při 22 °C, zatímco jiní dospěli k opačným závěrům, např. Agryropoulos a Müller [338] pro listy meduňky lékařské sušené konvenčně v sušárně při 30 °C.

Tyto nesrovnalosti mohou vyplývat ze všech faktorů ovlivňujících kompozici výše uvedených rostlin. V rámci geografie a ročníkové skladby byly trendy kopírující s výsledky s parametrem b^* .

Jako nejvhodnější parametr pro zjištění vizuálních změn v rostlinném materiálu se osvědčil úhel barevného odstínu, který byl dříve použit pro popis barevných změn u sušených vzorků třezalky tečkované [342], meduňky lékařské [338, 343], máty peprné [340] a pelyňku estragonu [344]. Hodnoty h° byly statisticky vyšší u sušených vzorků léčivých rostlin v porovnání se zmraženými ($P = 0,0064$). Z výsledků je patrný přechod ze žluté, světle zelené v případě zmražených vzorků, ke světle zelené a tmavě zelené u sušených vzorků, naznačující, že u sušených vzorků došlo pravděpodobně k lepší prostupnosti vody do materiálu a účinnější extrakci chlorofylových barviv. Geografické a ročníkové rozdíly u h° byly také statisticky nevýznamné.

Pro zjištění počátečního procesu hnědnutí v léčivých rostlinách byl z barevných charakteristik vypočten index hnědnutí. Ze získaných výsledků prezentovaných v Příloze 7 a 8 byly zjištěny statisticky vyšší hodnoty BI u extraktů sušených ve srovnání s extrakty zmražených léčivých rostlin ($P = 0,0001$), ukazující počáteční hnědnutí u tepelně ošetřených vzorků. Nicméně z výsledků je zřejmé, že hodnoty BI u sušených vzorků jsou relativně nízké. Výsledky dokazují, že sušení studeným vzduchem při teplotách do $30\text{ }^\circ\text{C}$ může být akceptovatelné pro konzervaci léčivých rostlin i z hlediska kvality. Světová zdravotnická organizace dokonce doporučuje pro ošetření léčivých rostlin pro průmyslové aplikace teploty do $30\text{ }^\circ\text{C}$ [7]. Z hlediska kvality byly vzorky z MU charakteristické nižšími hodnotami BI ve srovnání se ZU a zároveň u vzorků z roku 2016 se více projevoval proces hnědnutí.

Vzájemná korelace barevných parametrů vodných extraktů byla stanovena pomocí Pearsonovy korelační metody. Korelační koeficienty jsou uvedeny v Tab. 14 zvláště pro vodné extrakty ze zmražených a sušených léčivých rostlin. Z uvedených údajů vyplývá, že existuje velmi silná korelace mezi parametry C^* a b^* , naznačující, že sytost a intenzita barvy je ovlivněna zastoupením žluté barvy ve vodných extraktech. Podobný trend byl dříve pozorován ve studii Karamuckiho a kol. [345]. Dále byly zjištěny velmi silné korelace u obou způsobů zpracování u indexu hnědnutí s chromaticitou C^* a chromatickou složkou b^* , kdy pravděpodobně tyto parametry významně ovlivňují hnědnutí vzorků. Dokonce u extraktů ze sušených vzorků, u kterých byly zjištěny vyšší hodnoty BI, byly zaznamenány střední korelace BI s chromatickou složkou a^* , naznačující, že parametr a^* má také vliv na hnědnutí u sušených vzorků. Dále byly zjištěny silné inverzní korelace mezi světlostí L^* a parametry a^* , b^* , C^* a BI u vodných extraktů ze sušených léčivých rostlin, ukazující že tmavost extraktů bude ovlivněna těmito parametry.

Celkově korelační schopnost byla prokazatelnější u extraktů ze sušených léčivých rostlin ve srovnání s extrakty ze zmražených léčivých rostlin. Vzhledem k tomu, že barevné charakteristiky se nepřepočítávají na suchou hmotu, lze tyto rozdíly dát do souvislosti s rozdílným obsahem vody ve vzorcích.

Tab. 14: Pearsonovy korelace barevných proměnných dle způsobu zpracování u vodných extraktů léčivých rostlin

<i>Zmražené vzorky léčivých rostlin</i>						
	L*	a*	b*	C*	h°	BI
L*	1					
a*	-0,2939	1				
b*	-0,4695	0,1137	1			
C*	-0,4658	0,1210	0,9993	1		
h°	0,3728	-0,6191	-0,1230	-0,1327	1	
BI	-0,5263	0,3784	0,9626	0,9638	-0,2854	1
<i>Sušené vzorky léčivých rostlin</i>						
	L*	a*	b*	C*	h°	BI
L*	1					
a*	-0,7891	1				
b*	-0,8286	0,5870	1			
C*	-0,8300	0,5831	0,9999	1		
h°	0,5490	-0,8391	-0,4784	-0,4718	1	
BI	-0,8651	0,6599	0,9953	0,9949	-0,5321	1

Ethanolové extrakty

Při porovnání barevných charakteristik u protických rozpouštědel (voda, 50% ethanol) bylo zjištěno, že 50% ethanol vykazoval statisticky nižší hodnoty u barevných parametrů a*, b*, C* a BI, naopak ve srovnání s vodou byly parametry L* a h° významně vyšší u 50% ethanolu. Ethanolové extrakty byly více čiré a charakteristické menší intenzitou zbarvení. V případě chromatické složky a* byly hodnoty u většiny léčivých rostlin v záporných hodnotách, naznačující, že dominantně se v 50% ethanolu extrahují chlorofylová barviva. Pouze u třezalky (HP) a ostropestřce (SM) byly hodnoty kladné. U třezalky, vzhledem k tomu, že byla analyzována celá nať, bude chromatická složka a* ovlivněna jak přítomností chlorofylových barviv, tak i červeného barviva hypericinu [346]. Obdobně jako u vodných extraktů je v ethanolových extraktech dominantní zastoupení žlutých barviv (b* hodnoty jsou kladné), výsledky jsou v souladu s předešlými studiemi [347, 348].

Ze získaných výsledků (Příloha 9 a 10), při porovnání barevných parametrů z hlediska posklizňových úprav, byly zjištěny podobné trendy jako u vodných extraktů, statisticky vyšší hodnoty parametrů b*, C* a BI a statisticky nižší hodnoty u světlosti L* a a* byly zjištěny u sušených vzorků ve srovnání se zmraženými vzorky, naznačující, že extrakty ze sušených léčivých rostlin byly tmavší, sytější, ale vzhledem k vyšší teplotě ošetření docházelo více k hněhnutí léčivých rostlin. U parametru h° nebyly rozdíly v rámci posklizňových úprav významné, i když u obou parametrů byly nižší hodnoty u sušených vzorků. Z tabulky v Příloze 10 je zřejmé, že u většiny léčivých rostlin docházelo k barevným změnám v důsledku sušení od tmavě zelené ke světle zelené, u levandule dokonce ze světle zelené až do červené oblasti. Tyto výsledky jsou v souladu s předešlými publikovanými pracemi, ve kterých bylo zjištěno, že během sušení dochází u listů léčivých rostlin k barevným změnám ve směru od tmavší zelené ke světle zelené, způsobeným degradací chlorofylových barviv, která je doprovázena hněhnutím vzorků [343].

Teplota sušení je jednou z hlavních příčin degradace barviv [338, 349]. Hodnoty h° se všeobecně pohybovaly v tmavě zeleném kvadrantu pro zmražené léčivé rostliny a postupně přecházely do světle zeleného až žlutého kvadrantu pro sušené vzorky, indikující počáteční destrukci barviv, která vede až k hnědnutí. Hnědnutí u ethanolových extraktů ze sušených léčivých rostlin bylo potvrzeno (hodnoty BI byly vyšší u sušených vzorků). U ethanolových extraktů z léčivých rostlin byly zaznamenány jisté rozdíly v rámci jednotlivých lokalit. Ethanolové extrakty z léčivých rostlin ze ZU měly vyšší hodnoty b^* , C^* a BI a nižší hodnoty L^* a a^* , naznačující, že vzorky byly tmavší, sytější, obsahovaly více žlutých barviv a více se u nich projevvalo hnědnutí, ze statistického hlediska však rozdíly mezi lokalitami nebyly významné. Rozdíly u barevných parametrů v ethanolových extraktech v rámci roků produkce byly také nevýznamné.

Obdobně jako u vodných extraktů byly zjišťovány vzájemné vztahy mezi jednotlivými barevnými parametry pomocí korelační analýzy (Tab. 15).

Tab. 15: Pearsonovy korelace barevných proměnných dle způsobu zpracování u ethanolových extraktů léčivých rostlin

<i>Zmražené vzorky léčivých rostlin</i>						
	L^*	a^*	b^*	C^*	h°	BI
L^*	1					
a^*	-0,4761	1				
b^*	-0,2467	-0,5230	1			
C^*	-0,3322	-0,4712	0,9909	1		
h°	0,5674	-0,9018	0,2048	-0,1733	1	
BI	-0,5030	-0,1560	0,9235	0,9366	-0,1680	1
<i>Sušené vzorky léčivých rostlin</i>						
	L^*	a^*	b^*	C^*	h°	BI
L^*	1					
a^*	-0,0706	1				
b^*	-0,5676	-0,4695	1			
C^*	-0,5559	-0,4993	0,9993	1		
h°	0,1008	-0,6274	0,3338	0,3429	1	
BI	-0,6369	-0,2722	0,9772	0,9694	0,2100	1

V souladu s očekáváním byly dosaženy silné korelace mezi parametry C^* a chromatickou složkou b^* a dále mezi BI a C^* i chromatickou koordinátou b^* u ethanolových extraktů ze zmražených i sušených léčivých rostlin, obdobně jako u vodných extraktů. Dále byly zjištěny střední inverzní korelace mezi světlostí L^* a parametry b^* , C^* a BI u ethanolových extraktů ze sušených léčivých rostlin, ukazující že tmavost extraktů bude ovlivněna těmito parametry. Stejně jako u vodných extraktů byla korelační schopnost prokazatelnější u extraktů ze sušených léčivých rostlin ve srovnání s extrakty ze zmražených léčivých rostlin, tyto rozdíly mohou být způsobeny jednak rozdílným obsahem vody, ale i rozdílnou skladbou jednotlivých složek extraktů.

Extrakt v DMSO

Při porovnání barevných parametrů v rámci jednotlivých extrakčních systémů pomocí ANOVY bylo zjištěno, že DMSO se jeví jako nejvhodnější rozpouštědlo pro extrakci barviv. Ze všech rozpouštědel vykazoval DMSO statisticky nejvyšší hodnoty barevných parametrů b^* , C^* , h° a BI, naopak hodnoty světlosti L^* a chromatické složky a^* byly u DMSO ve srovnání s protickými rozpouštědly významně nižší. DMSO extrakty byly nejtmavší, nejsytější, s nejvyšším zastoupením žluté barvy a zároveň se v DMSO nejvíce extrahovala chlorofylová barviva (chromatická složka a^* byla nejvíc záporná). Vhodnost použití DMSO pro extrakci chlorofylů je dobře dokumentována v literatuře [332, 350].

Ze získaných výsledků (Příloha 11 a 12) byly zjištěny podobné trendy jako u ethanolových extraktů při porovnání barevných parametrů z hlediska posklizňových úprav. Vyšší hodnoty parametrů b^* , C^* a BI a nižší hodnoty světlosti L^* , parametru a^* a h° byly zjištěny u sušených vzorků ve srovnání se zmraženými vzorky, naznačující, že extrakty ze sušených léčivých rostlin byly tmavší, sytější, avšak vzhledem k vyšší teplotě ošetření docházelo více k hněhnutí. ANOVA umožnila určení rozdílů mezi způsobem zpracování, rozdíly v rámci posklizňových operací však byly v DMSO u všech barevných parametrů statisticky nevýznamné. V případě lokalit rozdíly mezi MU a ZU také nebyly významné, ale ve všeobecnosti extrakty ze zmražených léčivých rostlin ze ZU byly tmavější, sytější s vyšším odstínem žluté, avšak u DMSO extraktů sušených vzorků byly tyto trendy opačné, DMSO extrakty ze sušených léčivých rostlin z MU byly z hlediska barevných parametrů na tom lépe. Rozdíly u barevných parametrů v DMSO extraktech v rámci roků produkce nebyly významné, i když ve všeobecnosti rok 2015 byl charakteristický vyššími hodnotami barevných charakteristik.

V souladu s očekáváním byly dosaženy silné korelace mezi parametry C^* a chromatickou složkou b^* a dále mezi BI a C^* i chromatickou koordinátou b^* , u DMSO extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin stejně jako u vodných a ethanolových extraktů (viz Tab. 16). Obdobně jako u protických rozpouštědel byly zjištěny silné a střední inverzní korelace mezi světlostí L^* a parametry b^* , C^* a BI u DMSO extraktů ze zmražených i sušených léčivých rostlin, ukazující že tmavost DMSO extraktů bude ovlivněna těmito parametry. U DMSO extraktů sušených vzorků byly zjištěny střední korelace chromatické složky a^* se světlostí L^* , kdy zastoupení červeného a zeleného tónu bude mít u této úpravy vliv na světlost DMSO extraktů. Z korelační tabulky lze také vyčíst, že inverzně silně koreluje parametr a^* s parametry b^* , C^* a BI, které mají významně vliv na tmavost extraktů.

Tab. 16: Pearsonovy korelace barevných proměnných dle způsobu zpracování u DMSO extraktů léčivých rostlin

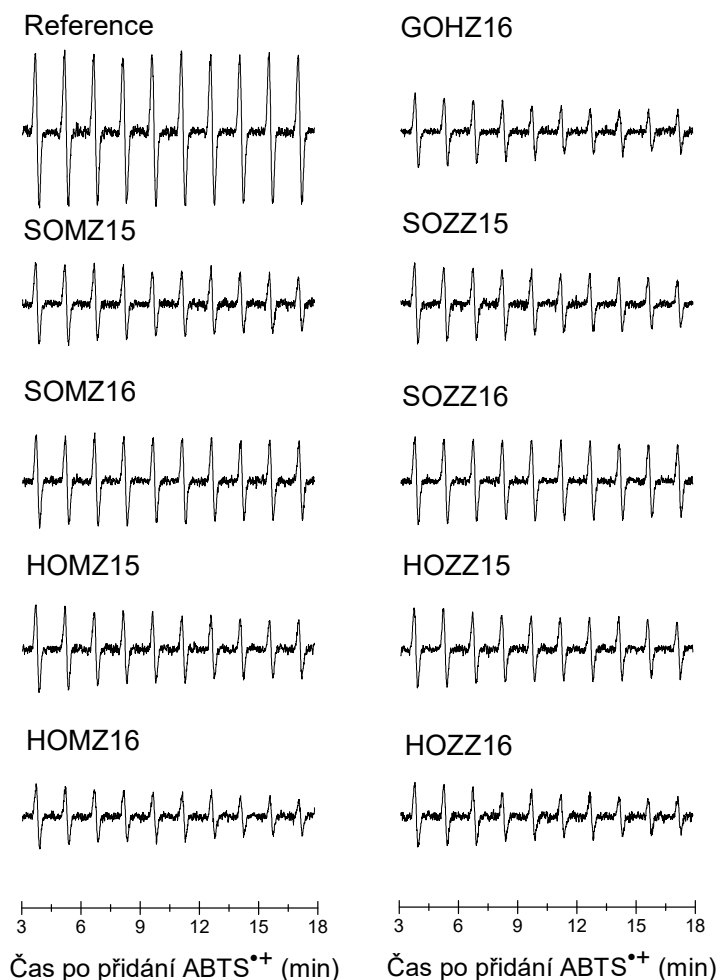
<i>Zmražené vzorky léčivých rostlin</i>						
	L*	a*	b*	C*	h°	BI
L*	1					
a*	0,3934	1				
b*	-0,7504	-0,6253	1			
C*	-0,7557	-0,6250	0,9847	1		
h°	0,1795	-0,6260	-0,1344	-0,1214	1	
BI	-0,7529	-0,4127	0,9684	0,9520	-0,3580	1
<i>Sušené vzorky léčivých rostlin</i>						
	L*	a*	b*	C*	h°	BI
L*	1					
a*	0,6630	1				
b*	-0,6820	-0,9527	1			
C*	-0,6814	-0,9592	0,9997	1		
h°	-0,4796	-0,6271	0,5260	0,5339	1	
BI	-0,6791	-0,9140	0,9918	0,9891	0,4487	1

5.1.4 Vliv extrakčních podmínek na radikál-zhášecí aktivitu

Radikál-zhášecí aktivita extraktů byla testována s využitím kation radikálu ABTS^{•+}. Byl měřen soubor 10 spekter se začátkem ve třetí minutě po přidání roztoku ABTS^{•+} do systému. Jako referenční systém bylo použito příslušné extrakční činidlo (deionizovaná voda, 50% ethanol, DMSO). EPR spektrum kation-radikálu ABTS^{•+} tvoří za použitých experimentálních podmínek (velikost modulační amplitudy 0,05 mT) singlet s pološířkou čáry $\Delta B_{pp} \sim 1,2$ mT, $g = 2,0036$.

Vodné extrakty

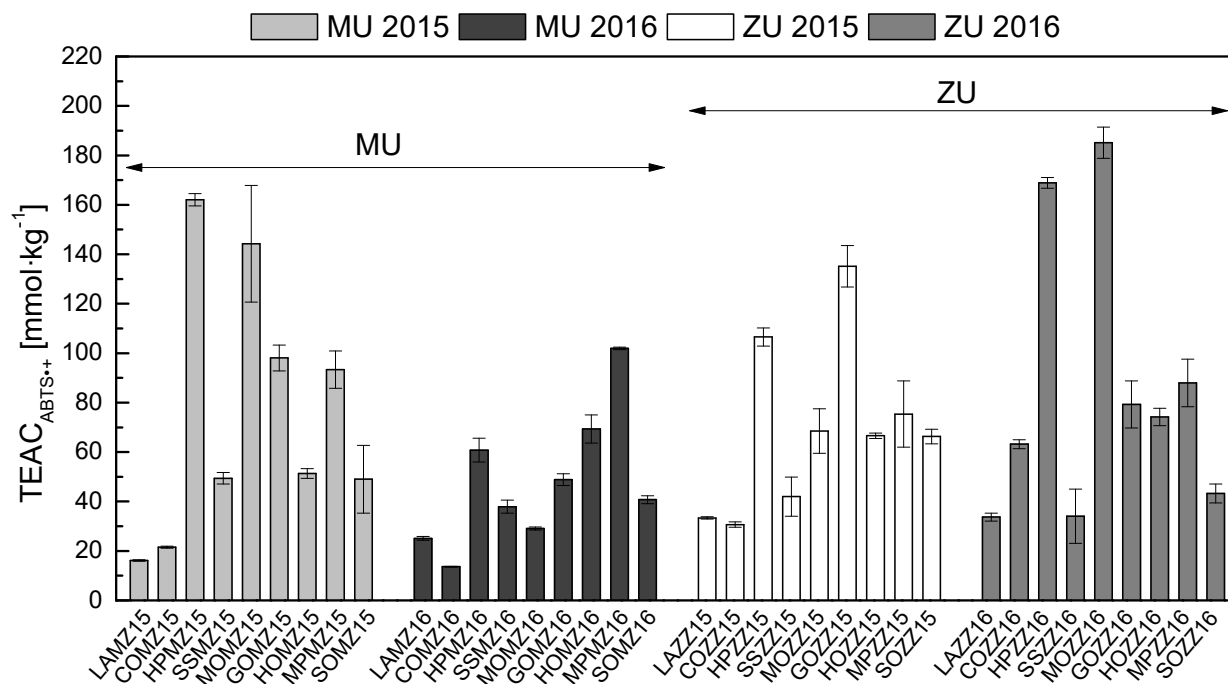
Z časového průběhu EPR spekter reference (Obr. 21) je zřejmá dobrá stabilita referenčního systému (deionizované vody), spektrum má konstatní průběh a intenzitu. Naopak v případě reálných vzorků po přidavku kation radikálu ABTS^{•+} do systému dochází k okamžitému poklesu intenzity EPR spektra v důsledku probíhajících terminačních reakcí mezi ABTS^{•+} a složkami extraktu, kdy nejčastěji dochází k elektron-transferním a proton-donorním reakcím, ale není vyloučen ani jejich souběžný průběh. Z hlediska kinetiky jsou však elektron-transferní reakce rychlejší než proton-donorní [351] a lze tedy předpokládat jejich dominantní roli v kinetice uvedené reakce. Z Obr. 21 je patrný rozdíl mezi jednotlivými zmraženými vzorky léčivých rostlin v antioxidačních vlastnostech, které jsou pravděpodobně způsobené rozdílným kvalitativním a kvantitativním zastoupením fenolických látek v jednotlivých druzích resp. extraktech z nich. Při komparaci párových extraktů SO a HO v rámci roků produkce a jednotlivých lokalit lze vidět, že naměřená EPR spektra jsou porovnatelná, lokality a roky produkce jsou velmi podobné.



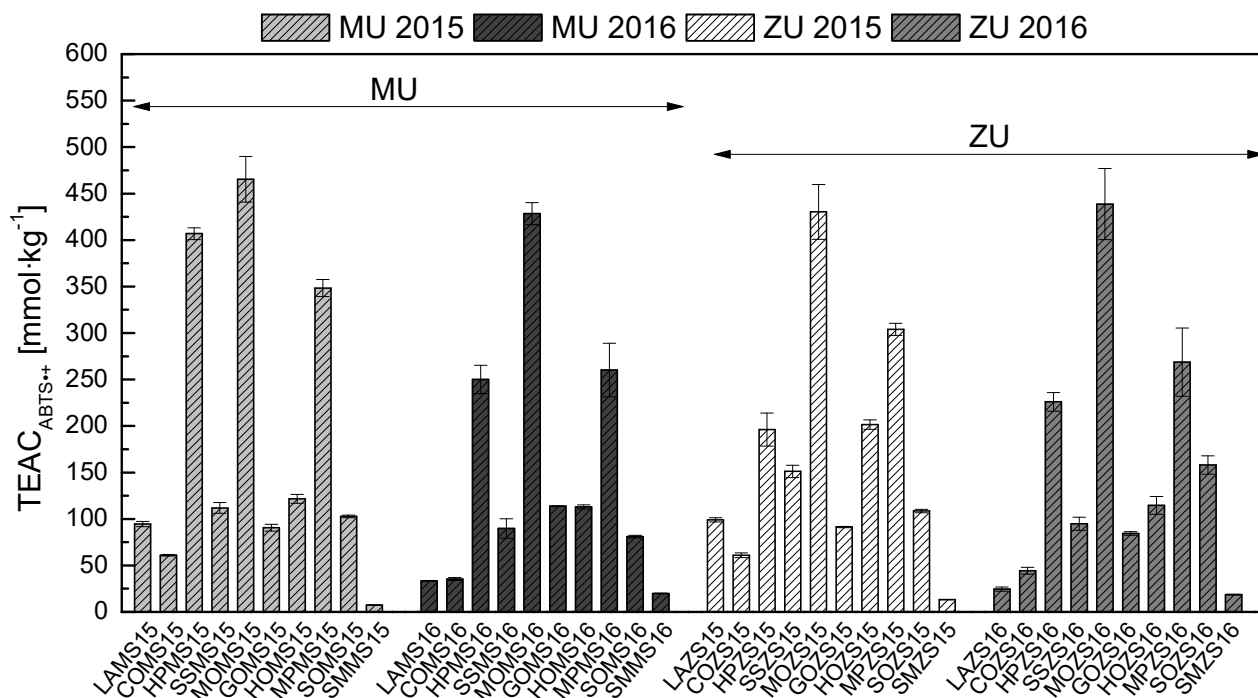
Obr. 21: Časový vývoj EPR spekter (šířka pole, SW = 10 mT) naměřený v systému obsahující deionizovanou vodu (reference) resp. příslušné vodné extrakty zmražených léčivých rostlin 6krát ředěné v přítomnosti radikálu ABTS^{•+}; detailní informace o vzorcích jsou uvedeny v Tab. 9 a 10

Časové závislosti EPR spekter byly matematicky zpracované s cílem kvantifikovat radikál-zhášecí vlastnosti extraktů. ABTS^{•+} radikál-zhášecí aktivita byla nejprve vyjádřena jako procentuální pokles koncentrace daného radikálu v experimentálním systému v čase 10,5 minuty oproti referenci a následně přepočítána na hodnoty TEAC (rovnice 1 v kapitole 4.3.5), které zohledňují reaktivitu mezi ABTS^{•+} a složkami extraktu, dále také ředění extraktu a umožňují objektivnější porovnání výsledků EPR měření.

Průměrné hodnoty TEAC_{ABTS^{•+}} vodných extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin jsou uvedeny na Obr. 22 a 23. Z výsledků měření je patrné, že antioxidační aktivita extraktů je výrazně ovlivněna způsobem posklizňové úpravy. Hodnoty TEAC_{ABTS^{•+}} u vodných extraktů ze sušených vzorků jsou statisticky vyšší, než u extraktů ze zmražených vzorků (P = 0,0003). Hodnoty TEAC_{ABTS^{•+}} jsou přibližně 1krát až 6krát vyšší u vodných extraktů ze sušených léčivých rostlin oproti vodným extraktům ze zmražených léčivých rostlin, potvrzující že sušení do 30 °C je vhodnější úpravou pro stabilizaci antioxidantů.



Obr. 22: Průměrné hodnoty $TEAC_{ABTS^{+}}$ ($mmol \cdot kg^{-1}$) stanovené ve vodných extraktech ze zmražených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit (MU Brno, ZU Lednice) a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10



Obr. 23: Průměrné hodnoty $TEAC_{ABTS^{+}}$ ($mmol \cdot kg^{-1}$) stanovené ve vodných extraktech ze sušených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit (MU Brno, ZU Lednice) a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

Výsledky antioxidační aktivity dobře kopírují trendy popsané u stanovení TPC a TFC. Vzájemné vztahy mezi parametrem $TEAC_{ABTS^{+}}$ a TPC/TFC podporují i hodnoty korelačních

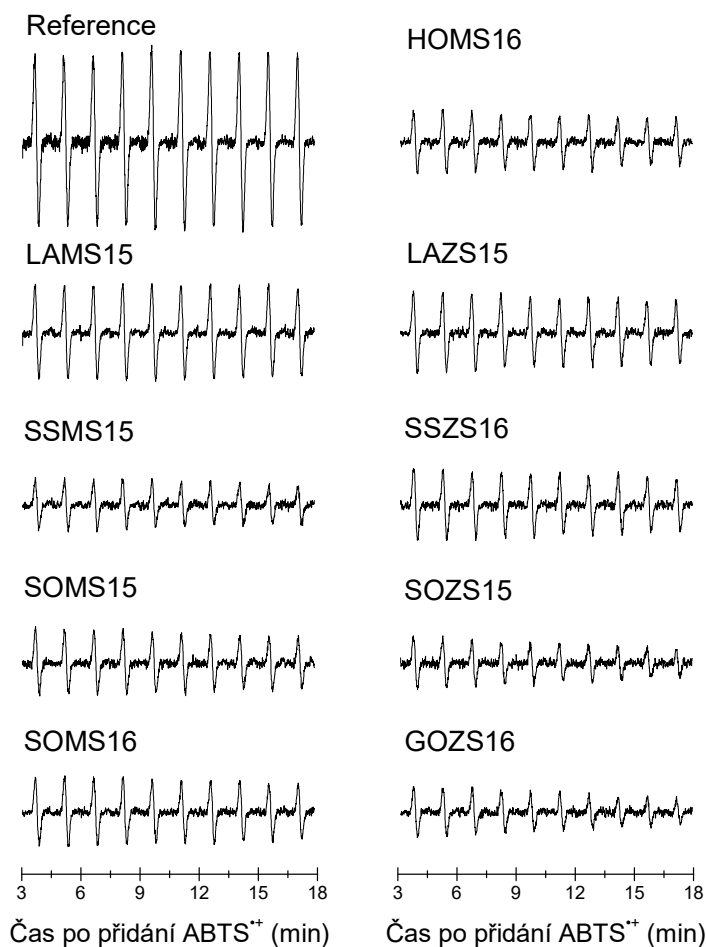
koeficientů, které byly u parametru $TEAC_{ABTS^{+}}/TPC$ u zmražených vzorků 0,9183, u sušených vzorků 0,9733; to může naznačovat, že fenolické sloučeniny jsou hlavní biologicky aktivní sloučeniny s antioxidační aktivitou ve vodných extraktech léčivých rostlin [239, 244]. Korelační koeficienty mezi $TEAC_{ABTS^{+}}/TFC$ však byly o něco nižší: u vodných extraktů ze zmražených vzorků 0,5217, u sušených vzorků 0,7100; to může ukazovat, že flavonoidy budou ovlivňovat antioxidační aktivitu, ale budou pravděpodobně spolupůsobit s dalšími sloučeninami s antioxidačním účinkem. Korelační koeficienty jsou v souladu s předešlymi studiemi [352, 353].

Co se týká komparace výsledků podle jednotlivých lokalit, z prezentovaných údajů je zřejmé, že hodnoty $TEAC_{ABTS^{+}}$ u institucí jsou vzájemně porovnatelné. Pomocí statistické analýzy ANOVA byly potvrzeny statisticky nevýznamné rozdíly mezi lokalitami, i když v roce 2015 měly vzorky z MU (zmražené i sušené) vyšší hodnoty antioxidační aktivity; naopak v roce 2016 vzorky ze ZU u obou posklizňových úprav. Tyto nepatrné rozdíly mohou souviset jednak s počasím, tak s agronomickými a technologickými postupy při zpracování léčivých rostlin. Při komparaci roků produkce také byly zaznamenány porovnatelné hodnoty $TEAC_{ABTS^{+}}$ v rámci let 2015 a 2016, pokud byla statistická analýza provedena bez ohledu na způsob zpracování a původ vzorků ($P = 0,4820$). Všeobecně však vzorky z roku 2015 vykazovaly vyšší antioxidační vlastnosti.

V souladu s očekáváním, všechny druhy léčivých rostlin vykazovaly antioxidační potenciál a dokázaly zhaset kation radikál $ABTS^{+}$. Ze všech druhů léčivých rostlin, vodné extrakty z HP, MO a MP vykazovaly znatelně vyšší antioxidační vlastnosti, SS, SO, GO a HO střední a LA, CO a SM spíše nízké antioxidační vlastnosti. Rozdíly v obsahu antioxidantů v léčivých rostlinách jsou ovlivněny různými faktory, jako např. stresovými podmínkami, klimatickými a environmentálními faktory, chemickým složením druhů, odrůd, vliv má také ontogeneze, stáří rostliny a i agronomické a technologické postupy při zpracování léčivých rostlin [219].

Ethanolové extrakty

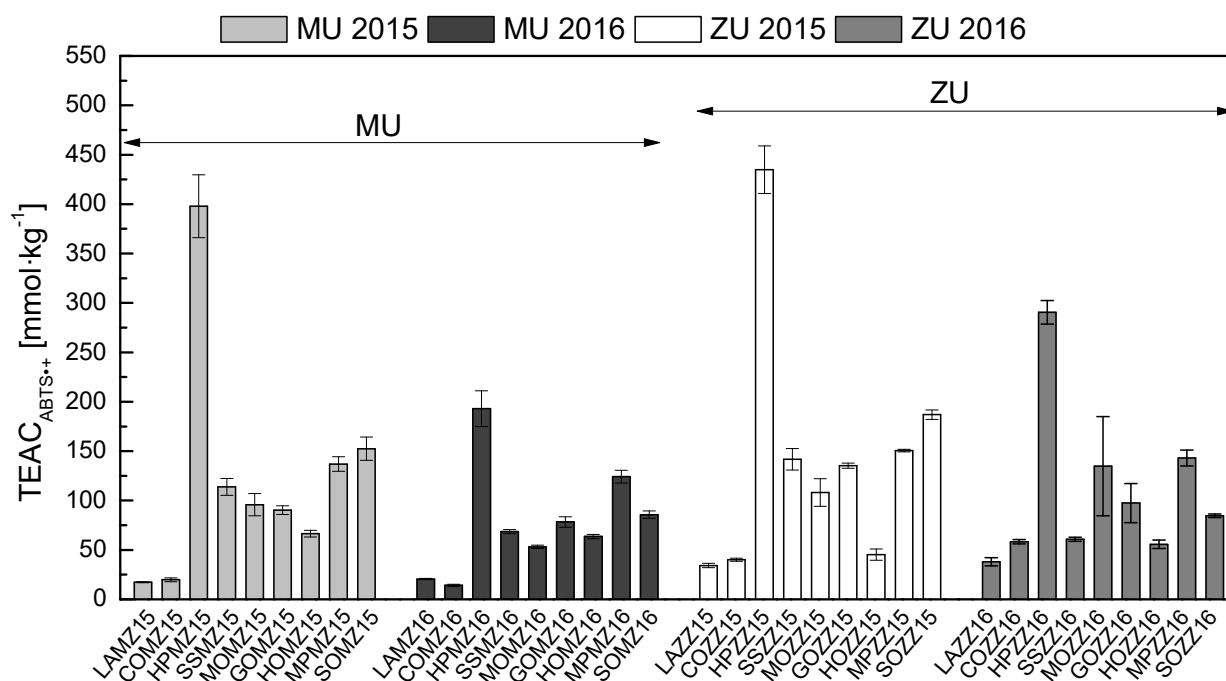
Identické experimenty byly uskutečněny i u ethanolových extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin v případě obou lokalit a produkčních let. Jako reference byl využitý 50% ethanol. Z časových průběhů EPR spekter je patrné, že přídavek ethanolových extraktů vede opět k terminaci kation radikálu $ABTS^{+}$, podobně jako u vodných extraktů. Ze závislosti integrálu naměřených EPR spekter na čase (Obr. 24) vyplývá variabilita radikál-zhášecí aktivity mezi jednotlivými druhy léčivých rostlin. Z prezentovaných spekter je zřejmé, že ethanolové extrakty sušené LA měly v porovnání s HO, SS, SO nižší radikál-zhášecí aktivitu. Při porovnání odpovídajících vzorků v rámci lokalit a roku 2015 je zřejmé, že vzorky LA a SO ze ZU vykazují vyšší antioxidační potenciál v porovnání se stejnými vzorky z MU. Při porovnání odpovídajících vzorků z hlediska roků produkce na příkladu SO je zřejmé, že vzorky z roku 2015 měly vyšší antioxidační aktivitu v porovnání s rokem 2016.



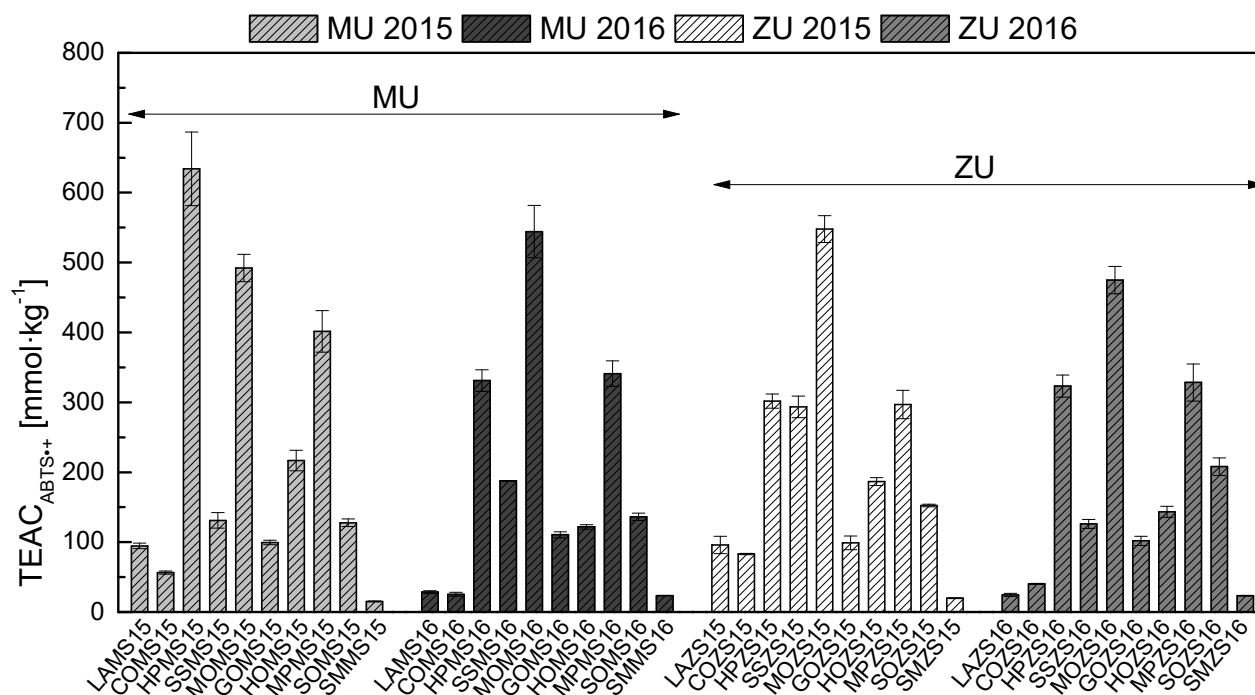
Obr. 24: Časový vývoj EPR spekter (šířka pole, SW = 10 mT) naměřený v systému obsahující 50% ethanol (reference) resp. příslušné ethanolové extrakty sušených léčivých rostlin 40krát ředěné v přítomnosti radikálu ABTS^{•+}; detailní informace o vzorcích jsou uvedeny v Tab. 9 a 10

Porovnání výsledků antioxidační aktivity bylo provedeno opět přepočtem na TEAC_{ABTS•+}. Zjištěné výsledky jsou shrnuty na Obr. 25 a 26. Z výsledků je patrné (Příloha 13), že hodnoty TEAC_{ABTS•+} u ethanolových extraktů jsou v porovnání s vodnými extrakty vyšší i u tohoto parametru. Řada publikací potvrzuje, že vhodnějšími rozpouštědly pro extrakci antioxidantů jsou vodné směsi s ethanolem, methanolem, acetonem a ethylacetátem v porovnání pouze s vodou [327, 354, 355]. ANOVA však nepotvrdila, že rozdíly v rámci protických systémů (voda vs. 50% ethanol) jsou statisticky významné, patrné rozdíly jsou pravděpodobně dány rozdílnou polaritou studovaných rozpouštědel.

Obdobně jako u vodných extraktů byly zjištěny statisticky vyšší obsahy TEAC_{ABTS•+} u sušených vzorků oproti zmraženým vzorkům (P = 0,0072). Výsledky antioxidační aktivity mají podobné trendy s obsahem fenolických látek a flavonoidů. Obdobně jako u vodných extraktů i u ethanolových extraktů byly zjištěny velmi silné korelace mezi TEAC_{ABTS•+} a TPC (u zmražených $R_{TEAC_{ABTS•+}/TPC} = 0,9381$ a sušených vzorků $R_{TEAC_{ABTS•+}/TPC} = 0,9753$) a střední a silné korelace mezi TEAC_{ABTS•+} a TFC (u zmražených $R_{TEAC_{ABTS•+}/TFC} = 0,5889$ a sušených vzorků $R_{TEAC_{ABTS•+}/TFC} = 0,7649$), naznačující, že tyto sloučeniny mají antioxidační potenciál.



Obr. 25: Průměrné hodnoty $TEAC_{ABTS^{++}}$ ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) stanovené v ethanolových extraktech ze zmražených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit (MU Brno, ZU Lednice) a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10



Obr. 26: Průměrné hodnoty $TEAC_{ABTS^{++}}$ ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) stanovené v ethanolových extraktech ze sušených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit (MU Brno, ZU Lednice) a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

Při porovnání výsledků s ohledem na lokalitu, bylo zjištěno, že ethanolové extrakty ze zmražených i sušených léčivých rostlin ze ZU produkovaných během obou let měly vyšší

antioxidační aktivitu ve srovnání s ethanolovými extrakty z MU, ze statistického hlediska však v obou případech rozdíl nebyl statisticky významný, v případě, že do analýzy byly zahrnuty oba roky produkce i způsoby zpracování ($P = 0,8739$). Při komparaci roků produkce byly nepatrně vyšší antioxidační vlastnosti u vzorků produkovaných v roce 2015 ve srovnání s rokem 2016, avšak i v tomto případě rozdíly nebyly markantní a statisticky byly roky z hlediska klimatických a environmentálních podmínek velmi podobné ($P = 0,2660$).

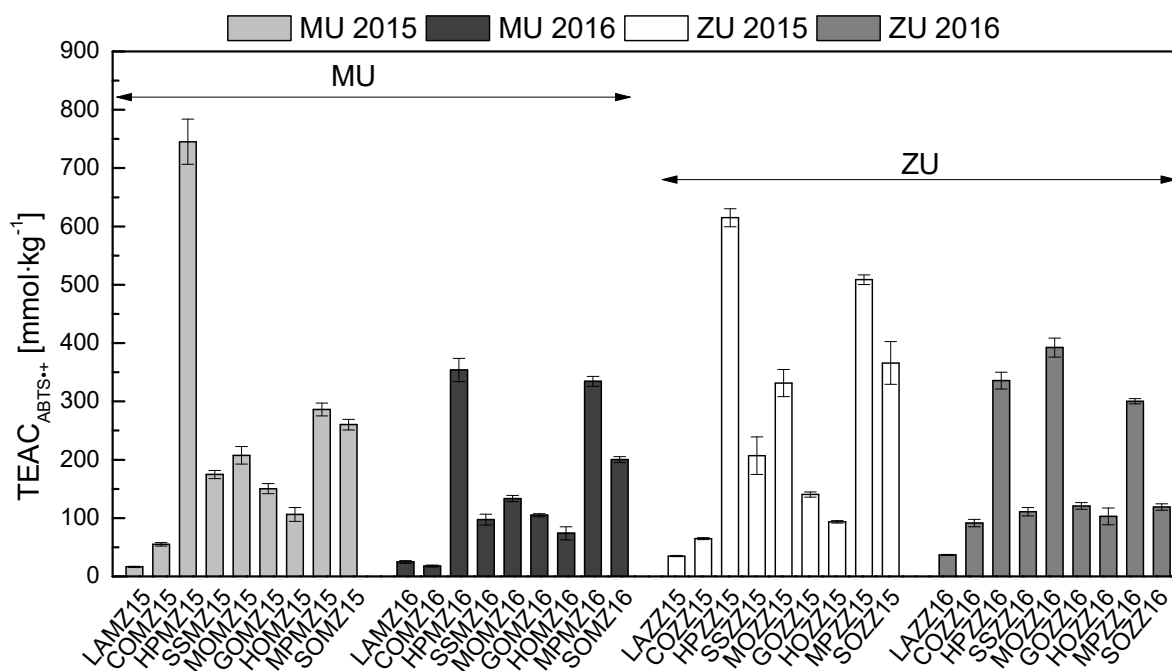
Radikál-zhášecí aktivita u jednotlivých druhů v ethanolových extraktech se snižovala v pořadí: HP > MP > SO > GO > SS > MO > HO > CO > LA pro ethanolové extrakty ze zmražených a MO > MP > HP > SS > HO > SO > GO > LA > CO > SM ze sušených léčivých rostlin. V rámci čeledí jsou bohatým zdrojem antioxidantů léčivé rostliny z čeledí Lamiaceae (MO, MP, SO, SS), Hypericaceae (HP), Fabaceae (GO), naopak vzorky z čeledi Astaraceae (CO, SM) vykazují nízkou antioxidační aktivitu. Někteří autoři potvrzují, že léčivé rostliny z čeledi Lamiaceae mají vysoký antioxidační potenciál [321-324].

Extrakty v DMSO

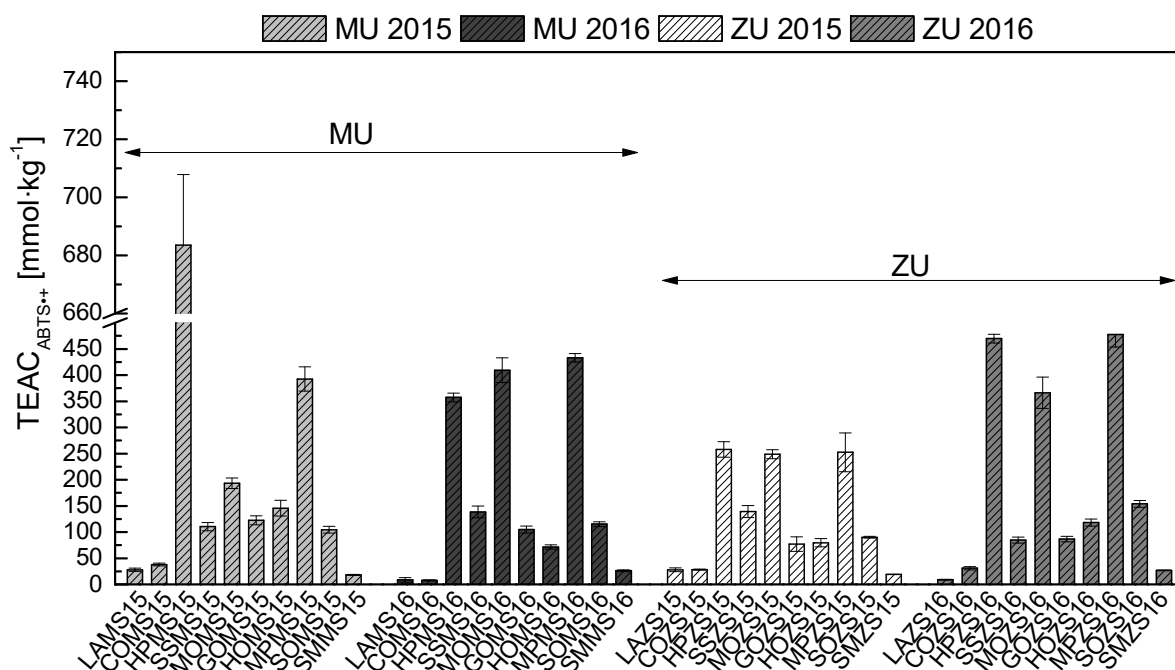
Získané výsledky celkové antioxidační aktivity vyjádřené jako hodnoty TEAC_{ABTS+} pro extrakty v DMSO jsou uvedeny na Obr. 27 a 28. Při detailnějším porovnání jednotlivých extrakčních systémů bylo zjištěno, že u vzorků ze zmražených léčivých rostlin měly extrakty v DMSO statisticky vyšší hodnoty TEAC_{ABTS+} v porovnání s vodnými ($P = 0,0000$) i ethanolovými extrakty ($P = 0,0033$), přičemž zjištěné rozdíly jsou statisticky velmi významné ($P < 0,01$). Pokles hodnot TEAC_{ABTS+} byl v pořadí: DMSO > 50% ETOH > H₂O (Příloha 13), což kopíruje trendy popsané u TPC a TFC. U sušených vzorků však rozdíly mezi rozpouštědly nebyly statisticky významné. Analýza byla provedena bez ohledu na instituci, rok produkce a způsob úpravy, i v případě, že byla analýza provedena zvlášť pro instituci, rok produkce a způsob úpravy. Všeobecně však trendy u sušených vzorků byly v pořadí: 50% ETOH > DMSO > H₂O (Příloha 13), což kopíruje trendy s TFC. Výsledky ukazují, že antioxidační aktivita extraktů je ovlivněna výběrem extrakčního činidla. Dále může být ovlivněna výběrem extrakční metody i výběrem metody/testu, který je využitý k jejímu stanovení [228, 354]. Proto je velmi obtížné porovnat výsledky TAA na základě různých dříve publikovaných prací [356].

Obdobně jako u hodnot TPC a TFC byly zjištěny vyšší obsahy TEAC_{ABTS+} u zmražených vzorků oproti sušeným, ale ANOVA zjistila, že tyto rozdíly jsou statisticky nevýznamné v případě provedení analýzy bez ohledu na instituci a rok produkce ($P = 0,3095$). Výsledky antioxidační aktivity mají podobné trendy s obsahem fenolických látek a flavonoidů. Obdobně jako u vodných a ethanolových extraktů i u DMSO extraktů byly zjištěny silné korelace mezi TEAC_{ABTS+} a TPC (u zmražených $R_{\text{TEACABTS+}/\text{TPC}} = 0,9490$ a sušených vzorků $R_{\text{TEACABTS+}/\text{TPC}} = 0,9756$) a silné korelace mezi TEAC_{ABTS+} a TFC (u zmražených $R_{\text{TEACABTS+}/\text{TFC}} = 0,7509$ a sušených vzorků $R_{\text{TEACABTS+}/\text{TFC}} = 0,8229$). V DMSO byla korelační schopnost prokazatelná v obou případech, u TFC však byla výraznější. Dokonce některé studie doporučují využití DMSO v analytické praxi pro extrakci nebo stabilizaci flavonoidů, vzhledem k jeho dobré rozpouštěcí síle [145, 357]. Výsledky korelační analýzy potvrzují ve všech rozpouštědlech, že fenolické sloučeniny, zvláště flavonoidy, jsou zodpovědné za antioxidační vlastnosti léčivých rostlin. Vzhledem k jejich redukčním vlastnostem, kdy se chovají jako redukční činidla, donory vodíku, jsou schopné zhášet volné radikály a/nebo singletový kyslík. Mohou přímo reagovat s volnými radikály a zhášet je

a/nebo chelátovat s prooxidačními kovy [358]. Tyto vzájemné vztahy byly již dříve popsány jinými autory [239, 244, 246, 359].



Obr. 27: Průměrné hodnoty $TEAC_{ABTS+}$ ($mmol \cdot kg^{-1}$) stanovené v DMSO extraktech ze zmražených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit (MU Brno, ZU Lednice) a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10



Obr. 28: Průměrné hodnoty $TEAC_{ABTS+}$ ($mmol \cdot kg^{-1}$) stanovené v DMSO extraktech ze sušených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit (MU Brno, ZU Lednice) a produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

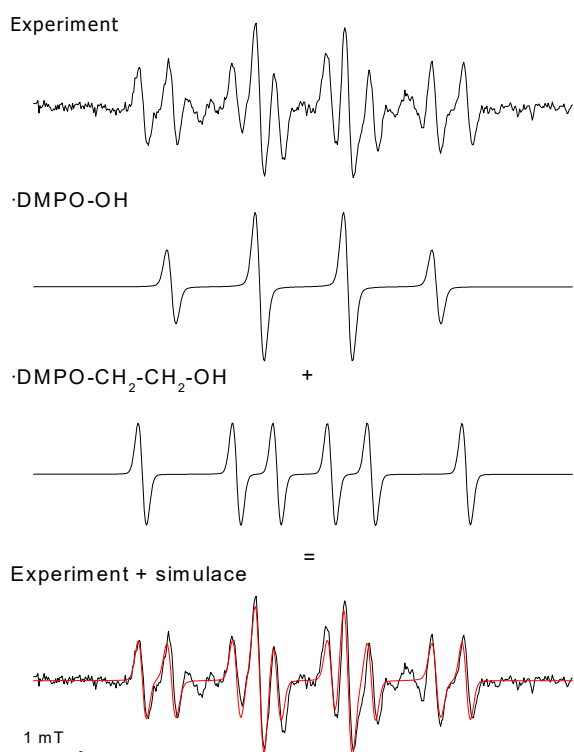
Při porovnání jednotlivých lokalit bylo zjištěno, že DMSO extrakty ze zmražených i sušených léčivých rostlin ze ZU produkovaných během obou let měly vyšší antioxidační aktivitu ve srovnání s DMSO extrakty z MU, ze statistického hlediska však v obou případech rozdíl nebyl statisticky významný, v případě, že do analýzy byly zahrnuty oba roky produkce i způsoby zpracování ($P = 0,9115$). Při komparaci roků produkce byly nepatrně vyšší antioxidační vlastnosti u DMSO extraktů produkovaných v roce 2015 ve srovnání s rokem 2016, avšak ani v tomto případě rozdíly nebyly ze statistického hlediska významné; což naznačuje, že oba roky byly z hlediska klimatických a environmentálních podmínek velmi podobné. V rámci jednotlivých druhů léčivých rostlin bylo potvrzeno, že MO, MP a HP měly ve všech rozpouštědlech vyšší antioxidační aktivitu oproti vzorkům CO, LA a SM.

5.1.1 Vliv extrakčních podmínek na antioxidační aktivitu s využitím techniky spinových lapačů v systému DMPO/ $K_2S_2O_8$

Tento test byl zvolen jak za účelem identifikace, které radikály jsou generovány ve vybraných extraktech, tak za účelem potvrzení antioxidačních vlastností. Testuje se odezva systému na chemicky generovanou přítomnost hydroxylových radikálů, někdy se proto tento test považuje za pravý test antioxidační aktivity systému (s ohledem na fakt, že $\cdot OH$ jsou nejreaktivnějším typem radikálů, které se vyskytují v biologických systémech).

Vliv použití různých rozpouštědel na $\cdot OH$ radikálovou aktivitu

Analýzou vodných a DMSO extraktů léčivých rostlin bylo zjištěno, že dochází výlučně ke generování hydroxylových radikálů, v EPR spektrech se tvoří hlavně $\cdot DMPO-OH$ adukty. V ethanolových extraktech léčivých rostlin byly v souladu s předpokladem a dosavadními poznatky, identifikovány jak hydroxylové radikály, tak i uhlíkem centrované radikály. Uhlíkem centrované radikály jsou výsledkem rozkladu nebo interakce přímo rozpouštědla se spinovým lapačem.



Obr. 29: Experimentální (—) a simulované spektrum (—) naměřené v systému obsahujícím příslušné objemy ethanolového extraktu měsíčku lékařského z MU z roku 2015, $K_2S_2O_8$, DMPO a pufru (pH = 7); EPR spektrum bylo změřeno za podmínek uvedených v experimentální části; parametry simulace jsou uvedeny v textu

V EPR spektrech podle simulační analýzy dominovaly v ethanolových extraktech (příklad výsledného spektra ethanolového extraktu Obr. 29) adukty $\cdot\text{DMPO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ ($a_N = 1,58$ mT; $a_H = 2,25$ mT; $g = 2,0045$) a $\cdot\text{DMPO-OH}$ ($a_N = 1,49$; $a_H = 1,49$; $g = 2,0045$). Tvary EPR spekter u jednotlivých systémů jsou v souladu s předešлыми studiemi [208, 331]. Z výsledků je zřejmý vliv použití extrakčního činidla na tvorbu spinových aduktů s DMPO.

Vzhledem k tomu, že ve všech extrakčních systémech byly detekovány $\cdot\text{DMPO-OH}$ adukty, tzn. hydroxylové radikály, výsledná antioxidační aktivita byla vyjádřena jako pokles hydroxylových radikálů v systému RS (radicals scavenged) v % (podle rovnice 2 uvedené v kapitole 4.3.5). Z výsledků analýz (Příloha 14) pro všechny druhy extraktů pocházejících z MU a ZU, zahrnující jak extrakty ze zmražených tak sušených rostlin, obou roků produkce, je zřejmé, že jednoznačně nebyly potvrzeny antioxidační účinky různých extraktů z léčivých rostlin proti hydroxylovým radikálům jako v případě ABTS testu.

Obdobně jako v případě ABTS testu bylo možné očekávat, že bude docházet k poklesu koncentrace $\cdot\text{DMPO-OH}$ aduktů, tzn. ke kompetitivní reakci mezi antioxidanty léčivých rostlin, chemicky generovanými $\cdot\text{OH}$ radikály a spinovým lapačem DMPO.

Výsledky však byly nejednoznačné. V případě ethanolových extraktů připravených ze sušených léčivých rostlin z roku 2015 docházelo k poklesu $\cdot\text{DMPO-OH}$ aduktu v systému a projevovaly se tak očekávané antioxidační vlastnosti extraktů. Naopak u všech extraktů ze zmražených léčivých rostlin, u některých vodných a ethanolových extraktů a u všech DMSO extraktů ze sušených léčivých rostlin v mnoha případech naopak docházelo k nárustu $\cdot\text{DMPO-OH}$ aduktu v systému a projevovaly se spíše „prooxidační“ vlastnosti extraktů. Nejvíce zřetelné je toto chování u extraktů v DMSO.

Možným vysvětlením generování místo terminace hydroxylových radikálů je přítomnost vyšší koncentrace přechodných kovů jako je železo, měď a mangan, které mohly spustit další radikálové reakce [360]. Do úvahy připadá také vliv samotného DMSO na tvorbu radikálových sloučenin resp. aduktů [361].

Pro potvrzení této teorie byla realizována korelace RS% hodnot se změřenými koncentracemi všech kovů, s důrazem na ty co mají schopnost chelace, tj. Fe, Cu, Mn, Zn a Al, v DMSO extraktech, kde byly prooxidační vlastnosti nejzřetelnější. Z výsledků analýzy vyplývá jen střední korelace RS% hodnot s koncentrací mědi ($R_{RS\%/c(\text{Cu})} = 0,5604$) a poměrně slabé korelace RS% hodnot s obsahem Zn, Al, Mn a Fe u DMSO extraktů ze zmražených léčivých rostlin (Příloha 15). Rovněž korelace mezi RS% hodnotami DMSO extraktů ze sušených léčivých rostlin a obsahem Cu, Fe a Zn byly slabé (Příloha 16). Z výsledků je zřejmé, že pravděpodobně samotné DMSO bude hlavní příčinou generování hydroxylových radikálů, jak již bylo prokázáno v práci [361].

V dalším kroku bylo zjišťováno, zda kovy ovlivňují RS% hodnoty i u protických systémů. Byly zjištěny slabé korelace mezi RS% hodnotami a obsahem Al a Cu ve vodných extraktech ze zmražených léčivých rostlin (Příloha 17). Byly však zaznamenány střední korelace Fe a Mn s flavonoidy, naznačující chelační schopnost. Ve vodných extraktech ze sušených léčivých rostlin (Příloha 18) byly zjištěny slabé korelace mezi RS% hodnotami a obsahem Al, Cu, Mn a Zn a opět byla potvrzena chelační schopnost Al, Mn a Zn s flavonoidy. Dále byla zjištěna střední korelace RS% hodnot s obsahem Al a Fe a slabá korelace RS% hodnot s Cu a Mn v ethanolových extraktech ze zmražených léčivých rostlin (Příloha 19), respektive střední korelace RS% hodnot s obsahem Al a slabé korelace RS% hodnot s obsahy Cu, Fe, Mn a Zn v ethanolových extraktech

ze sušených léčivých rostlin (Příloha 20). Jistá chelační schopnost flavonoidů s Al, Cu, Fe a Mn byla zjištěna v případě obou úprav u ethanolových extraktů. Z výsledků je zřejmé, že jednotlivé přechodné kovy různou mírou ovlivňují RS% hodnoty vodných a ethanolových extraktů z léčivých rostlin. Koncentrační poměry jednotlivých kovů, jejich dostupnost a vzájemné spolupůsobení budou mít tedy zásadní vliv na to, jaký se projeví účinek extraktu jednotlivých druhů léčivých rostlin.

Výsledné antioxidační/prooxidační vlastnosti mohou být ovlivněny kromě obsahu kovů a rozpouštědla také poměrem antioxidantů a prooxidantů v konkrétních systémech a může se rovněž jednat o synergické spolupůsobení všech výše zmíněných faktorů. Prooxidační vlastnosti může mít např. i askorbová kyselina nebo karotenoidy (v práci přímo nesledováno) v přítomnosti přechodných kovů [362]. Kyselina askorbová by mohla ovlivňovat prooxidační charakter hlavně v protických systémech u zmražených léčivých rostlin, do jisté míry i u sušených léčivých rostlin (askorbová kyselina je citlivá na vyšší teploty, vlivem sušení se dá očekávat její degradace). Vzhledem k tomu, že askorbová kyselina v extraktech nebyla stanovována, nemůžeme tyto teorie ověřit. Dále některé studie potvrzují, že samotné flavonoidy mohou mít za jistých okolností prooxidační vlastnosti. Prooxidační vlastnosti flavonoidů mohou být ovlivněny chemickou strukturou, počtem hydroxylových skupin. Konečnými produkty zhášení kyslíkových radikálů flavonoidů jsou fenoxylové radikály, které jsou reaktivní a mohou podléhat dalším reakcím. Prooxidační vlastnosti flavonoidů mohou být vyvolány interakcí fenoxyl radikálů s kyslíkem v přítomnosti přechodných kovů. Zdrojem fenoxylových radikálů může být i autooxidace [363].

Tento test se tedy neosvědčil pro potvrzení antioxidační aktivity extraktů proti hydroxylovým radikálům, pravděpodobně možným ovlivněním významným obsahem kovů, které se mohou lišit v rámci jednotlivých analyzovaných frakcí. V rámci další práce by bylo vhodné ověřit korelace testů antioxidační aktivity s přímou koncentrací kovů v mineralizátech pro každou ze studovaných rostlin a dále vyšších koncentrací extraktů na $\cdot\text{OH}$ radikálovou aktivitu za účelem zjištění, jaká koncentrace extraktu je vhodná pro zajištění antioxidačních vlastností.

5.1.2 Vliv extrakčních podmínek na obsah konkrétních fenolických sloučenin

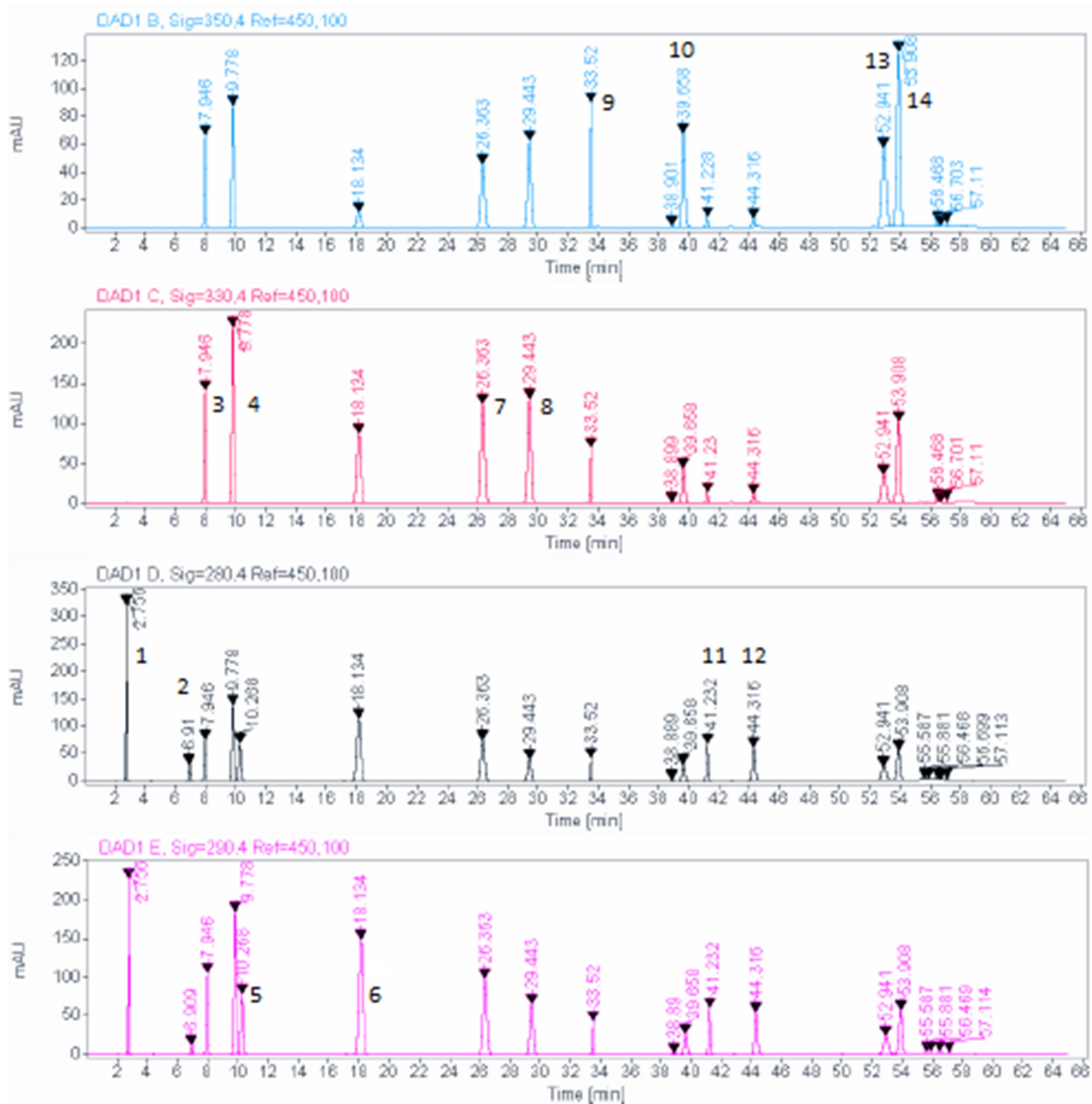
K separaci a identifikaci fenolických sloučenin byla použita kolona typu C₁₈ ve spojení s DAD detektorem, která je nejčastěji používaná pro separaci fenolických sloučenin z rostlinného materiálu. Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 4.4.2. Metoda vycházela ze studie Zhenga a Wanga [364] a před analýzou konkrétních extraktů byla optimalizována a validována.

Kvalitativní analýza

Stanovované fenolické sloučeniny (Tab. 17) byly zvoleny na základě předešlých studií zaměřených na identifikaci a kvantifikaci fenolických sloučenin ve zvolených vzorcích léčivých rostlin. Fenolické sloučeniny byly identifikovány na základě srovnání retenčních časů a UV spekter neznámých píků s referenčními autentickými standardy (Obr. 30). Konfirmace identity látek byla provedena porovnáním naměřených spekter s knihovnou spekter v rozsahu vlnových délek 220–450 nm s krokem po 0,5 nm. V extraktech z léčivých rostlin bylo identifikováno až 12 fenolických sloučenin ze 14 stanovovaných. Fenolický profil u jednotlivých léčivých rostlin byl značně individuální. Kyselina vanilová a naringin nebyly v extraktech ze zmražených a sušených léčivých rostlin identifikovány pro jejich stanovení by bylo pravděpodobně vhodné použití jiné extrakční metody, delší doby extrakce, popřípadě hydrolýzy.

Tab. 17: Fenolické sloučeniny stanovované v extraktech z léčivých rostlin pomocí HPLC

Fenolická sloučenina	Retenční čas [min]	Vlnová délka DAD [nm]	Vzorec
gallová kyselina	2,756	280	C ₇ H ₆ O ₅
katechin	6,910	280	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
chlorogenová kyselina	7,946	330	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
kávová kyselina	9,778	330	C ₉ H ₈ O ₄
vanilová kyselina	10,268	290	C ₈ H ₈ O ₄
<i>p</i> -kumarová kyselina	18,134	290	C ₉ H ₈ O ₃
ferulová kyselina	26,363	330	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
sinapová kyselina	29,443	330	C ₁₁ H ₁₂ O ₅
rutin	33,520	350	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
myricetin	39,658	350	C ₁₅ H ₁₀ O ₈
naringin	41,228	280	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄
hesperidin	44,316	280	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅
kvercetin	52,941	350	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
luteolin	53,908	350	C ₁₅ H ₁₀ O ₆



Obr. 30: HPLC chromatogramy standardů fenolických sloučenin stanovených při čtyřech vlnových délkách 280, 290, 330 a 350 nm (1 – gallová kyselina, 2 – katechin, 3 – chlorogenová kyselina, 4 – kávová kyselina, 5 – vanilová kyselina, 6 – *p*-kumarová kyselina, 7 – ferulová kyselina, 8 – sinapová kyselina, 9 – rutin, 10 – myricetin, 11 – naringin, 12 – hesperidin, 13 – kvercetin, 14 – luteolin)

Kvantitativní analýza

Kvantifikace individuálních fenolických sloučenin byla realizována pomocí metody vnějšího standardu s použitím lineární regresní analýzy. V rámci validace použité metody byly zjišťovány limity detekce, limity kvantifikace, lineární rozsah a přesnost metody. Limity detekce (LOD – Limits of detection) a limity kvantifikace (LOQ – Limits of quantification) byly stanoveny měřením slepého pokusu pro čistý methanol ($n = 10$). Byla určena maximální oscilace základní linie v oblasti chromatogramu daného dvacetinásobkem pološířky píku jednotlivých separovaných látek h_{\max} . Limity detekce byly určeny jako $LOD = 3 \cdot h_{\max}$ a limity kvantifikace jako $LOQ = 10 \cdot h_{\max}$. Detekční limity se pohybovaly v rozsahu od 0,01 do 0,06 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a limity kvantifikace od 0,02 do 0,20 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (Tab. 18). Linearita byla testována v rozmezí koncentrací 0–400 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, všechny korelační koeficienty byly větší než 0,999. Přesnost metody byla stanovena opakovaným měřením ($n = 10$) směšného standardu o koncentraci 25 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a vyhodnocena jako relativní směrodatná odchylka (RSD – Relative Standard Deviation) 10 měření v %. Relativní směrodatné odchylky byly pod 2 %.

Tab. 18: Validacioní parametry HPLC metody (R^2 – korelační koeficient kalibrace, LOD – Limit detekce, LOQ – Limit kvantifikace, RSD – relativní směrodatná odchylka)

Sloučenina	R^2	LOD [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	LOQ [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	RSD [%]
gallová kys.	0,9999	0,01	0,03	0,9
katechin	0,9998	0,01	0,03	1,5
chlorogenová kys.	0,9998	0,01	0,03	0,8
kávová kys.	0,9999	0,03	0,10	0,7
vanilová kys.	0,9998	0,04	0,13	0,5
<i>p</i> -kumarová kys.	0,9998	0,04	0,13	0,3
ferulová kys.	0,9997	0,04	0,13	0,6
sinapová kys.	0,9999	0,04	0,13	1,9
rutin	0,9998	0,06	0,20	0,5
myricetin	0,9998	0,01	0,03	1,8
naringin	0,9999	0,05	0,17	1,6
hesperidin	0,9998	0,01	0,03	0,8
kvercetin	0,9999	0,03	0,10	0,8
luteolin	0,9998	0,02	0,08	0,4

Vliv použití různých extrakčních rozpouštěděl, posklizňové úpravy, geografie a roku produkce na obsah konkrétních fenolických sloučenin

Fenolické sloučeniny jsou látky, které jsou dobře rozpustné v polárních rozpouštědlech. Proto pro celou komplexní studii byla zvolena polární rozpouštědla (ať už protická či aprotická). Zajímalo nás jaký bude mít vliv extrakční systém a posklizňová úprava na zastoupení individuálních fenolických sloučenin v léčivých rostlinách, popřípadě vliv geografie a roku produkce.

Stanovený obsah individuálních fenolických sloučenin v různých druzích extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin je shrnut v Příloze 21 a 22. Z prezentovaných dat je

zřejmé, že zastoupení jednotlivých fenolických sloučenin u každého druhu léčivé rostliny je velmi individuální, specifické a variabilní, naznačující druhovou různorodost léčivých rostlin. Všeobecně nejvíce zastoupenými fenolickými kyselinami v jednotlivých druzích léčivých rostlin byla kyselina kávová a chlorogenová (kyselina kávová byla kvantifikována v 8 případech z 10; pouze extrakty z levandule a ostropestřce mariánského ji neobsahovaly; kyselina chlorogenová byla kvantifikována v 7 případech z 10, nebyla nalezena v extraktech z levandule, meduňky a šalvěže lékařské) (Tab. 19). Ostatní fenolické kyseliny: ferulová, sinapová, gallová, *p*-kumarová, byly druhově specifické. Ferulová kyselina byla charakteristická pro extrakty z levandule, yzopu a šalvěže lékařské. Sinapová se vyskytovala pouze v extraktech z levandule a *p*-kumarová v extraktech z meduňky. Gallová kyselina byla identifikována v extraktech z šalvěže lékařské i muškátové a z jestřabiny. Přítomnost a koncentrace flavonoidů byla také individuální pro jednotlivé druhy léčivých rostlin. Rutin byl kvantifikován v extraktech z měsíčku, třezalky a jestřabiny. Katechin byl charakteristický pro extrakty z měsíčku a yzopu, kvercetin naopak pro extrakty z třezalky a máty, myricetin se vyskytoval v extraktech z měsíčku a jestřabiny. Hlavním flavonoidem máty a meduňky byl hesperidin, naopak u šalvěže lékařské i muškátové byl dominantně zastoupen luteolin. Individuální zastoupení fenolických sloučenin je v souladu s předešlými studii zaměřenými na identifikaci těchto látek v léčivých rostlinách [25, 31, 47, 64, 71, 91], avšak diskuze dosažených koncentrací pro jednotlivé druhy u vybraných extrakčních systémů je velmi problematická, vzhledem k tomu, že v předešlých studiích jsou značně variabilní jak podmínky extrakce (doba extrakce, extrakční metoda, poměr materiálu a rozpouštědla, výběr rozpouštědla), samotné identifikace a kvantifikace, tak také vzhledem k tomu, že profil fenolických sloučenin je do jisté míry ovlivněn dalšími faktory, jako např. environmentálními faktory, výběrem kultivaru, místem výskytu, dobou sklizně, zralostí, věkem rostlin i způsobem před- a posklizňových úprav [365-367]. Z výsledků je však patrné, že hodinová dynamická extrakce studeným rozpouštědlem je dostačující pro rychlou identifikaci a kvantifikaci hlavních fenolických sloučenin a flavonoidů v extraktech léčivých rostlin.

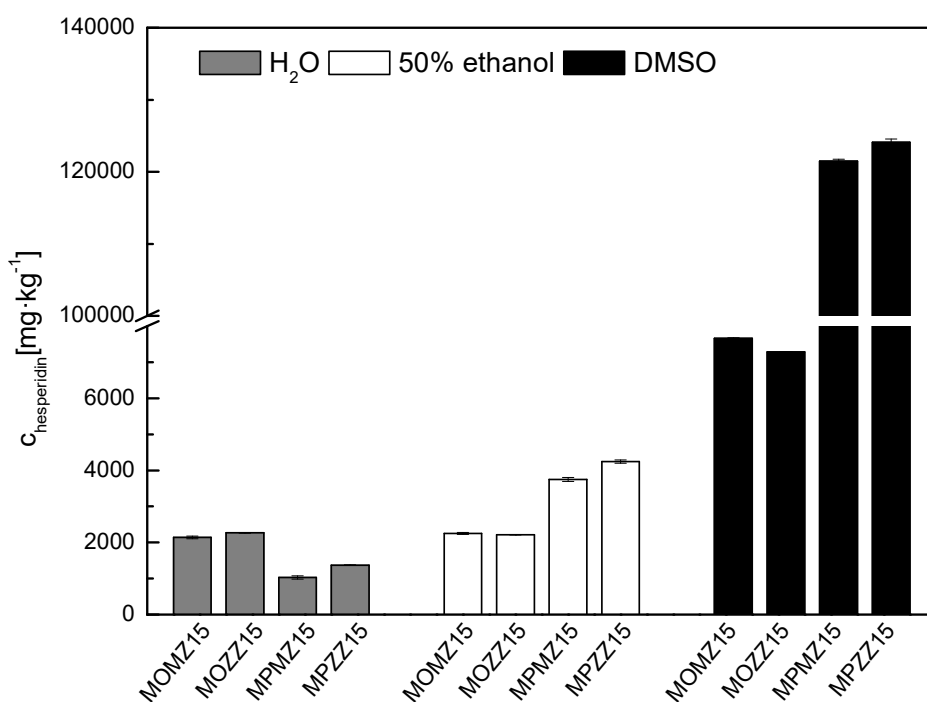
Tab. 19: Přehled identifikovaných fenolických sloučenin v jednotlivých druzích léčivých rostlin

levandule	měsíček	třezalka	šalvěj m.	meduňka	jestřabina	yzop	máta	šalvěj l.	ostropest.
FK	KAT	CLK	GAL	KK	GAL	KAT	CLK	KK	CLK
SK	CLK	KK	CLK	PK	CLK	CLK	KK	FK	
	KK	RUT	KK	HES	KK	KK	HES	LUT	
	RUT	KVE	LUT	KVE	RUT	FK	KVE		
	MYR				MYR				

Použité zkratky: GAL – gallová kyselina, KAT – katechin, CLK – chlorogenová kyselina, KK – kávová kyselina, PK – *p*-kumarová kyselina, FK – ferulová kyselina, SK – sinapová kyselina, RUT – rutin, MYR – myricetin, HES – hesperidin, KVE – kvercetin, LUT – luteolin

Získané výsledky (Příloha 21 a 22) potvrzují, že obsah konkrétních fenolických sloučenin je výrazně ovlivňován jak volbou extrakčního činidla, tak posklizňovou úpravou rostlinného materiálu. Ve všeobecnosti u většiny identifikovaných sloučenin ze zmražených vzorků léčivých rostlin bylo nejvhodnější použití dimethylsulfoxidu. Konkrétně se koncentrace katechinu, kávové kyseliny, rutinu, myricetinu, hesperidinu, kvercetinu a luteolinu snižovaly ve směru

DMSO > 50% ethanol > voda pokud byla ANOVA provedena bez ohledu na druh, instituci a rok produkce léčivých rostlin. Nicméně statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi extrakčními systémy byly zaznamenány v případě zmražených vzorků pouze u hesperidinu (Obr. 31 příklad pro vzorky máty a meduňky produkované v roce 2015) a kvercetin. Dále bylo zjištěno, že pro kyselinu ferulovou bylo také nejúčinnější DMSO, následované však vodou a 50% ethanolem v případě zmražených vzorků. Dále bylo zjištěno, že kyseliny gallová, chlorogenová, *p*-kumarová a sinapová se lépe extrahují v polárních rozpouštědlech (50% ethanol a voda). Ze zjištěných výsledků je patrné, že pravděpodobně struktura fenolické sloučeniny bude mít vliv na extrakci u jednotlivých rozpouštědel. DMSO se jeví jako nejvhodnější extrakční systém pro zmražené vzorky léčivých rostlin, umožňující hlavně rychlou extrakci flavonoidů ze vzorků léčivých rostlin s obsahem vody.

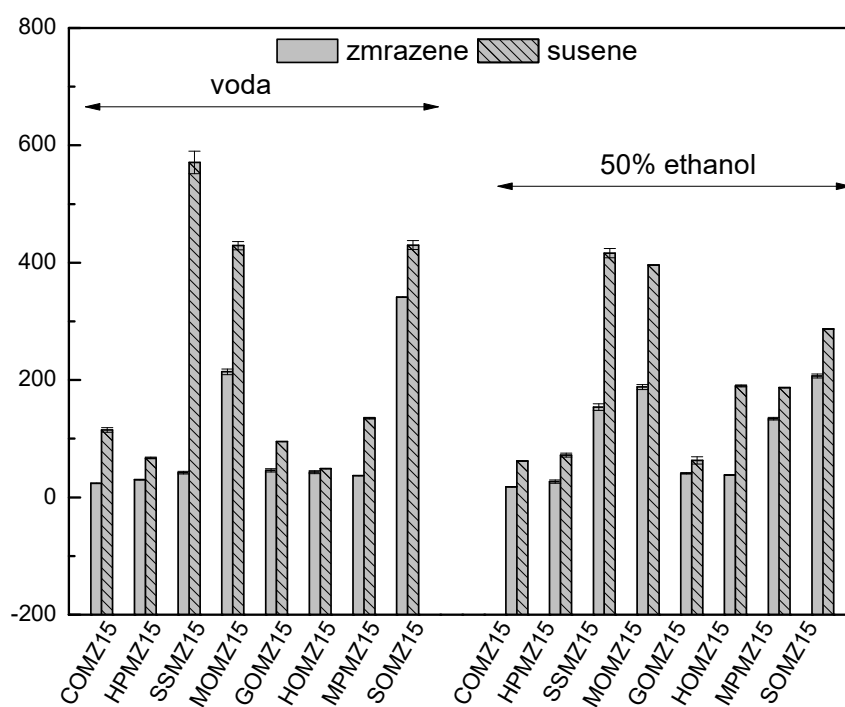


Obr. 31: Koncentrace hesperidinu ve vodných, ethanolových a DMSO extraktech ze zmražených vzorků meduňky lékařské a máty peprné pocházejících ze dvou různých lokalit (MU Brno, ZU Lednice) produkovaných v roce 2015; označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

V případě sušených léčivých rostlin však byly trendy odlišné. Koncentrace katechinu, gallové, chlorogenové, sinapové kyseliny a rutinu se snižovaly ve směru 50% ethanol > voda > DMSO. ANOVA byla provedena bez ohledu na druh, instituci a rok produkce léčivých rostlin. Statistická významnost rozdílů mezi extrakčními systémy však u individuálních fenolických sloučenin nebyla potvrzena naznačující, že pro suché matrice co do účinnosti jsou extrakční činidla velmi podobná. Tento trend byl zaznamenán i v případě TPC. Dále bylo zjištěno, že pro extrakci kvercetinu a luteolinu u sušených léčivých rostlin se jeví vhodné použití 50% ethanolu, následovaného DMSO až poté vodou. V případě extrakce kávové kyseliny, ferulové kyseliny a myricetinu bylo naopak zjištěno, že voda se jeví jako velmi vhodná, následovaná 50% ethanolem a DMSO. V případě extrakce hesperidinu bylo zjištěno, že bez ohledu na úpravu materiálu je vhodné použití DMSO, následované 50% ethanolem a vodou. 50% ethanol se pro sušené léčivé rostliny

ve všeobecnosti jevil jako nejvhodnější extrakční systém (osvědčil se u 7 kvantifikovaných sloučenin z 12).

Statistická analýza (ANOVA) potvrdila, že jsou málo významné statistické rozdíly v obsahu individuálních fenolických sloučenin v případě posklizňových úprav. Při porovnání zmražených a sušených léčivých rostlin, sušené vzorky jsou všeobecně charakteristické vyššími obsahy katechinu, chlorogenové, kávové (Obr. 32), *p*-kumarové kyseliny, rutinu, hesperidinu a kvercetin. Uvedené výsledky jsou v dobré shodě s dříve publikovanými studii zaměřenými na porovnání fenolických sloučenin ve zmražených a sušených vzorcích léčivých rostlin [315, 321]. Na druhou stranu, některé fenolické sloučeniny (gallová, ferulová, sinapová kyselina, myricetin a luteolin) byly kvantifikovány ve vyšších množstvích ve zmražených léčivých rostlinách, naznačující, že tyto sloučeniny budou pravděpodobně citlivé na vyšší teploty. Z výsledků je zřejmé, že extrakční účinnost je v případě sušených vzorků vyšší v porovnání se zmraženými vzorky. Rozpouštědlo pravděpodobně rychleji proniká do materiálu a tím pádem se zvyšují i obsahy konkrétních fenolických sloučenin. Pro některé sloučeniny však může být úprava sušením nevhodná, může docházet k degradaci vlivem vyšších teplot. Na celkovou extrakci v daném rozpouštědle bude mít vliv více faktorů, jak struktura fenolické sloučeniny, tak i její dostupnost v samotné rostlině pro dané rozpouštědlo.



Obr. 32: Koncentrace kyseliny kávové ve vodných a ethanolových extraktech ze zmražených a sušených vzorků vybraných léčivých rostlin pocházejících z MU Brno produkovaných v roce 2015; označení vzorků je uvedeno v Tab. 9

Při porovnání vzorků v rámci lokalit (MU Brno vs. ZU Lednice), s ohledem na rok produkce jsou na první pohled (Příloha 21 a 22) zřejmé jisté rozdíly individuálních fenolických sloučenin u různých extraktů z léčivých rostlin. ANOVA však nepotvrdila, že by rozdíly byly statisticky významné; pro jednotlivé instituce u konkrétních fenolických sloučenin jak u extraktů

zmražených, tak u extraktů sušených, v případě zohlednění roků produkce a jednotlivých rozpouštědel. Lokality zřejmě byly velmi podobné.

U jednotlivých institucí je na první pohled (z Přílohy 21 a 22) patrné, že rok 2015 byl z hlediska produkce u většiny individuálních fenolických sloučenin lepší i v případě TPC se tento trend projevoval. V případě zmražených vzorků s ohledem na extrakční systém a instituci byly v roce 2015 zjištěny statisticky vyšší obsahy chlorogenové, kávové a *p*-kumarové kyseliny ve srovnání s rokem 2016; u extraktů ze sušených léčivých rostlin pak byly zjištěny statisticky vyšší obsahy kyseliny chlorogenové, *p*-kumarové a kvercetinu u bylin produkovaných v roce 2015. Rozdíly u roků produkce mohou být do jisté míry ovlivněny počasím. Dále mohou být způsobeny tím, že pokaždé pro analýzu byla brána jiná frakce rostlin, která mohla mít nepatrně rozdílné podmínky pro růst a tím pádem odlišnosti v zastoupení fenolických sloučenin. Samozřejmě jistý vliv budou mít i manipulace s rostlinami při sklizni, po sklizni, při přípravě vzorku pro analýzu.

5.1.3 Vliv extrakčních podmínek na obsah prvků

Kvantitativní analýza a validace ICP-OES metody

Kvantifikace individuálních prvků byla provedena pomocí metody vnějšího standardu s použitím lineární regresní analýzy, před analýzou extraktů byla metoda ICP-OES validována. Při validaci byly testovány 3 parametry: limity detekce, přesnost a linearita. Limity detekce pro jednotlivé prvky byly vypočítány z analytického signálu slepého pokusu získaného opakovaním měření ($n = 10$). Limity detekce pro jednotlivé prvky a systémy jsou uvedeny v Tab. 20.

Tab. 20: *Výsledky validace ICP-OES metody pro analýzu extraktů léčivých rostlin*

Prvek	LOD [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]		
	voda	50% ethanol	DMSO
Al	0,0050	0,0051	0,0051
As	0,0042	0,0043	0,0043
Ca	0,0002	0,0002	0,0002
Cd	0,0002	0,0002	0,0002
Co	0,0079	0,0080	0,0080
Cr	0,0008	0,0008	0,0008
Cu	0,0137	0,0138	0,0140
Fe	0,0008	0,0008	0,0008
K	0,0148	0,0149	0,0150
Mg	0,0100	0,0100	0,0100
Mn	0,0008	0,0008	0,0008
Na	0,0009	0,0010	0,0009
P	0,0100	0,0100	0,0100
Pb	0,0148	0,0149	0,0150
Zn	0,0018	0,0019	0,0020

Přesnost měření byla ověřena opakovaným měřením multielementárních standardů ($n = 10$) o koncentracích 0,5, 1 a 10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ pro mikroprvky a 10, 50 a 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ pro makroprvky

u každého extrakčního systému. Relativní směrodatné odchylky pro všechny extrakční systémy, prvky nepřekročily 3 %. Linearita byla testována v rozmezí rozsahu koncentrací 0,5, 1 a 10 mg·l⁻¹ pro mikroprvky a 10, 50 a 100 mg·l⁻¹ pro makroprvky, korelační koeficienty byly u všech prvků v rámci extrakčních systémů větší než 0,999.

Vliv použití různých extrakčních rozpouštědel, posklizňové úpravy, geografie a roku produkce na obsah prvků

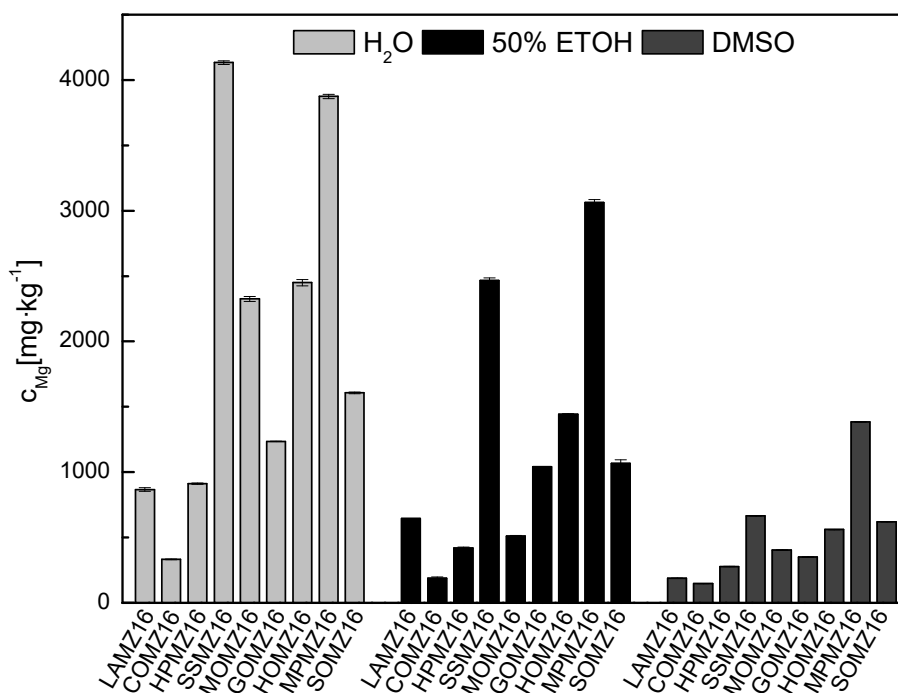
Při analýze prvků nás zajímalo, jaký bude mít vliv extrakční systém a posklizňová úprava na zastoupení individuálních prvků v extraktech z léčivých rostlin popřípadě zda se minerální složení liší v rámci jednotlivých lokalit a roků produkce.

Stanovený obsah jednotlivých prvků v různých druzích extraktů, ze zmražených a sušených léčivých rostlin, pocházejících z dvou lokalit a produkovaných během dvou let, je uveden v přílohách 23–26. Získané výsledky dokazují, že zastoupení jednotlivých prvků u jednotlivých léčivých rostlin je individuální a jejich koncentrace je v rámci jednotlivých druhů variabilní, naznačující druhovou různorodost. Přítomnost prvků v léčivých rostlinách je hlavně výsledkem transportu prvků z půdy, vody určené pro zavlažování a srážek v průběhu růstu léčivých rostlin [38, 368]. Koncentrace prvků je také ovlivněna schopností jednotlivých druhů selektivně tyto prvky akumulovat [369].

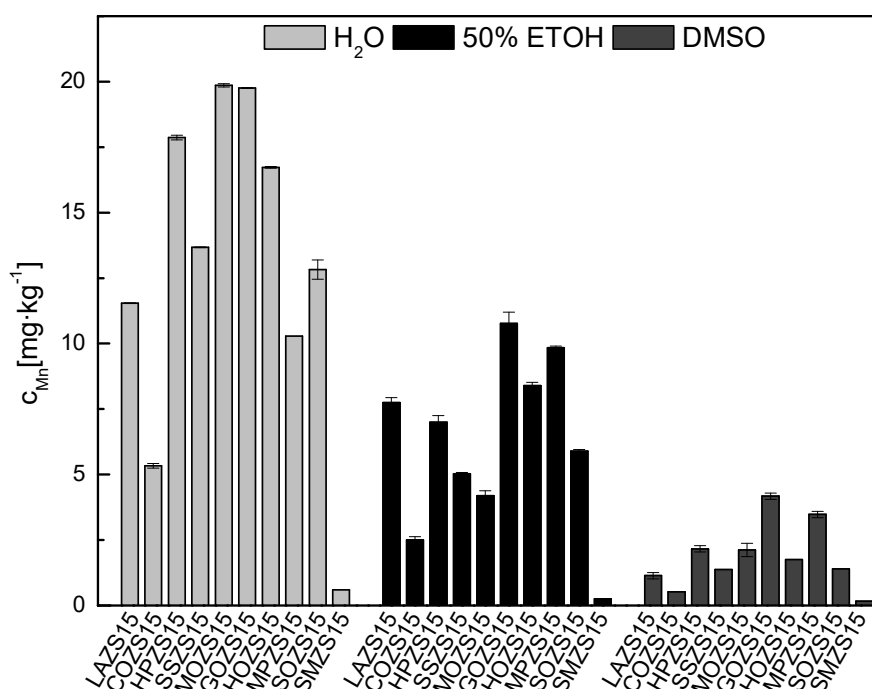
V případě detailnějšího rozboru bylo zjištěno, že K, Ca, Mg, P a Na byly kvantifikovány ve vyšších množstvích ve všech extraktech. Řada studií [278-280] potvrzuje, že tyto prvky jsou hlavní makroprvky léčivých rostlin. Hlavně N, P, Ca, Mg, K a S jsou všeobecně důležité pro normální růst léčivých rostlin. Ostatní prvky Cu, Fe, Mn, Zn a Al byly zastoupeny v menších množstvích. Přítomnost Cu, Fe, Mn a Zn v extraktech může být vysvětlena možnou tvorbou komplexu mezi kovem a organickými sloučeninami léčivých rostlin. Tyto mikroprvky jsou pro léčivé rostliny esenciální. Rostliny je akumulují z půdy v malých množstvích, zpravidla jsou důležité pro normální růst a vývoj; většina z nich v rostlině zastává, ve spojení s enzymatickými systémy, hlavně úlohu katalytickou [368]. Al byl jediný identifikovaný prvek, který není esenciální pro člověka ani pro rostlinu. Přítomnost Al v extraktech může být vysvětlena možnou komplexací, která nastává mezi prvkem a organickými sloučeninami v rostlinách. Obvykle je hladina Al v rostlinách velmi vysoká, v řádu mg·kg⁻¹. Tato vysoká úroveň může být odůvodněna absorpcí Al rostlinou v kyselých půdách (pH půdy pod 5,5). Široká škála rostlinných druhů však vytváří mechanismy, které jim umožňují růst v kyselých půdách [38]. Dále také je nutné zmínit, že těžké kovy pro léčivé rostliny potenciálně toxické (Cd, Pb, Co a Cr) v extraktech nebyly detekovány.

Z výsledků prvkové analýzy je zřejmé, že obsah konkrétních prvků je výrazně ovlivňován výběrem extrakčního činidla i úpravou rostlinného materiálu. Většina prvků u extraktů ze zmražených léčivých rostlin se nejlépe extrahuje ve vodě. Konkrétně obsahy Ca, K, Mg, Na, P, Mn, Fe, Zn se snižovaly ve směru voda > 50% ethanol > DMSO, avšak pouze v případě K, Mg, Mn, Na a P (příklad Obr. 33) byly mezi extrakčními systémy zjištěny rozdíly, pokud byla ANOVA provedena s ohledem na instituci a rok produkce léčivých rostlin. Nejvíce však byly rozdíly zaznamenány mezi vodou vs. ethanolem a vodou vs. DMSO. Většina sloučenin stanovených prvků je všeobecně dobře rozpustná ve vodě [370], ale prvky se samozřejmě mohou vyskytovat v rostlinách v různých formách (vázané, nevázané), takže výsledná extrakce do rozpouštědla může být do jisté míry tímto ovlivněna.

V případě extraktů ze sušených léčivých rostlin byly trendy kopírující s extrakty ze zmražených léčivých rostlin. Konkrétně se obsah Ca, K, Mg, Na, P, Mn, Fe, Zn snižoval ve směru voda > 50% ethanol > DMSO, rozdíly mezi extrakčními systémy byly statisticky významné, v případě Ca, K, P a Mn (příklad Obr. 34) pokud byla ANOVA provedena s ohledem na instituci a rok produkce. Bez ohledu na úpravu materiálu se voda jeví jako nejvhodnější pro extrakci makroprvků i mikroprvků, umožňuje však také extrakci některých prooxidantů, hlavně Mn a Fe, které by v případě využití v potravinářském průmyslu mohly ovlivňovat výslednou antioxidační aktivitu.

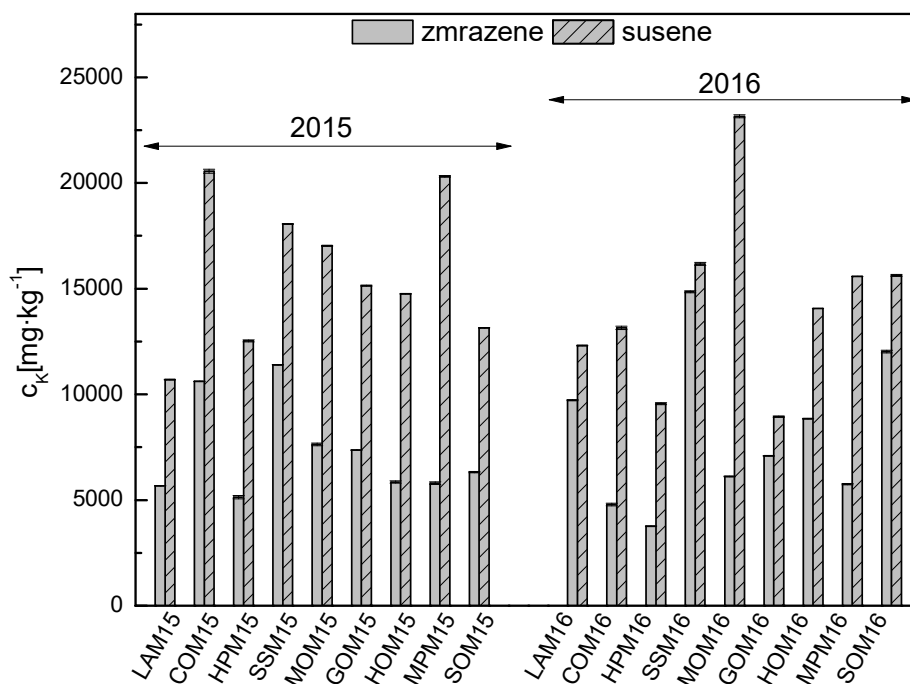


Obr. 33: Stanovené koncentrace hořčiku v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suché hmoty ve vodných (H_2O), ethanolových (50% ETOH) a dimethylsulfoxidových (DMSO) extraktech ze zmražených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně produkovaných v roce 2016; označení vzorků je uvedeno v Tab. 9

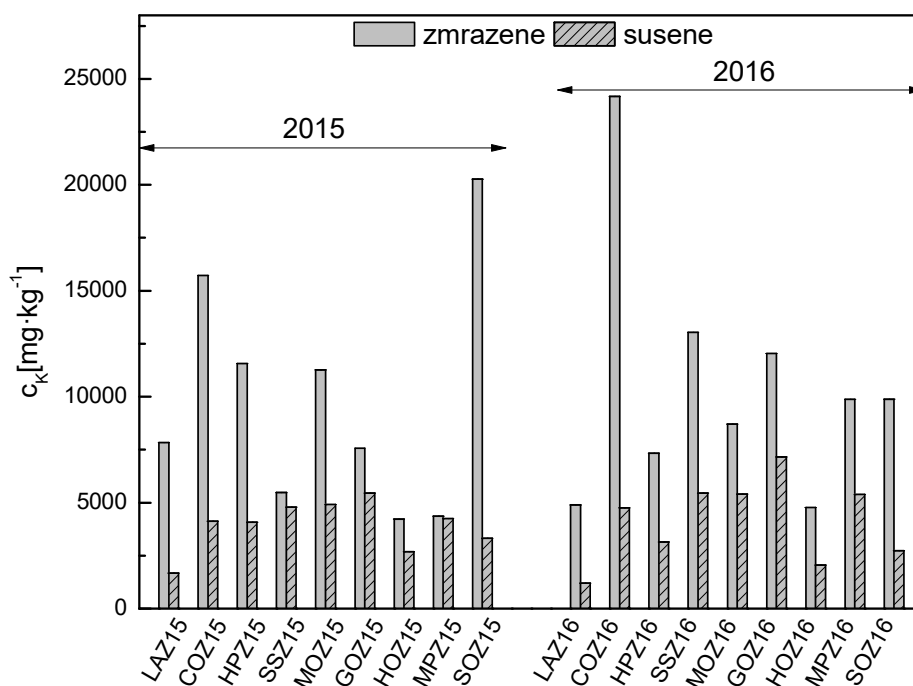


Obr. 34: Stanovené koncentrace manganu v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suché hmoty ve vodných (H_2O), ethanolových (50% ETOH) a dimethylsulfoxidových (DMSO) extraktech ze sušených léčivých rostlin pocházejících ze Zahradnické univerzity Mendelovy univerzity v Brně produkovaných v roce 2015; označení vzorků je uvedeno v Tab. 10

Při porovnání obsahu individuálních prvků v rámci posklizňových úprav byly porovnávány zmražené vs. sušené vzorky s ohledem na rozpouštědlo, lokaci i rok produkce. V případě vodných extraktů bylo pomocí ANOVY zjištěno, že u většiny prvků (Ca, K, Mg, Na, P, Cu, Mn a Zn) je efektivnější extrakce ze sušených vzorků. Ze statistického hlediska byly rozdíly mezi úpravami v případě vodného systému potvrzeny u Na, P a Mn, pokud byla analýza provedena s ohledem na instituci, úpravu a rok produkce. V případě porovnání posklizňových úprav u ethanolových extraktů, obdobně jako u vody byly zjištěny vyšší obsahy individuálních kovů (Ca, K, Mg, Na, P, Cu, Mn, Zn) u sušených vzorků. V případě ethanolu byly rozdíly u většiny stanovených prvků ze statistického hlediska nevýznamné, s výjimkou obsahu K, Mg, Zn, Mn a Cu (příklad Obr. 35). Vzhledem k sušení bylin teplotami do $30\text{ }^\circ\text{C}$ nelze předpokládat, že teplota bude mít výrazný dopad na degradaci kovů. V případě mražení bylo v rámci studie Musy a Ogbadoyie [371] zjištěno, že dlouhodobější úchova za nízkých teplot má negativní vliv na obsah některých prvků v léčivých rostlinách. Do jisté míry na nižší obsah u zmražených léčivých rostlin může mít vliv degradace při skladování a vzhledem k předešlým výsledkům v případě protických systémů také nižší extrakční účinnost. U DMSO extraktů, v případě porovnání rozdílů mezi úpravou vzorků, však byly zaznamenány opačné trendy, zmražené vzorky měly vyšší obsahy všech studovaných prvků ve srovnání se sušenými. Statisticky významné rozdíly byly zaznamenány v případě obsahu Mg, Na, K, P, Cu, Fe, Al a Zn (příklad Obr. 36) v případě obou institucí a obou roků produkce. Trendy u DMSO jsou kopírující s ostatními sledovanými parametry. V případě polárního aprotického rozpouštědla (DMSO) je patrné, že extrakční účinnost je vyšší u zmražených vzorků; výslednou extrakci pravděpodobně ovlivňuje charakter rozpouštědla, do jisté míry i prostá difúze může mít vliv na celkovou extrakci prvků u zmražených léčivých rostlin.



Obr. 35: Porovnání koncentrace draslíku v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suché hmoty v ethanolových extraktech ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně produkovaných v roce 2015 a 2016; označení vzorků je uvedeno v Tab. 9



Obr. 36: Stanovené koncentrace draslíku v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suché hmoty v DMSO extraktech ze sušených léčivých rostlin pocházejících ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně produkovaných v roce 2015 a 2016; označení vzorků je uvedeno v Tab. 10

Při porovnání vzorků v rámci lokalit (MU Brno vs. ZU Lednice) s ohledem na rok produkce a extrakční systém bylo pomocí ANOVY zjištěno, že lokality z hlediska prvkového složení jsou podobné. U většiny individuálních prvků (s výjimkou obsahu K, Na a Cu, které byly vyšší u Zahradnické fakulty) nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi lokalitami, pokud byl zohledněn rok produkce, úprava vzorku a extrakční systém. Analýzou půd bylo zjištěno, že půdní podmínky u obou institucí byly více méně podobné (Tab. 21). Z výsledků je také evidentní, že obsah toxických prvků je pod limitem pro zemědělské půdy u obou lokací [372].

Tab. 21: Rozdíly ve složení mikroprvků a toxických prvků v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ půd z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně (MU) a Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně (ZU) odebrané z horní vrstvy 25 cm za rok 2015 a 2016 stanovené lučavkou královskou

	Cu	Fe	Mn	Zn	Al	Co	Cd	As	Cr	Pb
<i>2015</i>										
MU	45–48	10 936–20 905	370–589	61–120	3 390–5 924	5–11	0,1–0,3	5–8	17–46	53–72
ZU	42–46	10 175–20 618	288–539	69–115	3 600–5 277	4–6	0,1–0,2	4–5	10–45	47–66
<i>2016</i>										
MU	44–49	14 867–16 581	478–508	56–119	3 913–5 668	8–10	0,1–0,3	5–7	16–36	56–60
ZU	43–48	13 746–16 415	442–506	78–101	3 550–5 514	5–10	0,1–0,2	4–6	19–40	50–55

V případě porovnání roků produkce (2015 vs. 2016) s ohledem na instituci, úpravu vzorků a extrakční systém bylo zjištěno, že vyšší obsahy individuálních prvků byly zjištěny v roce 2015. Avšak ze statistického hlediska (ANOVA), u obou institucí, úprav i extrakčních systémů, byly rozdíly mezi roky produkce považovány za statisticky nevýznamné (s výjimkou obsahu Na, P, Cu, Fe a Al). V případě institucí a roků produkce byla zaznamenána variabilita výsledků, která může být ovlivněna hlavně tím, že pro analýzu byly brány pokaždé jiné frakce rostlin, které mohly mít odlišné podmínky pro růst (půdní, srážkové), výsledky mohou být do jisté míry ovlivněny i tím, jak si každá rostlina akumuluje tyto prvky pro svůj vývoj.

5.2 STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Statistické srovnání výsledků bylo realizováno průběžně pro všechny experimentální systémy a všechna rozpouštědla. V této části práce jsou uvedeny některé společné závěry statistické analýzy, vyplývající ze zpracování dat jak metodami klasické, tak vícerozměrné statistiky s cílem poukázat na významnost rozdílů mezi jednotlivými parametry, jako i vliv některých faktorů (posklizňové úpravy, lokality, roku produkce a rozpouštědla) na hodnoty naměřených experimentálních charakteristik. Mimo jiné jsme se pokusili pomocí vícerozměrné statistiky některé vlastnosti studovaných systémů zobrazit.

5.2.1 Statistické porovnání vodných extraktů

Statisticky významné deskriptory pro komparaci vodných extraktů z léčivých rostlin dle zvolených kritérií – jednorozměrná analýza

Za účelem zjištění statisticky významných deskriptorů pro identifikaci a odlišení analyzovaných vodných extraktů z léčivých rostlin byly naměřené parametry podrobeny statistickému porovnání metodou ANOVA s využitím Tukey-HSD testu, která umožňuje provádět vícenásobné porovnávání středních hodnot. Pro porovnání skupinových průměrů byly jako faktory použity: posklizňová úprava, lokalita a rok produkce. Za statisticky významné byly považovány rozdíly s hodnotou $P < 0,05$.

Při porovnání vzorků z hlediska posklizňových úprav (Tab. 22), v nichž byly zahrnuty všechny roky produkce, lokality a druhy léčivých rostlin, byly v souladu s předešlými výsledky zjištěny statisticky významné rozdíly ve většině sledovaných parametrů (14 ze 32). U 12 ze 14 parametrů byly kvantitativně vyšší hodnoty zjištěny u sušených vzorků ve srovnání se zmraženými, pouze v případě světlosti L^* a obsahu Fe byly vyšší hodnoty zaznamenány u zmražených vzorků.

Porovnáním lokalit bylo zjištěno, že u většiny parametrů nebyly zaznamenány rozdíly, naznačující jisté podobnosti lokalit. Lokality byly z hlediska obsahu fenolických sloučenin, barevných charakteristik i minerálního složení velmi podobné. Rozdíly byly zjištěny pouze u obsahu K a Na, kdy vzorky ze ZU měly vyšší obsahy těchto prvků.

Obdobně ani v případě roků produkce (rok 2015 vs. 2016) nebyly u většiny parametrů rozdíly statisticky významné, v případě že do analýzy byly zahrnuty všechny posklizňové úpravy, lokality a druhy léčivých rostlin. Jisté rozdíly byly zaznamenány v minerálním složení. Kvantitativně vyšší hodnoty mědi, sodíku a železa byly zjištěny u vodných extraktů pocházejících z roku 2015.

Tab. 22: Statisticky významné rozdíly vybraných parametrů u vodných extraktů ze zmražených a sušených vzorků léčivých rostlin produkovaných během dvou let 2015, 2016 a sklizených ve dvou různých lokalitách ($P < 0,05$). Zápis $X - Y$ značí, že $X > Y$

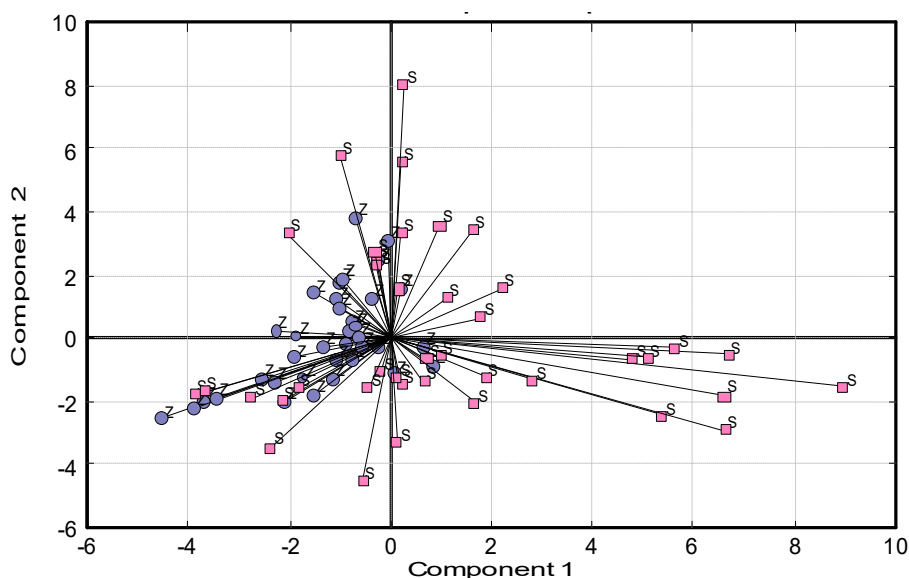
Parametr	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost $P < 0,05$
Zmražené (Z) vs. sušené (S) léčivé rostliny				
(zahrnuje všechny roky produkce, lokality a druhy léčivých rostlin)				
TPC	S – Z	12,8	4,3	0,0038
TFC	S – Z	8,2	2,7	0,0038
L*	Z – S	0,9	0,2	0,0002
b*	S – Z	1,9	0,4	0,0000
C*	S – Z	1,9	0,4	0,0000
h°	S – Z	4,2	1,5	0,0064
BI	S – Z	2,0	0,5	0,0001
TEAC _{ABTS++}	S – Z	89,5	23,3	0,0003
Fe	Z – S	1,8	0,9	0,0410
Mn	S – Z	6,9	2,7	0,0108
Na	S – Z	452,8	222,2	0,0452
P	S – Z	536,8	207,6	0,0117
chlorogenová	S – Z	146,1	60,8	0,0188
kávová	S – Z	166,4	53,8	0,0028
Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity (MU) vs. Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně (ZU)				
(zahrnuje všechny posklizňové úpravy, roky produkce a druhy léčivých rostlin)				
K	ZU – MU	3 065,1	1 257,1	0,0172
Na	ZU – MU	646,5	215,3	0,0037
Rok 2015 (15) vs. rok 2016 (16)				
(zahrnuje všechny posklizňové úpravy, lokality a druhy léčivých rostlin)				
Cu	15 – 16	1,7	0,8	0,0391
Fe	15 – 16	2,3	0,8	0,0087
Na	15 – 16	531,0	219,6	0,0180

Diskriminace vodných extraktů z léčivých rostlin s využitím 32 experimentálně stanovených parametrů – vícerozměrná analýza

Vzhledem k velké variabilitě dat, většímu počtu vzorků a paralelně sledovaných parametrů byly naměřené charakteristiky statisticky zpracovány pomocí multivariační analýzy. Analýza hlavních komponent a faktorová analýza s rotací varimax byla použita za účelem grafického vyjádření rozdílů mezi vodnými extrakty léčivých rostlin bez ohledu na jakýkoli faktor (způsob posklizňové úpravy, lokality, roku produkce a druhu léčivých rostlin) a metody diskriminační analýzy za účelem tyto rozdíly i kvantifikovat.

Metodou hlavních komponent (PCA – Principal Component Analysis) bylo původních 32 experimentálních parametrů transformováno na nové proměnné – hlavní komponenty, přičemž první čtyři komponenty kumulativně vysvětlují 59,2 % variability celého systému, přičemž vezmou-li se do úvahy vlastní vektory s vahou > 1 , na popis vlastností systému je nutno použít

9 komponent, které vysvětlují variabilitu dat na 80,7 %. Z hlediska váhy jednotlivých parametrů pro konstrukci se jako nejvýznamnější ukázaly být v 1. komponentě hodnoty TPC, TEAC_{ABTS+} a chromatická složka b*, zatímco v druhé komponentě obsah rutin a chlorogenové kyseliny, ve 3. komponentě obsah vápníku a světlosti L* a ve 4. komponentě obsah kvercetinu a TEAC_{ABTS+}. Výsledky PCA analýzy vodných extraktů za použití 32 experimentálně sledovaných parametrů pro konstrukci komponent jsou znázorněny na Obr. 37, z výsledků je zřejmé, že vlastní vektory jsou diferencovány částečně do dvou oblastí dle posklizňové úpravy, což ukazuje významný vliv úpravy vzorků na jejich vlastnosti.

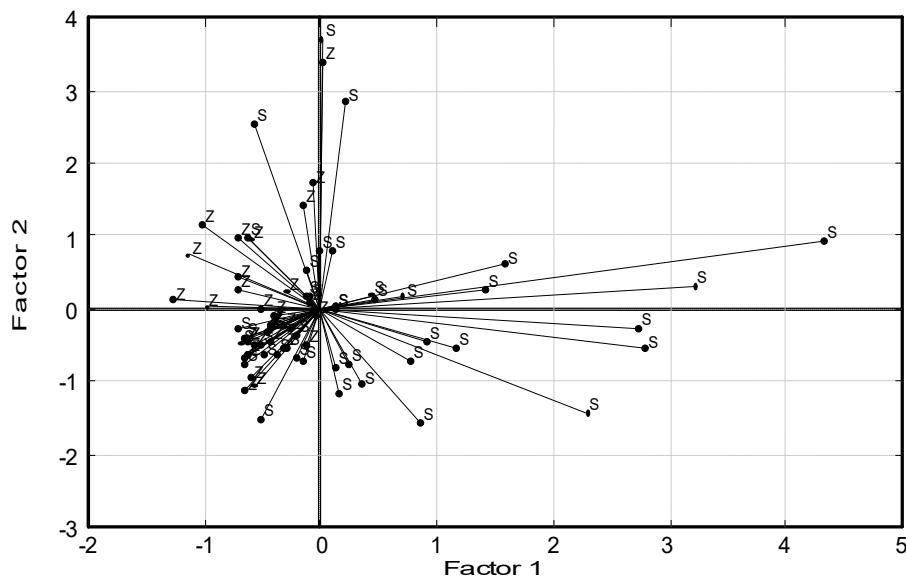


Obr. 37: Diferenciace vodných extraktů léčivých rostlin metodou PCA za použití všech 32 experimentálně sledovaných parametrů pro konstrukci komponent. Analýza byla uskutečněna bez ohledu na lokalitu, rok produkce a druh. Odlišné barvy vektorů odpovídají odlišným způsobům úpravy vzorků (Z – zmražené a S – sušené)

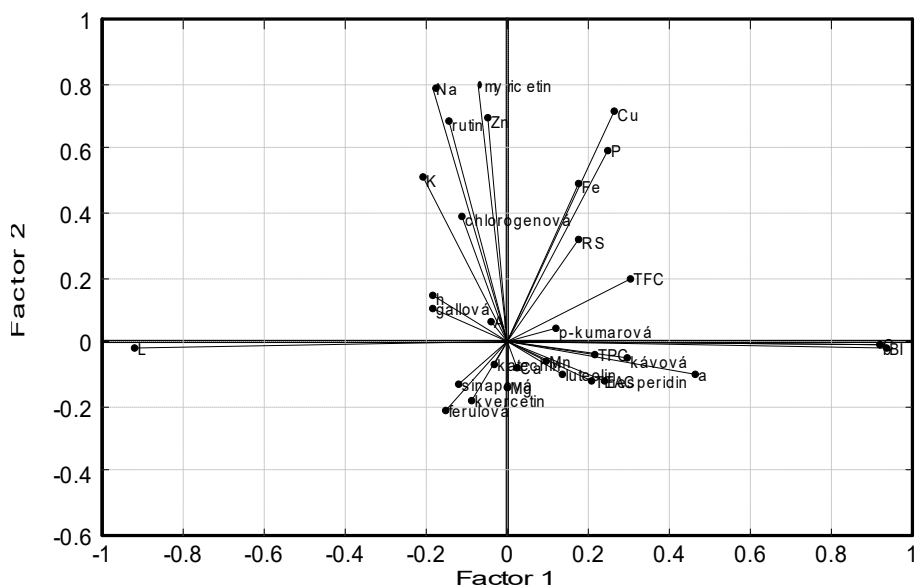
Faktorovou analýzou (PCF – Principal Component Factoring) byla prostudována vzájemná korelační schopnost všech parametrů. Prvním krokem faktorové analýzy je realizace analýzy hlavních komponent, která je zobrazená jako graf faktorových skóre (Obr. 38a). Oba diagramy – tj. Obr. 37 a Obr. 38a, jsou si podobné a jejich interpretace je prakticky identická; i z Obr. 38a jsou patrné dominující rozdíly mezi posklizňovou úpravou vzorků jako hlavní diskriminační faktor. Z grafu faktorů (Obr. 38b) je zřejmé, které z parametrů vodných extraktů léčivých rostlin vzájemně korelují a které nikoli. Obecně, čím blíže se v prostoru vektory odpovídající jednotlivým parametrům nacházejí, tím je jejich vzájemná korelace (a zastupitelnost při diskriminaci) vyšší.

Konkrétně u parametrů TPC s kávovou kyselinou; dále u hodnot TEAC_{ABTS+} s obsahem hesperidinu, luteolinu a katechinu; hodnot RS% s obsahem Cu a Fe nebo také barevných parametrů BI a C* jsou vidět vzájemné korelace. Faktorová analýza vyselektovala barevné charakteristiky světlosti L*, chromatickou složku b*, BI a TFC jako markery diskriminující vodné extrakty z léčivých rostlin podle posklizňové úpravy s největším účinkem.

a)



b)



Obr. 38: Graf faktorových skóre a) a graf faktorů b) pro vodné extrakty léčivých rostlin konstruovaný pomocí faktorové analýzy (PCF) v rotaci varimax za použití 32 experimentálně stanovovaných parametrů; použité zkratky: Z – zmražené a S – sušené

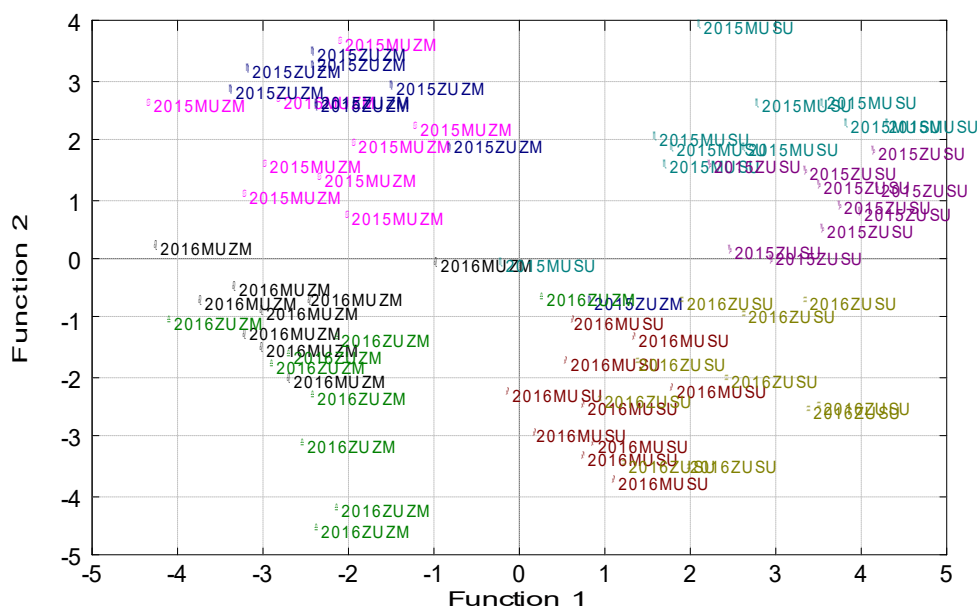
V dalším kroku byly využity metody diskriminační analýzy (CDA a metoda k-tého nejbližšího souseda) za účelem kvantifikovat, popřípadě vizualizovat rozdíly mezi posklizňovou úpravou, lokalitami a roky produkce u vodných extraktů z léčivých rostlin. Výsledky statistické analýzy vodných extraktů léčivých rostlin podle zvolených kritérií jsou uvedeny v Tab. 23.

Tab. 23: Klasifikační skóre vodných extraktů léčivých rostlin pomocí metod kanonické diskriminační analýzy a metody k-tého nejbližšího souseda pro různá klasifikační kritéria

Metoda	Klasifikační kritérium		
	Posklizňová úprava	Lokalita	Rok produkce
CDA	97,4 %	84,2 %	96,1 %
k-tý nejbližší soused	k = 1	100 %	100 %
	k = 2	81,6 %	65,8 %

Při diskriminaci vodných extraktů pomocí CDA podle posklizňové úpravy bylo 97,4 % vzorků správně zařazeno, pouze dva zmražené vzorky byly zařazeny nesprávně. Z hodnot diskriminačních koeficientů vyplývá, že při diskriminaci byly jako parametry s nejvyšší diskriminační silou využity: chromatická složka b*, BI a TPC. Pro účely diferenciacce a klasifikace vodných extraktů léčivých rostlin byla také použita metoda k-tého nejbližšího souseda, která rozlišila úpravy vzorků se 100% správností pro k = 1 a u k = 2 klesla klasifikace na 81,6 %.

Z výsledků diskriminační analýzy (Tab. 23) vodných extraktů pro kritérium lokalita je zřejmé, že klasifikace vzorků podle lokalit ve srovnání s ostatními kritérii (posklizňovou úpravou a rokem produkce) je nižší. CDA umožnila správně klasifikovat 84,2 % vzorků, 12 ze 76 vzorků bylo nesprávně klasifikováno. Nejvhodnější parametry pro diskriminaci podle instituce byly barevné charakteristiky C*, b* a BI. Obdobně metoda k-tého nejbližšího souseda rozlišila lokality se 100% správností pro k = 1 a u k = 2 klesla klasifikace až na 65,8 %, naznačující, že v případě lokalit jsou mezi vzorky větší podobnosti.



Obr. 39: Kanonická diskriminační analýza vodných extraktů do skupin s ohledem na způsob úpravy, lokality i roku produkce. Na diskriminaci bylo využito 32 experimentálně zjištěných charakteristik. (Zkratky: ZM – zmražené, SU – sušené, MU – vzorky z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity, ZU – vzorky ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně, 2015 – rok 2015, 2016 – rok 2016)

V případě diskriminace podle roku produkce bylo 96,1 % vzorků správně klasifikováno, pouze 3 vzorky byly zařazeny nesprávně. Největší váhu pro diskriminaci podle roku produkce měly parametry b^* , C^* , BI a $TEAC_{ABTS+}$. Metoda k-tého nejbližšího souseda také diskriminovala vzorky podle roku produkce pro $k = 1$ se 100% správností a u $k = 2$ klesla klasifikace na 80,3 %.

Pro možnost vizualizace rozdílů mezi způsobem úpravy, institucí a roky produkce jsme se pokusili také o diskriminaci vzorků do skupin s ohledem na úpravu vzorku, instituci a rok produkce, kdy bylo vytvořeno 8 skupin (MU zmražené 2015, MU zmražené 2016, ZU zmražené 2015, ZU zmražené 2016, MU sušené 2015, MU sušené 2016, ZU sušené 2015, ZU sušené 2016). Z výsledků CDA analýzy (Obr. 39) je patrné, že vzorky jsou diferencovány do dvou základních skupin podle způsobu úpravy, čímž se potvrzuje dominantní vliv posklizňové úpravy vzorku identifikovaný pomocí PCA, resp. diskutovaný při popisu jednotlivých výsledků. Zmražené respektive sušené vzorky jsou lokalizovány na levé resp. pravé straně grafu diskriminačního skóre. Dále jsou zjevné rozdíly mezi roky produkce, rok 2015 respektive rok 2016 je lokalizován v horní resp. dolní části grafu. Geografické rozdíly nejsou patrné, vzorky MU a ZU jsou částečně promíchané zřejmě z důvodu relativní blízkosti lokalit.

5.2.1 Statistické porovnání ethanolových extraktů

Statisticky významné deskriptory pro komparaci ethanolových extraktů z léčivých rostlin dle zvolených kritérií – jednorozměrná analýza

Výsledky analýzy ANOVA ethanolových extraktů jsou uvedeny v Tab. 24 a 25. Hodnotila se signifikantnost rozdílů (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$) jednotlivých experimentálních charakteristik pro následující kritéria: posklizňová úprava (zmražené vs. sušené), instituce (MU vs. ZU) a roky produkce (rok 2015 vs. 2016). V souladu s očekáváním významné rozdíly mezi parametry byly zaznamenány v případě posklizňové úpravy. Z výsledků vyplývá, že většina sledovaných parametrů (TPC, TFC, TEAC_{ABTS}⁺⁺, RS%, obsahy některých minerálů K, Mg, Cu, Mn, Zn a obsahy kyseliny kávové, chlorogenové a hesperidinu) byla vyšší u sušených vzorků, s výjimkou světlosti L* a chromatické složky a*, které byly vyšší u zmražených vzorků. Je zřejmé, že úprava vzorku bude mít (podobně jako u vodných extraktů) zásadní vliv na diferenciaci vzorků.

Pokud jde o rozdíly mezi institucemi, u většiny parametrů (30 ze 32) nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly v rámci lokalit s výjimkou obsahu draslíku a sodíku, kdy byly zjištěny vyšší obsahy těchto prvků u vzorků pocházejících ze Zahradnické fakulty.

Při porovnání jednotlivých roků produkce byly zjištěny statisticky významné rozdíly u parametrů RS%, obsahu některých kovů Al, Cu a Fe a v koncentracích kyselin kávové a p-kumarové, kdy vyšší hodnoty těchto parametrů byly v roce 2015.

Tab. 24: Statisticky významné rozdíly vybraných parametrů u ethanolových extraktů ze zmražených a sušených vzorků léčivých rostlin produkovaných během dvou let 2015, 2016 a sklizených ve dvou různých lokalitách ($P < 0,05$). Zápis $X - Y$ značí, že $X > Y$

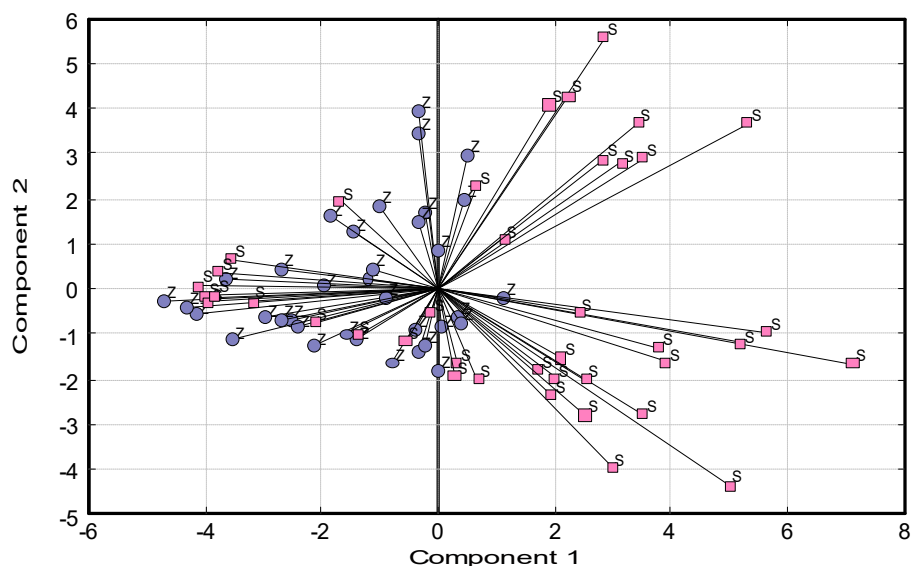
Parametr	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost $P < 0,05$
Zmražené (Z) vs. sušené (S) léčivé rostliny				
(zahrnuje všechny roky produkce, lokality a druhy léčivých rostlin)				
TPC	S – Z	11,6	5,4	0,0333
TFC	S – Z	12,9	5,1	0,0132
L*	Z – S	0,5	0,1	0,0001
a*	Z – S	0,2	0,1	0,0252
b*	S – Z	1,1	0,3	0,0003
C*	S – Z	1,1	0,3	0,0003
BI	S – Z	0,9	0,3	0,0008
TEAC _{ABTS} ⁺⁺	S – Z	87,7	31,7	0,0072
RS%	S – Z	55,0	12,8	0,0001
Cu	S – Z	1,9	0,6	0,0013
K	S – Z	6 001,7	1337,5	0,0000
Mg	S – Z	671,6	203,7	0,0015

Tab. 25: Statisticky významné rozdíly vybraných parametrů u ethanolových extraktů ze zmražených a sušených vzorků léčivých rostlin produkovaných během dvou let 2015, 2016 a sklizených ve dvou různých lokalitách ($P < 0,05$) – pokračování. Zápis $X - Y$ značí, že $X > Y$

Parametr	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost $P < 0,05$
Zmražené (Z) vs. sušené (S) léčivé rostliny				
(zahrnuje všechny roky produkce, lokality a druhy léčivých rostlin)				
Mn	S – Z	2,7	0,9	0,0035
Zn	S – Z	6,0	2,2	0,0093
chlorogenová	S – Z	175,5	71,1	0,0160
kávová	S – Z	75,7	32,6	0,0228
hesperidin	S – Z	4 260,5	1 885,5	0,0268
Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity (MU) vs. Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně (ZU)				
(zahrnuje všechny posklizňové úpravy, roky produkce a druhy léčivých rostlin)				
K	ZU – MU	3 363,7	1 454,8	0,0236
Na	ZU – MU	351,9	126,3	0,0068
Rok 2015 (15) vs. rok 2016 (16)				
(zahrnuje všechny posklizňové úpravy, lokality a druhy léčivých rostlin)				
RS%	15 – 16	73,3	11,5	0,0000
Al	15 – 16	14,3	1,2	0,0000
Cu	15 – 16	1,2	0,6	0,0406
Fe	15 – 16	3,5	0,5	0,0000
P	15 – 16	519,5	216,7	0,0191
kávová	15 – 16	73,7	32,6	0,0267
p-kumarová	15 – 16	1,7	0,8	0,0445

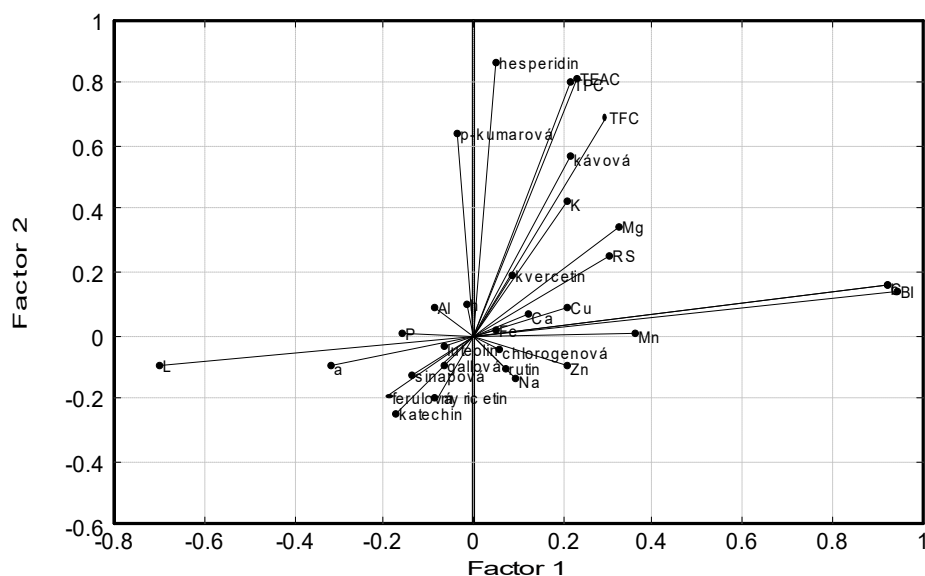
Diskriminace ethanolových extraktů z léčivých rostlin s využitím 32 experimentálně stanovených parametrů – vícerozměrná analýza

Analýzou hlavních komponent se i u ethanolových extraktů prokázala významná diferenciatní schopnost vzorků podle posklizňové úpravy – na Obr. 40 jsou částečně zřetelné dvě hlavní skupiny vektorů příslušející zmraženým respektive sušeným vzorkům. Z výsledků PCA vyplývá, že první čtyři komponenty kumulativně vysvětlují 56 % celkové variability systému a největší váhu mají v první komponentě parametry TFC, chromatická složka b^* a chromaticita C^* . Pro konstrukci druhé komponenty měly největší váhu koncentrace rutinu a myricetinu. Pro konstrukci třetí a čtvrté komponenty byly s nejvyšší váhou využity hodnoty L^* a koncentrace kyseliny kávové.



Obr. 40: Diferenciace ethanolových extraktů léčivých rostlin metodou PCA za použití všech 32 experimentálně sledovaných parametrů pro konstrukci komponent. Analýza byla uskutečněna bez ohledu na lokalitu, rok produkce a druh. Odlišné barvy vektorů odpovídají odlišným způsobům úpravy vzorků (Z – zmražené a S – sušené)

Faktorová analýza s rotací varimax (PCF), obdobně jako PCA, oddělila zmražené vzorky od sušených vzorků tím, že je lokalizovala do pravé respektive levé poloviny grafu faktorových skóre (data vzhledem k podobnostem s PCA nejsou prezentována). PCF selektovala hodnoty barevných parametrů BI, b*, C*, L* a TEAC_{ABTS++} jako markery diskriminující ethanolové extrakty podle způsobu posklizňové úpravy s největším účinkem (Obr. 41).



Obr. 41: Graf faktorů pro ethanolové extrakty léčivých rostlin konstruovaný pomocí faktorové analýzy (PCF) v rotaci varimax za použití 32 experimentálně stanovovaných parametrů

Výsledky kanonické diskriminační analýzy a metody k-tého nejbližšího souseda ethanolových extraktů léčivých rostlin podle zvolených kritérií jsou uvedeny v Tab. 26.

Tab. 26: Klasifikační skóre ethanolových extraktů léčivých rostlin pomocí metod kanonické diskriminační analýzy a metody k-tého nejbližšího souseda pro různá klasifikační kritéria

Metoda	Klasifikační kritérium		
	Posklizňová úprava	Lokalita	Rok produkce
CDA	98,7 %	85,5 %	100 %
k-tý nejbližší soused	k = 1	100 %	100 %
	k = 2	89,5 %	75 %
			84,2 %

Při diskriminaci ethanolových extraktů pomocí CDA podle posklizňové úpravy bylo 98,7 % vzorků správně zařazeno, pouze jeden sušený vzorek (ostropestřce mariánského ze ZU z produkce v roce 2015) byl zařazen do zmražených vzorků. Z hodnot diskriminačních koeficientů vyplývá, že při diskriminaci byly využity parametry b^* , C^* a $TEAC_{ABTS^{+}}$ jako parametry s nejvyšší diskriminační silou. Obdobně metoda k-tého nejbližšího souseda rozlišila úpravy vzorků s vysokým klasifikačním skóre (se 100% správností pro $k = 1$ a u $k = 2$ klesla klasifikace na 89,5 %).

Ze získaných výsledků diskriminační analýzy (Tab. 26) ethanolových extraktů pro faktor lokalita je zřejmé, že klasifikace vzorků podle lokalit ve srovnání s ostatními kritérii (posklizňovou úpravou a rokem produkce) je nižší. CDA umožnila správně klasifikovat 85,5 % vzorků, 11 ze 76 vzorků bylo nesprávně klasifikováno. Nejvhodnější parametry pro diskriminaci podle instituce byly barevné charakteristiky C^* , b^* a BI, což je identické s vodnými extrakty. Obdobně metoda k-tého nejbližšího souseda rozlišila lokality se 100% správností pro $k = 1$ a u $k = 2$ klesla klasifikace až na 75 %. Z výsledků protických rozpouštědel (voda, 50% ethanol) je zřejmé, že v rámci lokalit jsou jisté podobnosti.

V případě diskriminace podle roku produkce bylo pomocí CDA 100 % vzorků správně klasifikováno. Nejvhodnější parametry pro diskriminaci podle roku produkce byly barevné charakteristiky C^* , b^* a TPC. Při klasifikaci podle roku produkce pomocí metody k-tého nejbližšího souseda byly také odděleny jednotlivé vzorky se 100% správností pro $k = 1$. Pro $k = 2$ správnost zařazení klesla na 84,2 %.

5.2.2 Statistické porovnání DMSO extraktů

Statisticky významné deskriptory pro komparaci DMSO extraktů z léčivých rostlin dle zvolených kritérií – jednorozměrná analýza

V Tab. 27 jsou shrnuty výsledky analýzy ANOVA, zaměřené na hledání významných rozdílů mezi extrakty zmražených a sušených vzorků léčivých rostlin v DMSO. Zatímco u vodných a ethanolových extraktů byly statisticky vyšší hodnoty parametrů u sušených vzorků, v případě extrakce do DMSO je vhodnější úprava vzorků zmražováním.

Tab. 27: Statisticky významné rozdíly vybraných parametrů u DMSO extraktů ze zmražených a sušených vzorků léčivých rostlin produkovaných během dvou let 2015, 2016 a sklizených ve dvou různých lokalitách ($P < 0,05$). Zápis $X - Y$ značí, že $X > Y$

Parametr	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost $P < 0,05$
Zmražené (Z) vs. sušené (S) léčivé rostliny				
(zahrnuje všechny roky produkce, lokality a druhy léčivých rostlin)				
TPC	Z – S	16,1	6,4	0,0139
Al	Z – S	3,2	0,6	0,0000
Cu	Z – S	9,2	2,3	0,0001
Fe	Z – S	1,5	0,6	0,0154
K	Z – S	5 633,9	764,9	0,0000
Mg	Z – S	334,3	70,9	0,0000
Na	Z – S	262,7	70,9	0,0004
P	Z – S	254,7	29,6	0,0000
Zn	Z – S	13,7	1,5	0,0000
gallová	Z – S	61,2	30,0	0,0450
kávová	Z – S	77,0	24,0	0,0020
ferulová	Z – S	159,2	67,3	0,0207
Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity (MU) vs. Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně (ZU)				
(zahrnuje všechny posklizňové úpravy, roky produkce a druhy léčivých rostlin)				
Cu	ZU – MU	5,3	2,4	0,0350
Na	ZU – MU	156,7	74,9	0,0399
Rok 2015 (15) vs. rok 2016 (16)				
(zahrnuje všechny posklizňové úpravy, lokality a druhy léčivých rostlin)				
RS%	15 – 16	43,8	8,2	0,0000
Al	15 – 16	1,8	0,7	0,0085
Cu	15 – 16	12,6	2,0	0,0000
Na	15 – 16	224,6	72,5	0,0028
kávová	15 – 16	52,2	24,9	0,0392

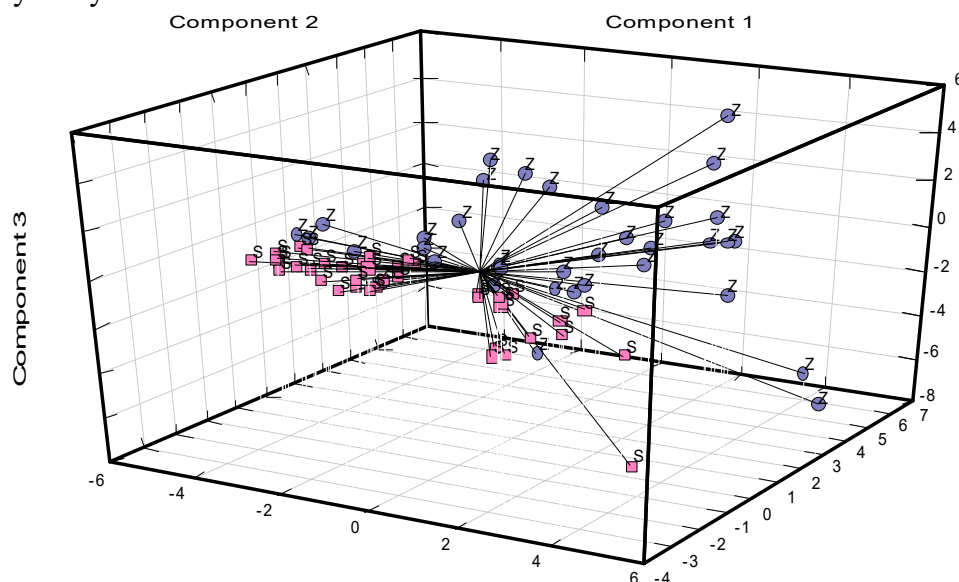
Statisticky vyšší hodnoty byly zaznamenány u TPC, obsahu gallové, kávové a ferulové kyseliny, obsahu Cu, Fe, K, Mg, Na, P a Zn u zmražených vzorků ve srovnání se vzorky sušenými. Z výsledků je zřejmé, že DMSO se liší svým charakterem od protických rozpouštědel (vody a 50% ethanolu).

V případě komparace lokalit u většiny parametrů (30 ze 32) nebyly zjištěny rozdíly. Signifikantní se ukázaly pouze rozdíly v minerálním složení, tj. obsahu mědi a sodíku. Kvantitativně vyšší hodnoty těchto parametrů byly zjištěny u Zahradnické fakulty.

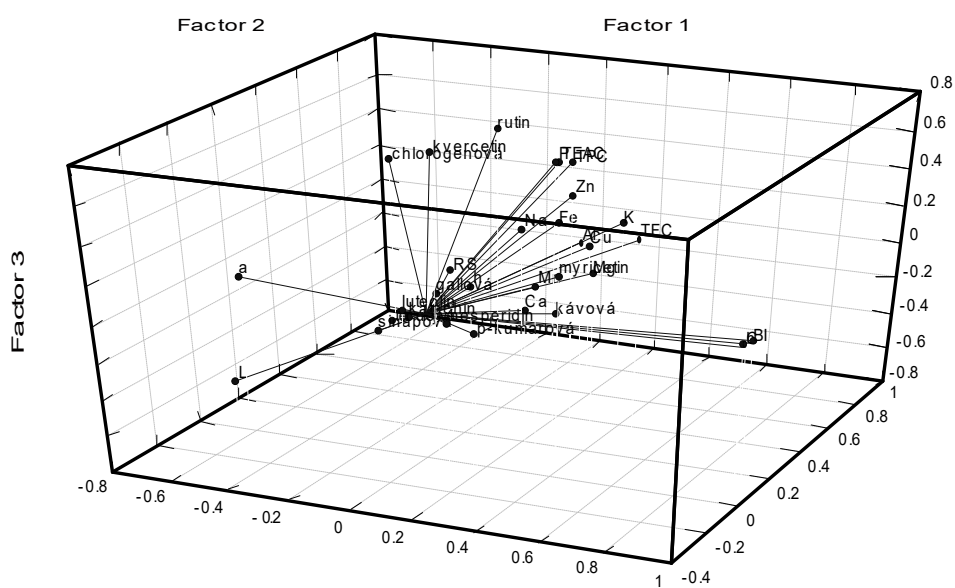
Při porovnání roků produkce se projevily významné rozdíly v hodnotě RS%, v obsahu kyseliny kávové a některých minerálů (Cu, Na, Al), kdy v roce 2015 byly u těchto parametrů zjištěny vyšší hodnoty.

Diskriminace DMSO extraktů z léčivých rostlin s využitím 32 experimentálně stanovených parametrů – vícerozměrná analýza

Obr. 42 znázorňuje výsledky PCA analýzy DMSO extraktů, kdy faktorem byla zvolena posklizňová úprava. Z grafu jsou, obdobně jako u protických systémů patrné rozdíly mezi úpravami vzorků. První čtyři komponenty kumulativně vysvětlují 60,2 % variability systému. Největší význam v první komponentě mají parametry TPC, TFC a TEAC_{ABTS+}, v druhé komponentě obsah hliníku a mědi, v třetí a čtvrté komponentě koncentrace rutinu, chlorogenové a ferulové kyseliny.



Obr. 42: Diferenciace DMSO extraktů léčivých rostlin metodou PCA za použití všech 32 experimentálně sledovaných parametrů pro konstrukci komponent. Analýza byla uskutečněna bez ohledu na lokalitu, rok produkce a druh. Odlišné barvy vektorů odpovídají odlišným způsobům úpravy vzorků (Z – zmražené a S – sušené)



Obr. 43: Graf faktorů pro DMSO extrakty léčivých rostlin konstruovaný pomocí faktorové analýzy (PCF) v rotaci varimax za použití 32 experimentálně stanovených parametrů

Z faktorové analýzy je patrné (Obr. 43), že parametry BI, b*, C*, obsah draslíku i TPC jsou důležitými parametry při diskriminaci vzorků podle posklizňové úpravy. Z grafu je také patrná vzájemná korelace TPC a TEAC_{ABTS^{•+}}, a zároveň barevných parametrů chromaticity a chromatické složky b* a BI.

Obdobně jako u předchozích systémů byly i v extraktech v DMSO zjišťovány klasifikační skóre pro zvolená kritéria (posklizňová úprava, lokalita a rok produkce) pomocí kanonické diskriminační analýzy a metody k-tého nejbližšího souseda (Tab. 28). Při diskriminaci metodou CDA podle posklizňové úpravy byly vzorky ze 100 % správně klasifikovány, nejdůležitější parametry pro diskriminaci byly parametry BI, b* a TPC. V případě klasifikace podle lokality byly opět zaznamenány nižší klasifikační skóre oproti úpravě vzorku i roku produkce, naznačující podobnost lokalit. Nejdůležitější parametry pro diskriminaci dle lokality byly BI, chromatická složka b* a TPC. V případě klasifikace podle roků produkce pomocí CDA bylo 96,1 % vzorků správně klasifikováno, největší váhu měly parametry BI a b*.

Tab. 28: Klasifikační skóre DMSO extraktů léčivých rostlin pomocí metod kanonické diskriminační analýzy a metody k-tého nejbližšího souseda pro různá klasifikační kritéria

Metoda	Klasifikační kritérium		
	Posklizňová úprava	Lokalita	Rok produkce
CDA	100 %	82,9 %	96,1 %
k-tý nejbližší soused	k = 1	100 %	100 %
	k = 2	96,1 %	61,8 %

5.2.3 Statistické porovnání extrakční výtěžnosti všech rozpouštědel

Metodou ANOVA byly také zjišťovány statisticky významné rozdíly při porovnání extrakční účinnosti jednotlivých rozpouštědel zvláště pro extrakty ze zmražených a sušených léčivých rostlin.

Mražené vzorky

Z výsledků, které jsou shrnuty v Tab. 29 a 30, je patrné, že u zmražených vzorků se jeví jako nejvhodnější pro extrakci fenolických sloučenin, flavonoidů (hesperidin, kvercetin), antioxidantů a barviv DMSO. Pro extrakci minerálů se jeví vhodnější voda, což je v souladu s předešlými výsledky analýz. Z hlediska analytického je DMSO pro extrakci fenolických sloučenin a antioxidantů výbornou volbou, avšak z hlediska dalšího využití v potravinářství je jeho použití prakticky nemožné. Proto by při aplikaci do potravinářství byly vhodnější protické systémy (50% ethanol, voda). 50% ethanol se pro extrakci flavonoidů ze zmražených matric osvědčil lépe než voda, proto by bylo jeho použití vhodnější.

Tab. 29: Statisticky významné rozdíly u vybraných parametrů v extrakční účinnosti rozpouštědel pro zmražené vzorky léčivých rostlin produkovaných během dvou let 2015, 2016 a sklizených ve dvou různých lokalitách ($P < 0,05$). Zápis $X - Y$ značí, že $X > Y$

Parametr	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost $P < 0,05$
Deionizovaná voda (V) vs. 50% ethanol (E) vs. DMSO (D)				
(zahrnuje všechny roky produkce, lokality a druhy léčivých rostlin)				
TPC	D – V	25,2	5,0	0,0000
	D – E	17,5	5,0	0,0020
TFC	D – V	28,2	4,6	0,0000
	E – V	11,1	4,6	0,0428
	D – E	17,1	4,6	0,0009
L*	E – D	0,9	0,1	0,0000
	V – D	0,6	0,1	0,0006
a*	V – D	1,8	0,2	0,0000
	E – D	1,6	0,2	0,0000
b*	D – E	5,3	0,6	0,0000
	D – V	5,0	0,6	0,0000
C*	D – E	5,4	0,7	0,0000
	D – V	5,2	0,7	0,0000
h°	D – V	17,7	1,9	0,0000
	E – V	11,3	1,9	0,0000
	D – E	6,4	1,9	0,0030
BI	D – E	4,5	0,6	0,0000
	D – V	3,9	0,6	0,0000
TEAC _{ABTS+}	D – V	133,5	27,3	0,0000
	D – E	91,2	27,3	0,0033
Ca	V – D	4 302,2	541,2	0,0000
	V – E	4 013,3	541,2	0,0000
Cu	D – E	8,4	1,9	0,0001
	D – V	8,2	1,9	0,0002
Fe	V – E	4,3	0,8	0,0000
	V – D	3,6	0,8	0,0000
K	V – D	5 250,5	1 002,4	0,0000
	V – E	5 008,9	1 002,3	0,0000
Mg	V – D	1 421,6	195,1	0,0000
	E – D	526,1	195,1	0,0220
	V – E	895,5	195,1	0,0000
Mn	V – D	7,1	1,0	0,0000
	V – E	6,1	1,0	0,0000
Na	V – D	736,4	163,3	0,0001
	V – E	690,0	163,3	0,0002

Tab. 30: Statisticky významné rozdíly u vybraných parametrů v extrakční účinnosti rozpouštědel pro zmražené vzorky léčivých rostlin produkovaných během dvou let 2015, 2016 a sklizených ve dvou různých lokalitách ($P < 0,05$) – pokračování. Zápis $X - Y$ značí, že $X > Y$

Parametr	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost $P < 0,05$
Deionizovaná voda (V) vs. 50% ethanol (E) vs. DMSO (D)				
(zahrnuje všechny roky produkce, lokality a druhy léčivých rostlin)				
P	V – D	1 237,4	184,7	0,0000
	E – D	916,1	184,7	0,0000
hesperidin	D – V	10 402,0	4 159,9	0,0368
	D – E	10 123,6	4 159,9	0,0436
kvercetin	D – V	257,8	105,2	0,0419

Sušené vzorky

V případě sušených vzorků není zcela jednoznačné, který systém je pro extrakci fenolických sloučenin a látek s antioxidačním účinkem nejvhodnější. V rámci parametrů TPC a TEAC_{ABTS+} jsou mezi systémy velké podobnosti v extrakční účinnosti (i když ANOVA zjistila patrně vyšší hodnoty TPC, TEAC_{ABTS+} u 50% ethanolu), v těchto parametrech nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi rozpouštědly.

Z výsledků statistického porovnání extrakční účinnosti pro suché matrice (Tab. 31 a 32) je patrné, že se nejvíce u jednotlivých parametrů odlišuje DMSO od protických systémů (vody a 50% ethanolu). DMSO se jeví vhodnější pro extrakci barviv, naopak pro extrakci antioxidantů (RS%), kyseliny kávové, makroprvků a mikroprvků jsou pro sušené vzorky vhodnější protické systémy. Z výsledků je zřejmé, že obsah flavonoidů je ze statistického hlediska u 50% ethanolu a DMSO porovnatelný (i když v 50% ethanolu byly celkové obsahy flavonoidů vyšší ve srovnání s DMSO). Největší rozdíly jsou v extrakční účinnosti mezi 50% ethanolem a vodou, kdy pro flavonoidy je vhodnější použití 50% ethanolu. Celkově bez ohledu na způsob úpravy vzorku je pro extrakci flavonoidů 50% ethanol vhodnější ve srovnání s vodou. Při porovnání vody a 50% ethanolu lze vyzorovat, že kromě rozdílu v celkovém obsahu flavonoidů se extrakty liší i v obsahu individuálních prvků. Ve vodě se lépe extrahují makroprvky a některé mikroprvky (hlavně Fe a Mn, které mohou mít prooxidační charakter a mohou ovlivňovat antioxidační vlastnosti). 50% ethanol byl vybrán jako nejvhodnější systém pro extrakci flavonoidů pro aplikaci v potravinářském průmyslu i u sušených vzorků léčivých rostlin, vzhledem k tomu, že oproti DMSO nedráždí sliznici a také ve srovnání s vodou poskytuje vyšší obsahy flavonoidů, je vhodnější i z hlediska dlouhodobějšího uchování, kdy po mikrobiální stránce je koncentrace ethanolu dostatečná pro konzervaci extraktu. Pro následnou potravinářskou aplikaci byl vybrán 50% ethanol a také úprava sušením, která poskytuje vyšší obsahy fenolických sloučenin.

Tab. 31: Statisticky významné rozdíly u vybraných parametrů v extrakční účinnosti rozpouštědel pro sušené vzorky léčivých rostlin produkovaných během dvou let 2015, 2016 a sklizených ve dvou různých lokalitách ($P < 0,05$). Zápis $X - Y$ značí, že $X > Y$

Parametr	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost $P < 0,05$
<i>Deionizovaná voda (V) vs. 50% ethanol (E) vs. DMSO (D)</i>				
(zahrnuje všechny roky produkce, lokality a druhy léčivých rostlin)				
TFC	E – V	15,9	5,1	0,0058
L*	E – D	0,7	0,3	0,0066
	E – V	0,7	0,3	0,0101
a*	V – D	2,2	0,3	0,0000
	E – D	1,8	0,3	0,0000
b*	D – E	4,5	0,8	0,0000
	D – V	1,2	0,8	0,0001
C*	D – E	4,8	0,8	0,0000
	D – V	3,7	0,8	0,0000
h°	D – V	12,2	2,3	0,0000
	D – E	7,9	2,3	0,0022
BI	D – E	3,6	0,7	0,0000
	D – V	2,0	0,7	0,0145
RS%	V – D	45,9	8,6	0,0000
	E – D	44,9	8,6	0,0000
Ca	V – D	5 933,5	666,8	0,0000
	V – E	4 712,3	666,8	0,0000
Fe	V – D	3,3	0,7	0,0000
	V – E	1,8	0,7	0,0191

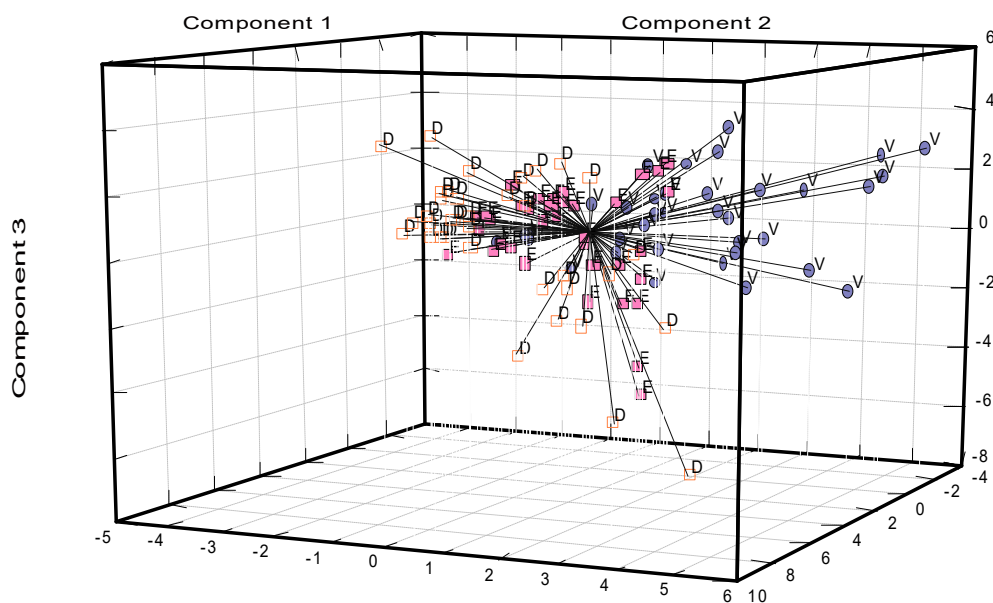
Tab. 32: Statisticky významné rozdíly u vybraných parametrů v extrakční účinnosti rozpouštědel pro sušené vzorky léčivých rostlin produkovaných během dvou let 2015, 2016 a sklizených ve dvou různých lokalitách ($P < 0,05$) – pokračování. Zápis $X - Y$ značí, že $X > Y$

Parametr	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost $P < 0,05$
Deionizovaná voda (V) vs. 50% ethanol (E) vs. DMSO (D)				
(zahrnuje všechny roky produkce, lokality a druhy léčivých rostlin)				
K	V – D	11 540,7	1 278,0	0,0000
	E – D	11 470,2	1 278,0	0,0000
Mg	V – D	1 996,3	209,9	0,0000
	E – D	1 532,0	209,9	0,0000
Mn	V – D	14,3	2,0	0,0000
	V – E	10,3	2,0	0,0000
Na	V – D	546,3	146,9	0,0009
	E – D	390,3	146,9	0,0243
P	V – D	2 028,9	168,5	0,0000
	E – D	857,6	168,5	0,0000
	V – E	1 171,3	168,5	0,0000
Zn	V – D	7,7	1,9	0,0002
	E – D	4,9	1,9	0,0275
kávová	V – D	185,8	45,4	0,0002
	E – D	110,3	45,4	0,0436

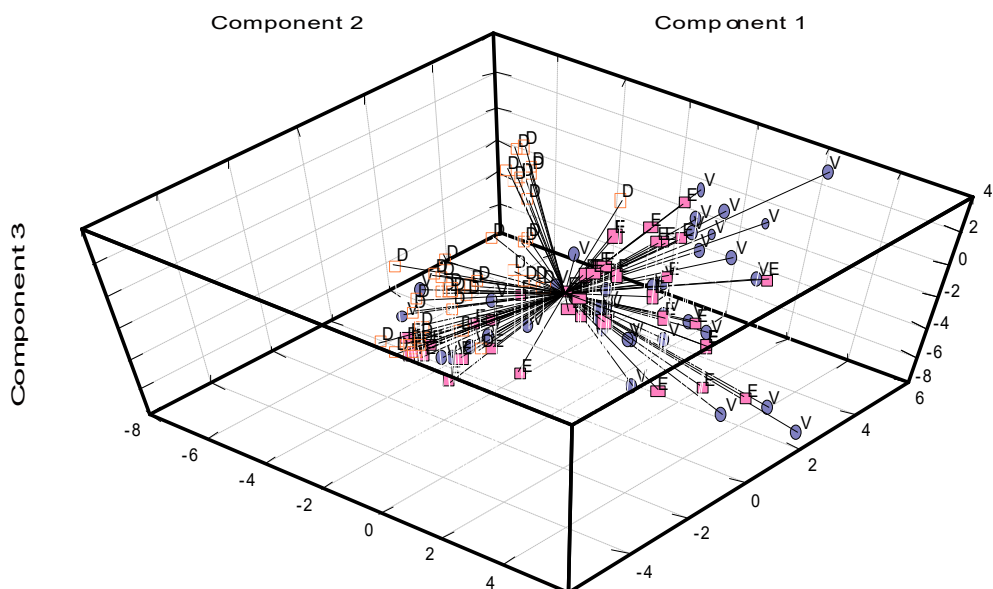
Diferenciace léčivých rostlin podle extrakčního rozpouštědla – vícerozměrná analýza

Pomocí metod PCA a diskriminační analýzy (CDA a metody k-tého nejbližšího souseda) jsme se pokusili o vizualizaci a kvantifikaci rozdílů mezi rozpouštědly zvláště pro extrakty připravené ze zmražených a sušených vzorků léčivých rostlin. Výsledky analýzy hlavních komponent jsou uvedeny na Obr. 44 a) pro extrakty ze zmražených a Obr. 44 b) ze sušených léčivých rostlin.

a)



b)



Obr. 44: Diferenciace extraktů a) ze zmražených a b) sušených léčivých rostlin metodou PCA podle rozpouštědel za použití všech 32 experimentálně sledovaných parametrů pro konstrukci komponent. Analýza byla uskutečněna bez ohledu na lokalitu, rok produkce a druh. Odlišné barvy vektorů odpovídají odlišným rozpouštědlům použitých pro extrakci (V – deionizovaná voda, E – 50% ethanol, D – DMSO)

Z analýzy hlavních komponent je patrná diferenciacie vzorků podle extrakčního rozpouštědla – je možné vyčlenit 3 skupiny vektorů jak u extraktů ze zmražených, tak sušených léčivých rostlin. V případě zmražených vzorků je diferenciací schopnost patrně výraznější. Z výsledků PCA analýzy vyplývá, že první čtyři komponenty kumulativně představují 54,2 % celkové variability systému. Z hlediska váhy jednotlivých parametrů pro konstrukci komponent se jako nejvýznamnější ukázaly být v 1. komponentě TFC, chromatická složka b* a chromaticita C*, zatímco v 2. komponentě obsah K, Mn a Fe, u 3. komponenty obsah rutinu a u 4. komponenty obsah Cu.

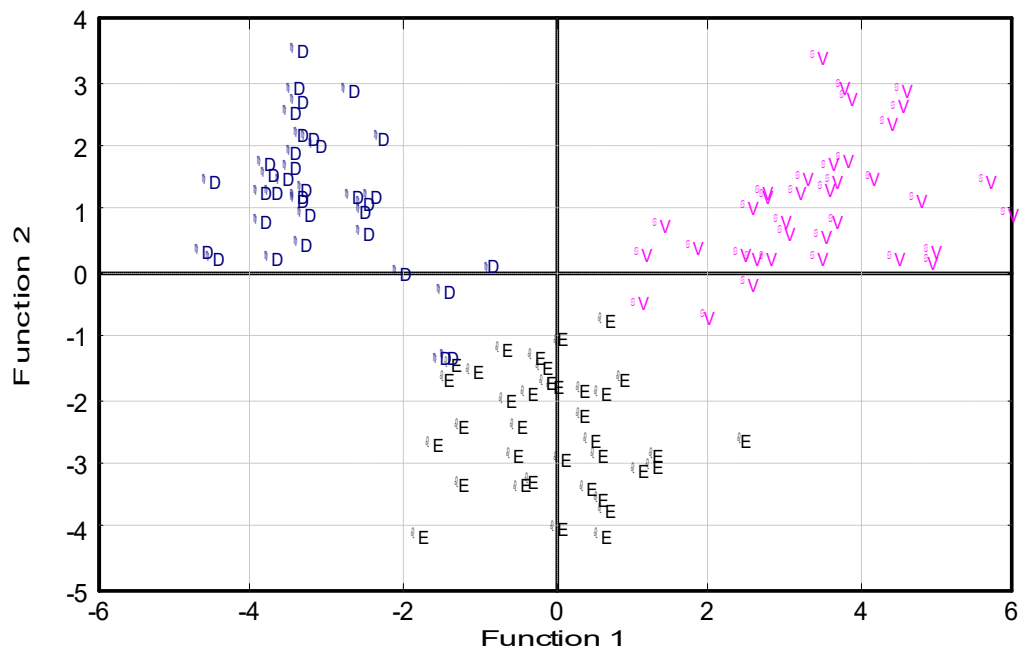
V případě sušených vzorků lze vidět větší tendenci shlukování do dvou skupin podle typu rozpouštědla: aprotické (DMSO) a protické (50% ethanol a voda). Je patrné, že 50% ethanol a voda mají větší podobnosti v extrakční účinnosti pro suché vzorky. První čtyři komponenty kumulativně vysvětlují 56,7 % variability systému. Největší význam v první komponentě má obsah draslíku a fosforu, v druhé komponentě TPC a TFC, v třetí komponentě koncentrace chlorogenové kyseliny a ve čtvrté komponentě TEAC_{ABTS}^{•+}.

Výsledky kanonické diskriminační analýzy podle druhu rozpouštědla pro zmražené (Obr. 45a) a sušené vzorky (Obr. 45b) naznačují diskriminaci vzorků do 3 diskretních zón podle použitého extrakčního systému.

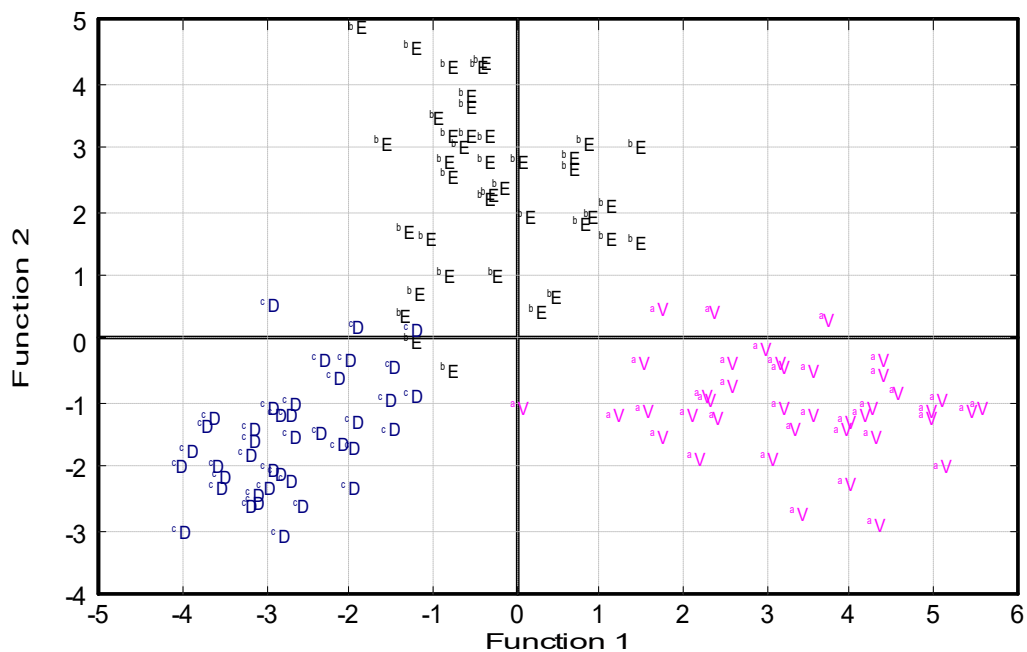
Je patrné, že největší mírou se odlišují vodné extrakty od ethanolových a DMSO extraktů, i když všechny tři typy extraktů jsou navzájem také odlišné – skupiny parametrů leží v odlišných sektorech grafu diskriminačních skóre. Dané výsledky dobře korelují s odlišnými vlastnostmi, zejména polaritou rozpouštědel jak je diskutováno v předešlých kapitolách.

Toto pozorování potvrzují i hodnoty klasifikačních skóre charakterizující úspěšnost klasifikace vzorků podle extrakčních činidel (Tab. 33) pro zmražené a sušené vzorky. Pomocí CDA bylo 97,2 % zmražených, respektive 97,5 % sušených vzorků správně klasifikováno. Jako nevýznamnější parametry pro účely diskriminace podle extrakčního činidla byly identifikovány hodnoty b*, C* a BI u zmražených i sušených vzorků. Metoda k-tého nejbližšího souseda rozlišila jednotlivé extrakční systémy u zmražených vzorků se 100% správností pro k = 1; pro k = 2 správnost klasifikace klesla na 77,8 %. U sušených vzorků bylo v případě k = 1 100 % vzorků správně klasifikováno a při k = 2 klesla úspěšnost klasifikace na 90 %.

a)



b)



Obr. 45: Kanonická diskriminační analýza extraktů a) ze zmražených a b) sušených léčivých rostlin podle druhu extrakčního rozpouštědla. Na diskriminaci bylo použito 32 experimentálně zjištěných parametrů v daném rozpouštědle. Zkratky (V – deionizovaná voda, E – 50% ethanol, D – DMSO)

Tab. 33: Klasifikační skóre zmražených a sušených vzorků léčivých rostlin podle extrakčního činidla pomocí metod kanonické diskriminační analýzy a metody k-tého nejbližšího souseda pro různá klasifikační kritéria

Metoda	Klasifikační kritérium	
	Extrakční činidlo	
Vzorky	Zmražené	Sušené
CDA	97,2 %	97,5 %
k-tý nejbližší soused	100 %	100 %
	k = 1	
	k = 2	90 %

Z výsledků analýz všech extraktů léčivých rostlin vyplývá, že vzorky léčivých rostlin lze velmi dobře odlišit podle použitých extrakčních činidel, posklizňové úpravy a roků produkce. V menší míře dokonce i podle lokalit, i když u tohoto kritéria bylo mezi vzorky nejvíce podobností, vzhledem k tomu, že lokality byly blízko sebe. Pro další potravinářskou aplikaci na základě výše zmíněných výsledků byl vybrán jako nejvhodnější systém 50% ethanol a úprava sušením.

5.3 APLIKACE VYBRANÝCH LÉČIVÝCH ROSTLIN DO POTRAVIN

Z předešlých analýz bylo zjištěno, že nejvhodnější úpravou pro potravinářské účely je sušení, nejvhodnějším extrakčním systémem 50% ethanol a z jednotlivých druhů analyzovaných léčivých rostlin má vysoké obsahy fenolických sloučenin, vysokou antioxidační aktivitu a vhodné chuťové a aromatické vlastnosti meduňka lékařská, máta peprná, třezalka tečkovaná a šalvěj lékařská. V rámci aplikační části práce byly proto vybrány tyto čtyři druhy léčivých rostlin jako nejvhodnější.

Vzorky léčivých rostlin poskytla firma Calendula a.s. jakožto třetí producent léčivých rostlin. Z kapacitních důvodů nemohly být využity experimentální vzorky z Centra léčivých rostlin Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Zahradnické fakulty z Mendelovy univerzity v Brně. Byly však použity druhově identické rostliny.

Pro aplikaci do potravin (konkrétně sirupy a odpovídající nealkoholické nápoje připravené ředěním) byl místo 50% ethanolu pro extrakci využit 25% ethanol, vzhledem k tomu, že v sirupech je limitovaná koncentrace alkoholu v surovině do 5 %, v ředěném nápoji nesmí překročit obsah alkoholu 0,5 %, což je dle platné legislativy horní hranice pro nealkoholické nápoje. V neposlední řadě také z hlediska finančního a z důvodu minimalizace manipulace se surovinou (ředění).

V rámci laboratorních testů byl testován vhodný poměr rostlinného materiálu a 25% ethanolu. Následně byla ve zvoleném poměru ve vybraných intervalech testována nasákavost materiálu a dále výtěžnost extrakce při opakovaném zalití materiálu novým rozpouštědlem. Dále byla testována výtěžnost extrakce při dlouhodobé extrakci materiálu za účelem určení vhodné extrakční doby. V poloprovozním měřítku byla testována výtěžnost extrakce pouze po zvolenou dobu. V rámci této části práce byly sledovány vybrané parametry, tj. barevné charakteristiky L*, a* a b* s využitím UV-VIS-NIR a radikál-zhášecí aktivita pomocí ABTS testu za použití EPR. Takto vyrobené extrakty byly poté aplikovány pro výrobu jednodruhových a dvoudruhových sirupů. Nápoje připravené po ředění jednodruhových a dvoudruhových sirupů byly testovány metodami sensorické analýzy (viz. kapitola 4.7).

5.3.1 Optimalizace extrakce a výroba extraktů z léčivých rostlin v poloprovozních podmínkách

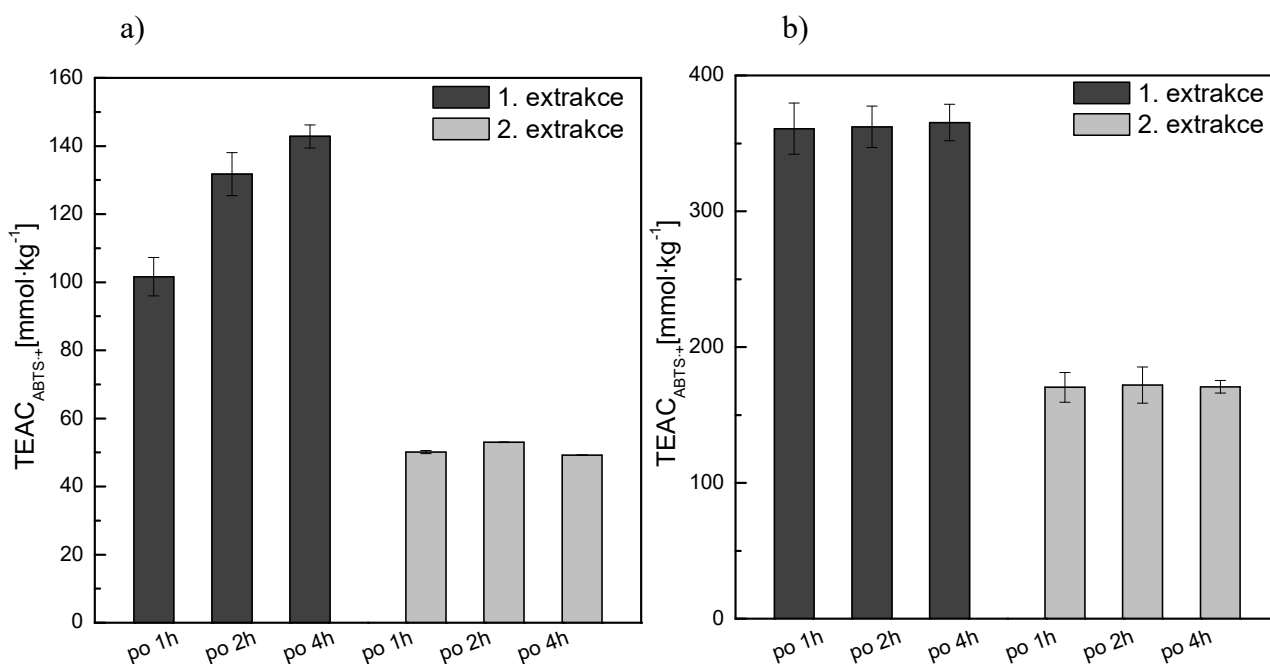
V rámci laboratorních testů byl testován vhodný poměr sušené byliny k rozpouštědлу při prosté extrakci rozpouštědlem tak, aby byl extrakt co nejkonzentrovanejší a zároveň abychom získali dostatečný objem extraktu. V případě poměrů 1:3, 1:5 po 30minutové extrakci bylo zjištěno, že bylina absorbovala většinu rozpouštědla. Výsledný objem extraktu byl velmi malý. Proto byly dále otestovány vyšší poměry rozpouštědla k bylinám: poměr 1:6 byl stále nedostatečný, poměr 1:9 už byl dostatečný u většiny léčivých rostlin s výjimkou meduňky lékařské a poměr 1:10 byl dostatečný u všech vybraných léčivých rostlin. Poměr 1:10 byl vybrán jako nejvhodnější, vzhledem k tomu, že zaručuje dostatek extraktu, cca 40–50 % původního objemu rozpouštědla.

V rámci dalších testů byla ve vybraném poměru testována nasákavost materiálu u všech sledovaných bylin při dlouhodobé extrakci ve 25% ethanolu, s cílem zjistit jaký objem extraktu po filtraci je možné očekávat. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 34. Ze zjištěných výsledků je patrné, že meduňka měla nejvyšší nasákavost, naopak třezalka nejnižší. Dále je zřejmé, že s časem se mění nasákavost bylin, ze začátku je nasákavost nižší a s větším časovým odstupem se zvyšuje, což je dáno difúzními poměry (hnačí síly, fyzikálně-chemické charakteristiky rozpouštědla...) tj. postupným prostupem rozpouštědla do rostlinného materiálu. Dále je patrné, že po 8 hodinách se nasákavost materiálu už prakticky nemění a dochází k ustanovení rovnováhy. Po 12hodinové extrakci je evidentní, že nasákavost materiálu je u jednotlivých druhů v rozmezí 50–62%, tzn. při objemu 1 l vstupního rozpouštědla by bylo možné získat cca 380–500 ml výsledného extraktu.

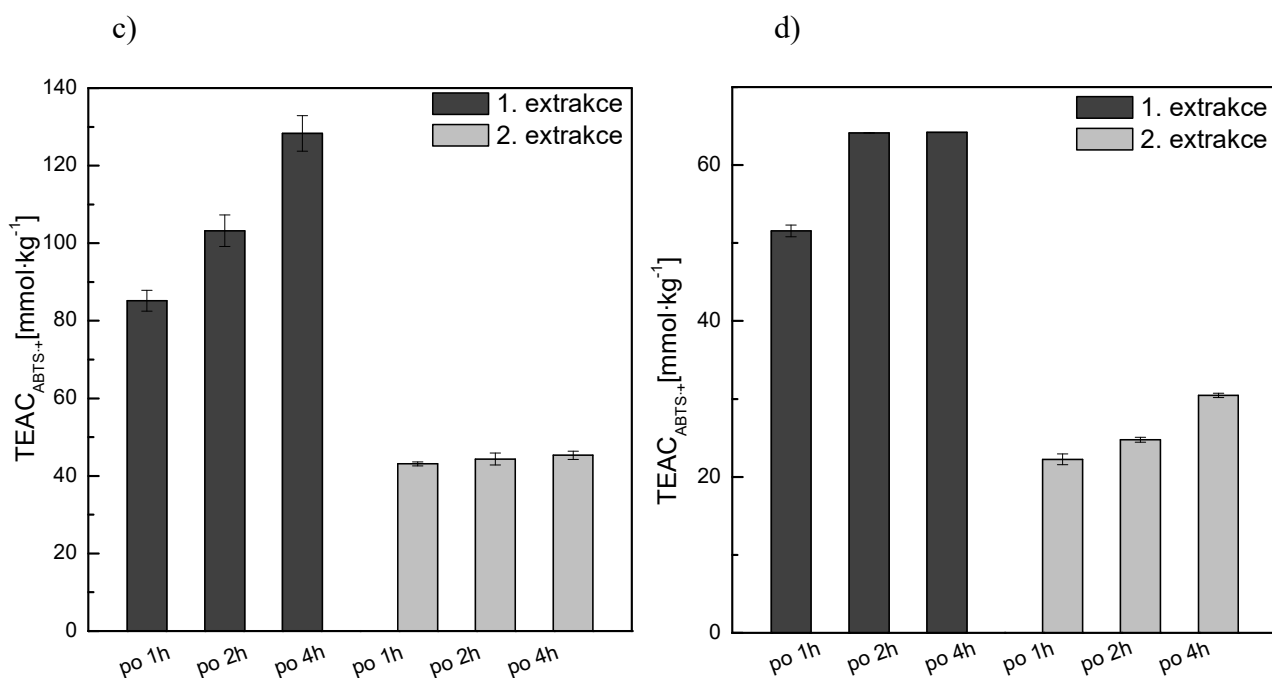
Tab. 34: Nasákavost bylin v % při dlouhodobé extrakci

Čas [h]	máta	meduňka	třezalka	šalvěj
0,5	46 ± 0,5	56 ± 0,3	40 ± 0,5	44 ± 0,5
1	47 ± 0,2	56,5 ± 0,4	42 ± 0,4	45 ± 0,4
2	54 ± 0,3	60 ± 0,2	44 ± 0,3	48 ± 0,3
4	60 ± 0,2	60 ± 0,2	48 ± 0,4	52 ± 0,3
6	60 ± 0,2	62 ± 0,5	48 ± 0,3	54 ± 0,2
8	60 ± 0,3	62 ± 0,5	50 ± 0,3	56 ± 0,2
10	60 ± 0,3	62 ± 0,4	50 ± 0,4	56 ± 0,3
12	60 ± 0,1	62 ± 0,4	50 ± 0,3	56 ± 0,2

V případě opakované extrakce – zalití materiálu novým rozpouštědlem, byla výtěžnost testována pouze v časových intervalech 1, 2 a 4 h u všech vybraných rostlin. Z naměřených dat pro hodnoty $TEAC_{ABTS^{+}}$ (Obr. 46, 47) je patrné, že při opakované extrakci rozpouštědlem je možné vytežit až o 50 % více látek s antioxidačním účinkem. Pro většinu léčivých rostlin by bylo vhodné provádět opakovanou extrakci rozpouštědlem. Avšak vzhledem k velké spotřebě rozpouštěděl, tzn. zdražení procesu a prodloužení doby extrakce se tento postup nejeví jako vhodný pro praktické využití a nebyl využit ani v rámci této práce, v dalším kroku byly aplikovány extrakty připravené jednorázovou extrakcí.

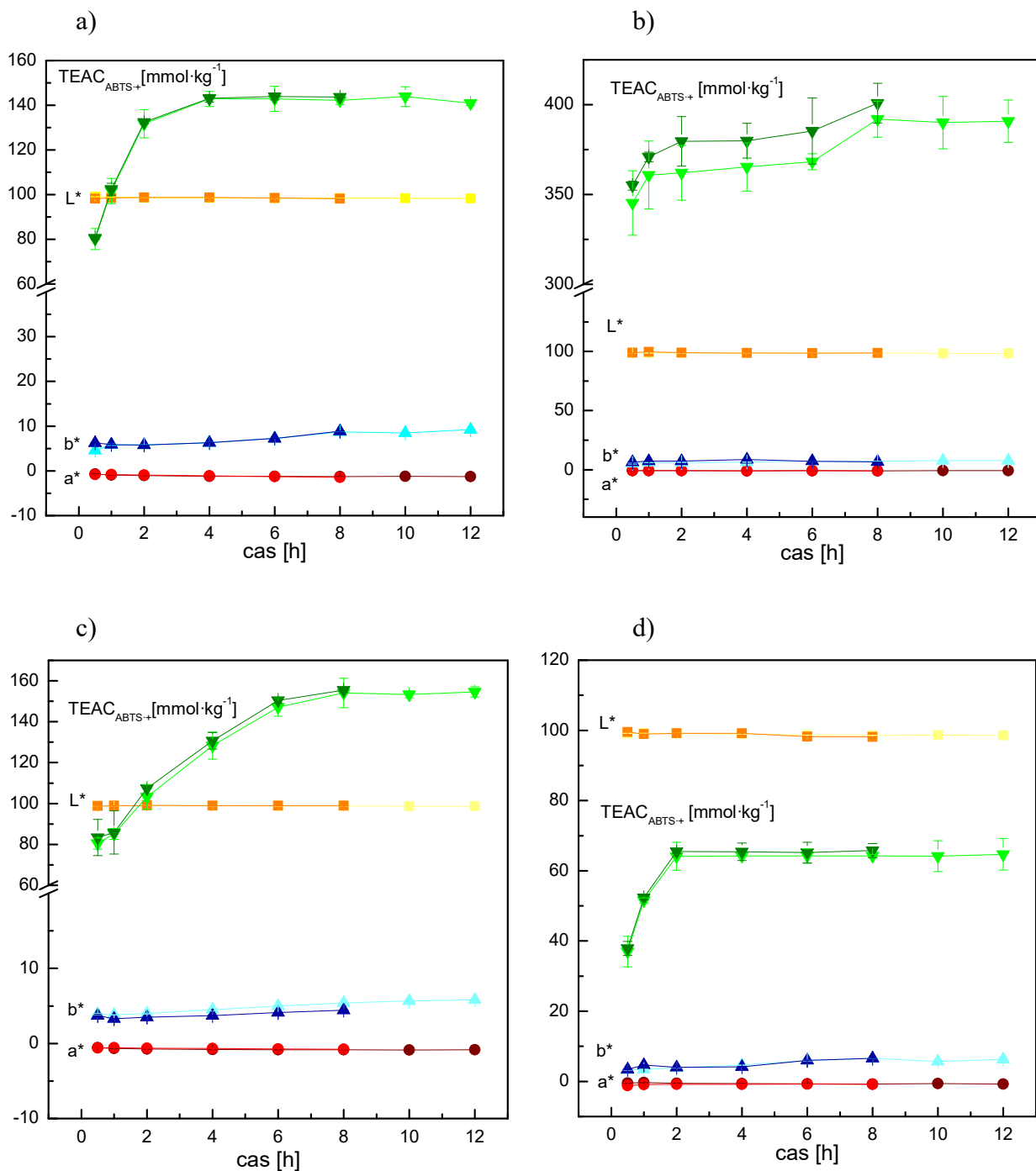


Obr. 46: Naměřené hodnoty $TEAC_{ABTS^{+}}$ (mmol·kg⁻¹) po první a druhé extrakci u vzorků a) máty a b) meduňky



Obr. 47: Naměřené hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ ($mmol \cdot kg^{-1}$) po první a druhé extrakci u vzorků c) třezalky a d) šalvěje

Následovně bylo nutné vybrat vhodnou dobu extrakce, ideálně, aby byla co nejkratší, ale zároveň došlo k ustanovení rovnováhy. Nejprve byly testy provedeny v laboratorním měřítku poté byl pokus proveden v poloprovozu s tím, že byla zkrácena doba extrakce pouze na vybranou dobu. Z výsledků antioxidační aktivity a barevných charakteristik za laboratorních podmínek (Obr. 48) je zřejmé, že již po čtyřhodinové extrakci u většiny léčivých rostlin, s výjimkou třezalky, dochází k ustanovení rovnováhy. Nejvhodnější doba pro extrakci byla u všech vybraných léčivých rostlin 8 h, kdy docházelo zcela k ustanovení rovnováhy. Tato doba dobře koreluje i s testy nasákavosti popsány výše. V další fázi byl celý test proveden v poloprovozním měřítku. Z výsledků analýz (Obr. 48) je patrné, že byly získány (v rámci chyby měření) velmi podobné koncentrace antioxidantů a barviv. Nepatrně vyšší hodnoty v případě poloprovozních podmínek mohou být způsobeny tím, že byly rostliny lépe zatíženy pomocí nerezových košů. Takto připravené extrakty (Obr. 49) byly zfiltrány přes tkaninu přímo do 15 l demižonu, který byl uchováván v chladícím boxu a následně aplikován pro přípravu jednodruhových a dvoudruhových sirupů, jak je uvedeno v části 4.6.4.



Obr. 48: Porovnání experimentálně zjištěných hodnot radikál-zhášecí aktivity a barevných charakteristik při dlouhodobé extrakci a) máty; b) meduňky; c) třezalky; d) šalvěje v laboratorním (∇ TEAC_{ABTS+}, \blacksquare L*, \bullet a*, \blacktriangle b*) a poloprovodním měřítku (∇ TEAC_{ABTS+}, \blacksquare L*, \bullet a*, \blacktriangle b*)



Obr. 49: Extrakce léčivých rostlin a připravené extrakty máty, meduňky, třezalky a šalvěje v poloprovozních podmínkách

5.3.2 Senzorická analýza vyrobených sirupů

Jednodruhové nápoje připravené ze sirupových koncentrátů ředěním vodou byly sensoricky testovány za účelem výběru vhodného poměru extraktu a sirupového základu u každého druhu léčivých rostlin, poté byly sirupy i nápoje detailně sensoricky charakterizovány a vybrány sensoricky nejpříjemnější, které by bylo možné zavést na trh.

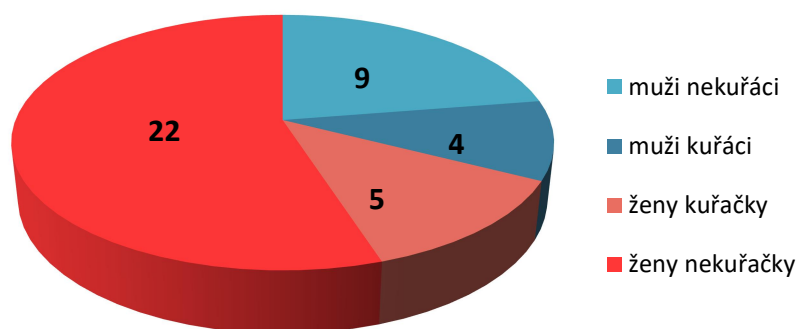
Z jednodruhových sirupů byl dle sensorické analýzy vybrán jeden (nejvíce přijatelný), který byl základem dvoudruhových sirupů. Následně byly kombinací jednodruhových sirupů (byly testovány opět tři různé poměry) připraveny dvoudruhové sirupy a nápoje (ředěním vodou) a sensoricky testovány za účelem výběru vhodné receptury a příchutě pro výrobu dvoudruhového sirupu. V poslední fázi experimentu byly předloženy hodnotitelům pouze vybrané receptury dvoudruhových nápojů s/bez přídavku aróniového koncentráту a na základě párové porovnávací zkoušky bylo hodnoceno, zda je vhodnější sirupy dobarvovat.

Detailní uspořádání sensorických experimentů je uvedeno v kapitole 4.7. Sensorické hodnocení proběhlo v rámci čtyř experimentů, kdy každý experiment navazoval na výsledky předchozího. Pro každý z experimentů byly vyhrazeny dva dny, z důvodu velkého množství hodnotitelů. Hodnotitelům bylo předkládáno maximálně 12 vzorků denně, aby nedocházelo k únavě a přetížení smyslů.

5.3.3 Senzorická analýza jednodruhových sirupů a nápojů

Složení senzorické komise

Senzorického testování se celkem zúčastnilo 40 hodnotitelů, přičemž 50 % z nich tvořili studenti doktorského a druhou polovinu studenti magisterského studia Fakulty chemické VUT v Brně. Z celkového počtu se hodnocení zúčastnilo 27 žen a 13 mužů, většina nekuřáků (Obr. 50). Z úvodní ankety, která byla součástí dotazníku, také vyplývá, že většina z nich (33 ze 40) konzumuje bylinné nealkoholické nápoje, nejčastěji čaj, nealkoholické bylinné vody a limonády, pouze 11 z dotazovaných uvedlo, že konzumují bylinné sirupy. Většina hodnotitelů také uvedla, že mají rádi bylinné nealkoholické nápoje (23 ze 40 dotazovaných).

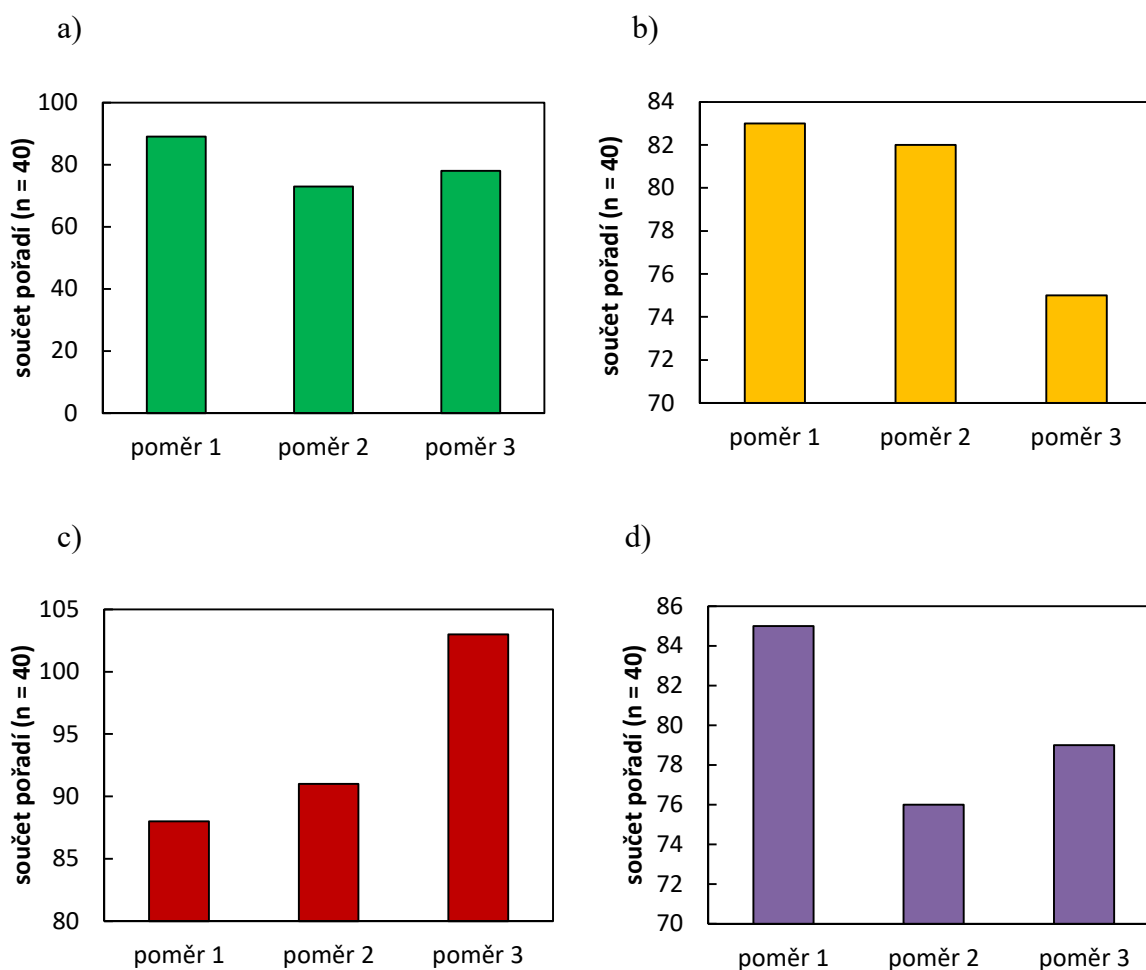


Obr. 50: Složení komise hodnotitelů

Výběr vhodné receptury jednodruhového sirupu pomocí pořadového testu

Cílem pořadového testu bylo vybrat nejvhodnější poměr bylinného extraktu k sirupovému základu pro každou z příchutí (máta, meduňka, třezalka a šalvěj). Pořadí vzorků bylo hodnoceno od nejlepší po nejhorší (1 \Rightarrow 3), a tedy nejnižší hodnota na ose součtu pořadí odpovídá zvolené optimální koncentraci. Poměry 1–3 jsou v pořadí od nejkonzentrovanejšího po nejméně koncentrované. Na základě Friedmanova testu pro každou příchut' bylo vyhodnoceno, že mezi recepturami nejsou statisticky významné rozdíly. Z Obr. 51 je však zřejmé, že v případě máty a šalvěje je optimální (tj. nejchutnější) střední, u třezalky nejkonzentrovanejší a u meduňky nejméně koncentrovaná varianta. Vybrané receptury byly dále sensoricky testovány.

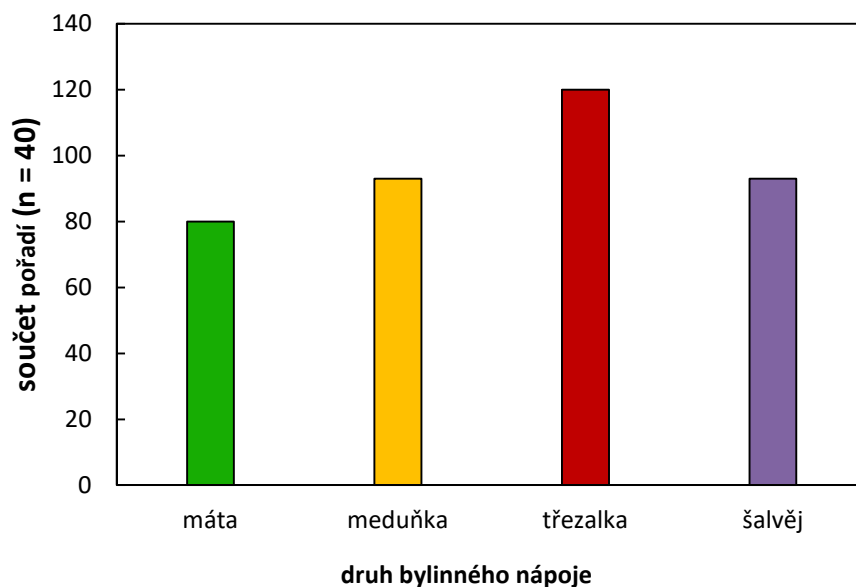
Nepovinnou součástí hodnocení byl pokus o identifikaci příchutě nápoje. Popisná zkouška měla za cíl odhalit možné nedostatky výrobku a případně posoudit zkušenosti a odbornou znalost hodnotitelské komise. Na základě velmi různorodých odpovědí (data nejsou prezentována), jsme usoudili, že charakter analýzy lze označit za spotřebitelské hodnocení. Nicméně vzhledem k tomu, že produkty jsou zamýšleny pro uvedení na běžný trh, je důležité, zda je daná příchut' natolik charakteristická a výrazná, že ji bude vnímat i běžný spotřebitel. Pomocí popisné zkoušky byla odhalena sensorická vada v případě meduňkového sirupu. Hodnotitelé uvedli, že tento nápoj měl senovou, svíravou, hnilobnou chuť. Tyto nedostatky mohou být způsobeny tepelným ošetřením (sušení při teplotě 30 °C).



Obr. 51: Výběr vhodné receptury a) mátového, b) meduňkového, c) třezalkového a d) šalvějového nápoje připraveného ze sirupu 10násobným ředěním

Výběr vhodné příchuti jednodruhového sirupu pomocí pořadového testu

Vybrané receptury z prvního bloku sensorické analýzy byly v dalším kole předloženy hodnotitelům za účelem výběru nejchutnější/nejpříjemnější příchuti. Pořadí vzorků bylo hodnoceno opět od nejlepší po nejhorší (1 ⇒ 3), nejnižší součet pořadí odpovídá nepřijatelnějšímu vzorku. Výsledky pořadového testu jsou prezentovány na Obr. 52. Z výsledků je patrné, že mátový nápoj byl označen jako nejchutnější ($P < 0,05$) naopak třezalkový jako nejméně chutný. Na základě pořadového testu lze označit za nejchutnější příchut' mátovou.



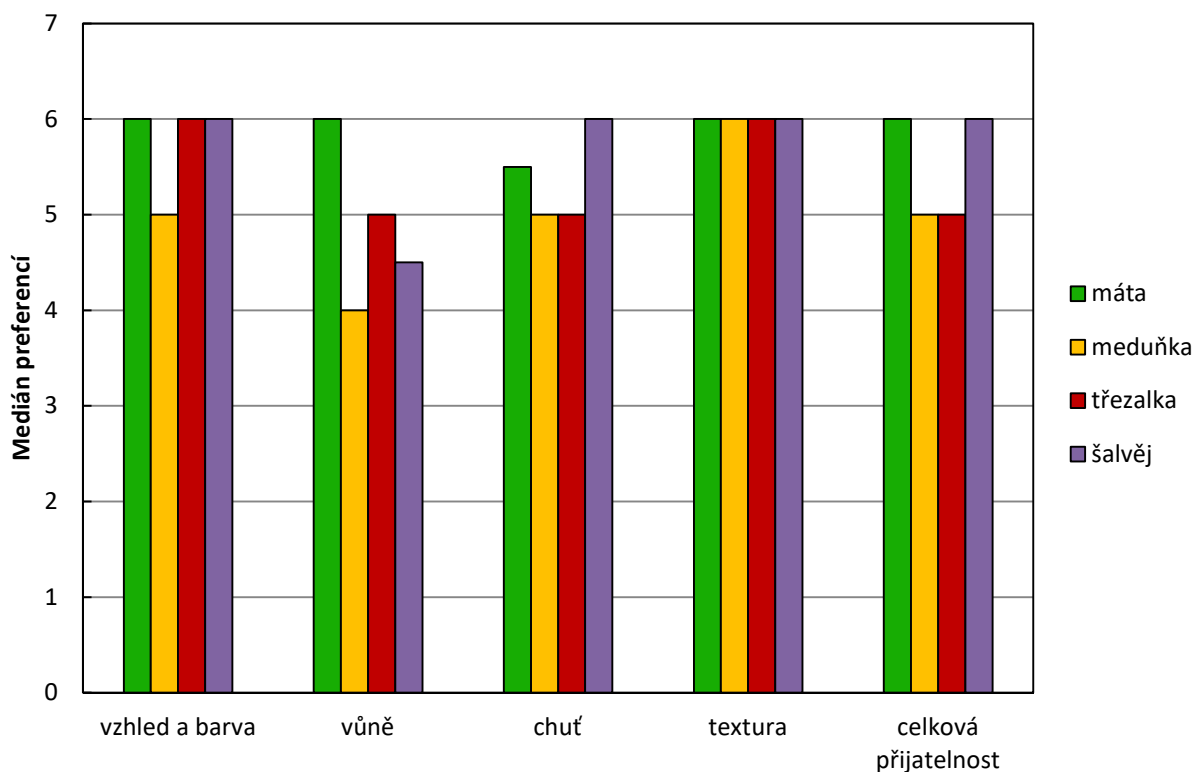
Obr. 52: Výběr nejchutnější příchutě sirupu pořadovým testem

Hodnocení jednodruhových nápojů a sirupů pomocí stupnic hedonického typu

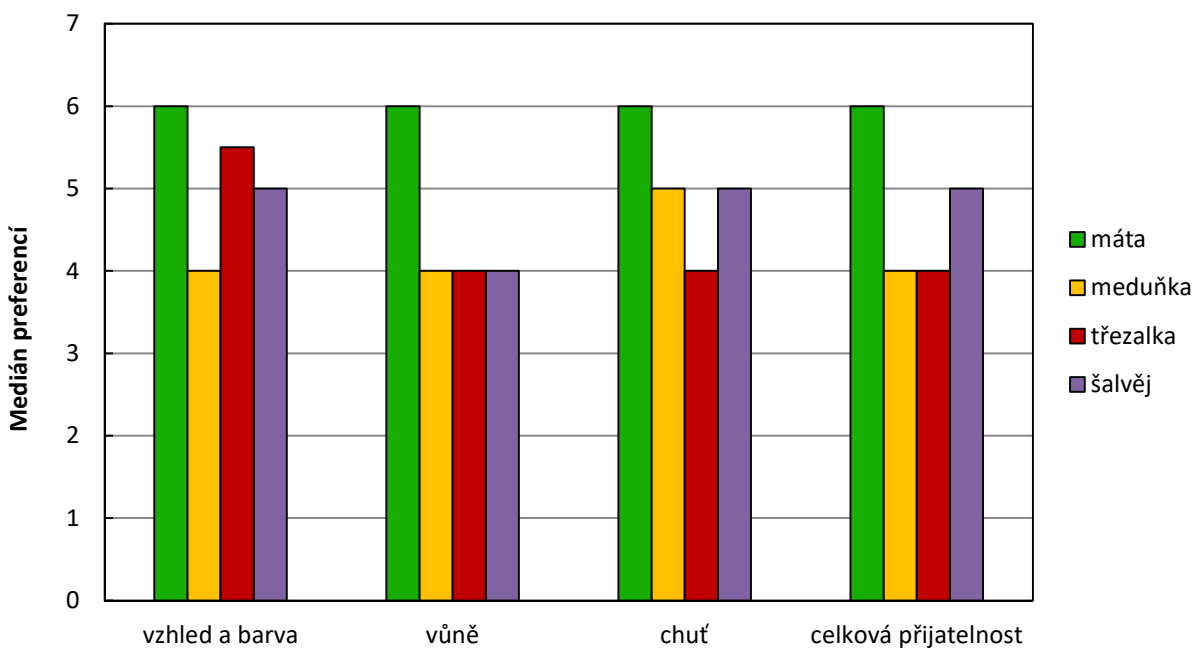
Pro lepší charakterizaci sensorické kvality byly u výše zmíněných vzorků jednodruhových nápojů/sirupů následně hodnoceny vybrané sensorické vlastnosti (vzhled a barva, vůně, chuť a celková přijatelnost, v případě sirupů také textura) pomocí sedmibodové kategorové ordinální stupnice hedonického typu (1 nepřijatelná ⇒ 7 vynikající).

Z výsledků hodnocení sirupů (Obr. 53) je zřejmé, že s ohledem na texturu se vzorky neliší. Textura sirupů by měla být, na rozdíl od nápojů, spíše viskózní, medovitá a homogenní (bez krystalů, usazenin aj.), což je ovlivněno především použitým sirupovým základem. Textura všech vzorků byla hodnocena jako výborná, lze vidět, že sirupové základy byly po technologické stránce správně a stejně vyrobeny. Ostatní sensorické vlastnosti sirupů však ovlivňuje přidaný extrakt. V případě vzhledu a barvy byl jako nejhorší ($P < 0,05$) označen meduňkový sirup, pravděpodobně kvůli světlejší barvě, ostatní vzorky byly z hlediska barvy výborné. I v ostatních parametrech (vůně, chuť a v celkové přijatelnosti) byl meduňkový sirup statisticky významně horší ve srovnání s ostatními sirupy. To je pravděpodobně způsobeno světlejší barvou a přítomností zmíněného *off-flavouru*, detekovaného popisnou zkouškou. Z hlediska chutě a celkové přijatelnosti byl nejlépe hodnocen šalvějový sirup (jako výborný) a totožně mátový sirup; tyto by mohly být použity jako základ pro dvoudruhové sirupy.

Při hodnocení nápojů (Obr. 54), hodnotitelé, stejně jako v případě sirupů, preferovali tmavší barvu. Mátový, šalvějový a třezalkový nápoj byly z hlediska vzhledu/barvy hodnoceny nejlépe ($P < 0,05$). Mátový nápoj byl statisticky lépe hodnocen i v dalších vlastnostech (vůně, chuť a celková přijatelnost). Výsledky této zkoušky jsou tedy v souladu s předchozí zkouškou pořadovou, kdy byl jako nejlepší/nejpřijatelnější označen mátový sirup a z něj připravený nápoj.



Obr. 53: Hodnocení jednodruhových sirupů pomocí kategorové ordinální stupnice hédonického typu (1 nepřijatelná \Rightarrow 7 vynikající); výsledky jsou prezentovány jako medián (počet hodnotitelů $n = 40$)



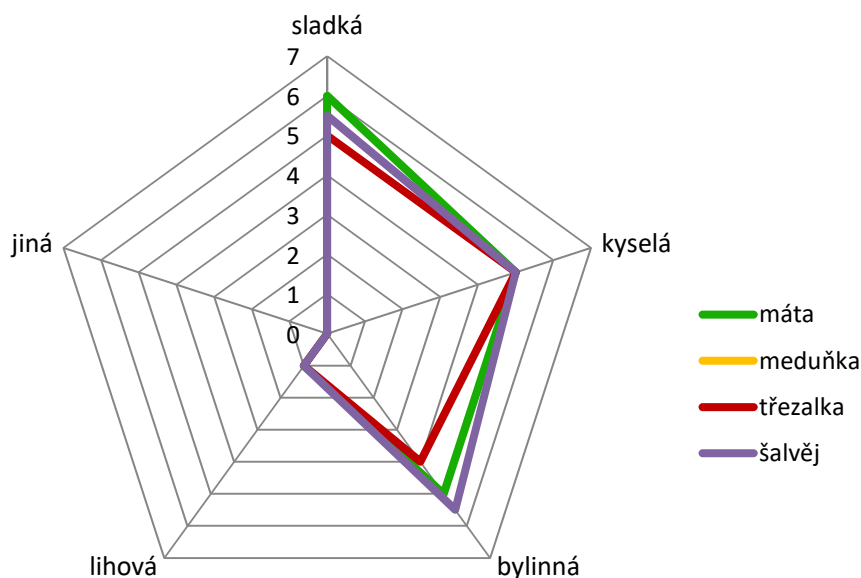
Obr. 54: Hodnocení jednodruhových nápojů připravených 10násobným ředěním jednodruhových sirupů pomocí kategorové ordinální stupnice hédonického typu (1 nepřijatelná \Rightarrow 7 vynikající); výsledky jsou prezentovány jako medián (počet hodnotitelů $n = 40$)

Profilový test chuti a vůně jednodruhových sirupů a nápojů

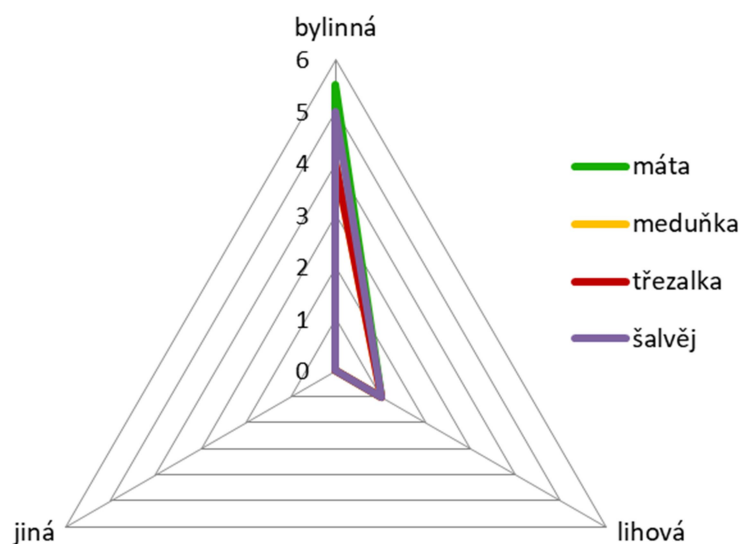
Pro podrobnější popis chuti a vůně sirupů respektive z nich připravených nápojů byla hodnocena intenzita vybraných deskriptorů pomocí profilového testu. Požadovaná optimální chuť zamýšleného konečného produktu je příjemně sladkokyselá, s bylinnou příchutí v přiměřené intenzitě, vůně příjemná zřetelně po bylinné přísadě. Z tohoto důvodu bylo vybráno 5 deskriptorů chuti u sirupů (sladká, kyselá, bylinná, lihová a jiná) respektive 5 deskriptorů chuti u nápojů (sladká, kyselá, bylinná, trpká a jiná) a 3 deskriptory vůně u sirupů (bylinná, lihová a jiná). Pro účely profilové zkoušky byla vytvořena intenzitní stupnice (1 neznatelná ⇒ 7 velmi silná).

U některých bylin byla detekována mírně natrpklá chuť, proto byl do hodnocení zahrnut samotný deskriptor trpké chuti, kromě toho měli hodnotitelé možnost uvést v kategorii jiná jakoukoli další chuť, která jim připadala výrazná. Protože jednotlivé byliny byly používány ve formě ethanolových extraktů, do hodnocení byly zařazeny i deskriptory lihová chuť/vůně. Všechny tyto deskriptory byly samozřejmě u vzorků považovány za nežádoucí.

K celkovému profilu chuti sirupů (Obr. 55) podle očekávání nejvíce přispívá sladká, kyselá a bylinná chuť, intenzita lihové a případně jiné příchutě byla většinou hodnocena jako velmi slabá až neznatelná. Významně výraznější bylinná chuť byla identifikována u mátového a šalvějového sirupu. Z hlediska sladké a kyselé chuti mezi vzorky nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly, což je pochopitelné vzhledem k tomu, že všechny vycházely ze stejného sirupového základu; i když z grafu je patrné, že vzorky mátového a šalvějového sirupu byly hodnoceny jako mírně sladší. Z výsledků sensorického profilu vůně sirupů (Obr. 56) je zřejmé, že vůně sirupů je ovlivněna hlavně bylinnou složkou, lihová a případně jiná vůně byly vnímány v zanedbatelné intenzitě, ethanol tedy nemá výrazný vliv na chuť ani vůni sirupu. Při porovnání jednotlivých vzorků se mátový sirup statisticky významně odlišuje od ostatních svou výraznou bylinnou vůní ($P < 0,05$).

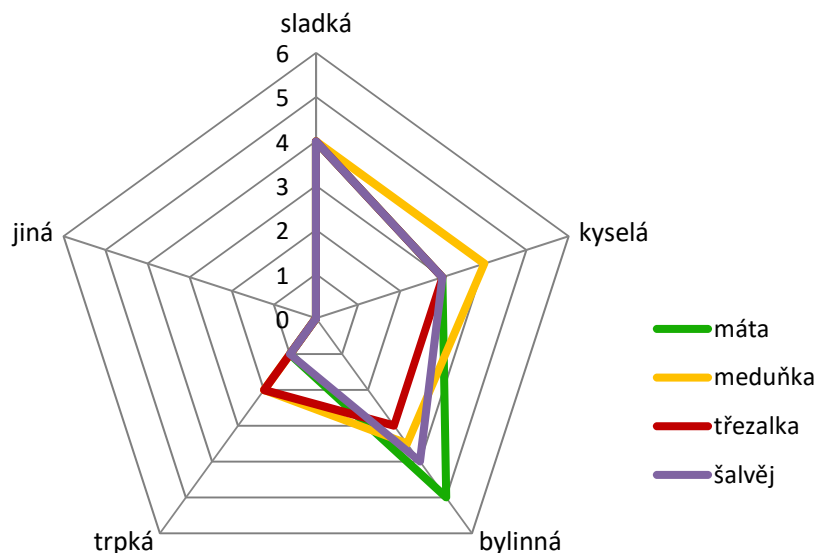


Obr. 55: Profilový test znázorňující zastoupení vybraných deskriptorů chutí pro jednodruhové sirupy z máty, meduňky, třezalky a šalvěje; výsledky jsou prezentovány jako medián (počet hodnotitelů $n = 40$)



Obr. 56: Profilový test znázorňující zastoupení vybraných deskriptorů vůní pro jednodruhové sirupy z máty, meduňky, třezalky a šalvěje, výsledky jsou prezentovány jako medián (počet hodnotitelů n = 40)

Profilová analýza chuti byla provedena i u nápojů. Z grafu na Obr. 57 vyplývá, že k celkové chuti nápojů nejvíce přispívá chuť sladká, bylinná a kyselá. U mátového nápoje byla detekována významně ($P < 0,05$) výraznější bylinná chuť, meduňkový byl naopak nejkyselější. Z výsledků je také patrné, že třezalkový a meduňkový nápoj byly častěji považovány za trpké, v rámci jiných identifikovaných příchutí byla u těchto nápojů detekována hořká, svíravá chuť nebo chuť po seně. Jejich intenzita byla popisována jako velmi slabá až nezatelná, tyto defekty nejsou statisticky významné ($P > 0,05$).

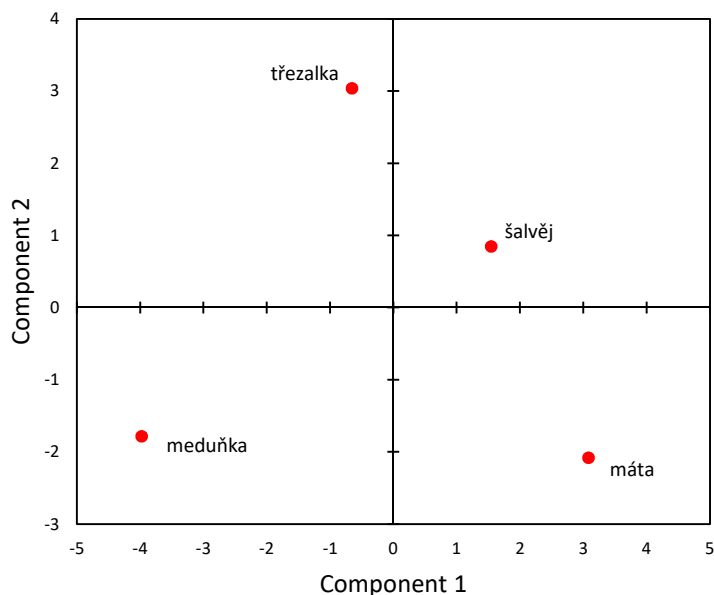


Obr. 57: Profilový test znázorňující zastoupení vybraných deskriptorů chutí pro jednodruhové nápoje z máty, meduňky, třezalky a šalvěje; výsledky jsou prezentovány jako medián (počet hodnotitelů n = 40)

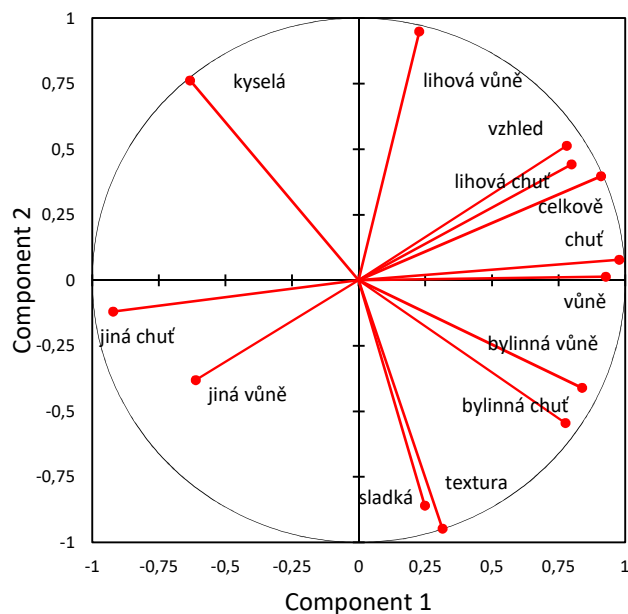
Z uvedených výsledků hodnocení jednodruhových sirupů i nápojů je evidentní, že za sensoricky nejlepší/nejpříjemnější lze jednoznačně označit sirup mátový, který by mohl být průmyslově vyráběn. Vzhledem k tomu, že v dalším kroku jsme se snažili také o výrobu dvoudruhového sirupu, shledali jsme, že i šalvějový sirup byl hodnocen velmi dobře a byl by vhodný jako základ do dvoudruhového sirupu vzhledem k tomu, že oproti mátovému sirupu nemá příliš výraznou chuť a mohl by tak podpořit ostatní chuť. Na základě konečné sensorické analýzy skupinou expertů byl šalvějový sirup vybrán jako hlavní složka dvoudruhových sirupů.

Srovnání jednodruhových sirupů

K vizualizaci rozdílů mezi jednotlivými druhy sirupů a za účelem zjištění, které deskriptory se nejvíce podílejí na odlišení podle druhu byla využita analýza hlavních komponent. Výsledky PCA analýzy za použití 13 sensorických vlastností/deskriptorů pro konstrukci komponent jsou znázorněny na Obr. 58. Je zjevné, že sirupy jsou diferencovány do 4 skupin dle druhu. Z analýzy vyplývá, že první komponenta uspokojivě vysvětluje 54 % celkové variability systému, přičemž první 3 komponenty kumulativně představují 100 % celkové variability systému. Pro konstrukci první hlavní komponenty se ukázaly být nejdůležitější parametry vůně, chuť a jiná chuť, v druhé hlavní komponentě lihová vůně a sladká chuť a třetí hlavní komponentě jiná vůně. Z grafu faktorů (Obr. 59) je evidentní, že celková chuť a její varianty bylinná a lihová, a jiná vůně jsou nejdůležitější deskriptory pro odlišení druhů sirupů. Výsledky potvrzují výše uvedená zjištění: třezalkový sirup byl kyselejší, meduňkový měl defekty v chuti a vůni (*off-flavour*), šalvějový měl lihovější chuť, ale byl vzhledově a celkově přijatelnější a mátový byl nejvíce bylinný. Dále lze vidět že na celkové přijatelnosti sirupů se nejvíce podílí vůně, chuť, vzhled a překvapivě i lihová chuť.



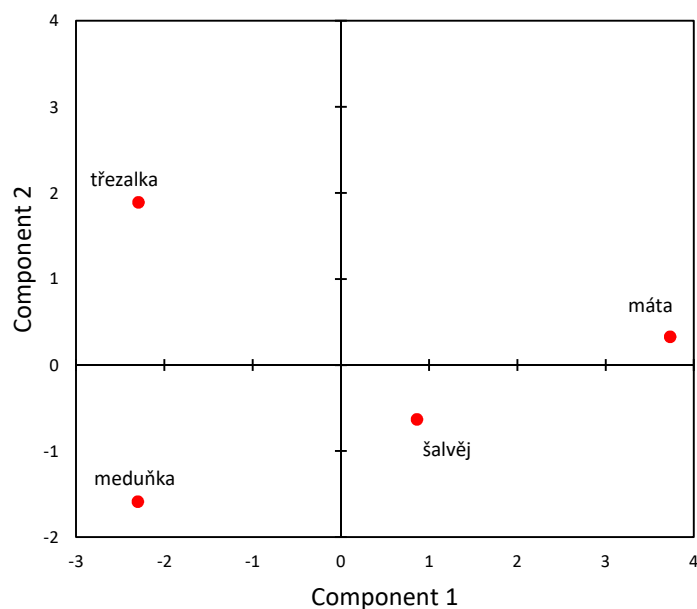
Obr. 58: Diferenciace sirupů podle druhu metodou PCA za použití 13 sensorických deskriptorů pro konstrukci komponent



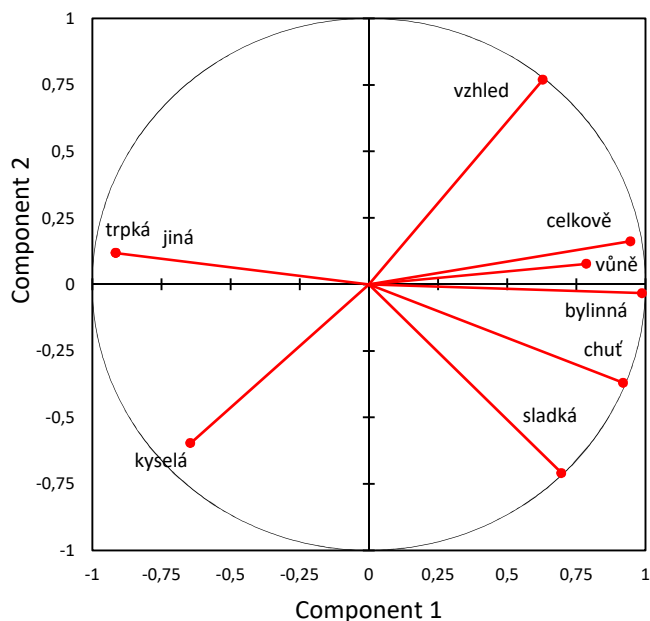
Obr. 59: Graf faktorů – Analýza hlavních komponent pro jednodruhové sirupy zkonstruovaný za použití 13 sensorických deskriptorů

Srovnání jednodruhových nápojů

Výsledky PCA analýzy nápojů za použití 9 sensorických vlastností/deskriptorů pro konstrukci komponent jsou znázorněny na Obr. 60, komponentní váhy jednotlivých vlastností ukazuje Obr. 61.



Obr. 60: Diferenciace nápojů podle druhu metodou PCA za použití 9 sensorických deskriptorů pro konstrukci komponent



Obr. 61: Graf faktorů – Analýza hlavních komponent pro jednodruhové nápoje zkonstruovaný za použití 9 sensorických deskriptorů

Z výsledků je patrné, že nápoje jsou zřetelně diferencovány opět do čtyř skupin dle druhu. Z PCA analýzy vyplývá, že první komponenta uspokojivě vysvětluje 70 % celkové variability systému, přičemž první 3 komponenty kumulativně představují 100 % celkové variability systému. Pro konstrukci první hlavní komponenty se ukázaly být nejdůležitější parametry bylinná příchut', celková přijatelnost a chuť, v druhé hlavní komponentě vzhled a ve třetí hlavní komponentě vůně. Z grafu faktorů je evidentní, že kyselá, sladká a trpká chuť a celková přijatelnost jsou nejdůležitější deskriptory pro odlišení druhů nápojů. Dále je zřejmé, že třezalkový nápoj byl nejvíce trpký, meduňkový nejvíce kyselý, šalvějový sladký s příjemnou chutí a mátový více bylinný a celkově nejpříjemnější. Na celkové přijatelnosti nápojů se nejvíce podílí vůně, chuť a bylinná příchut'.

5.3.4 Sensorická analýza dvoudruhových sirupů a nápojů

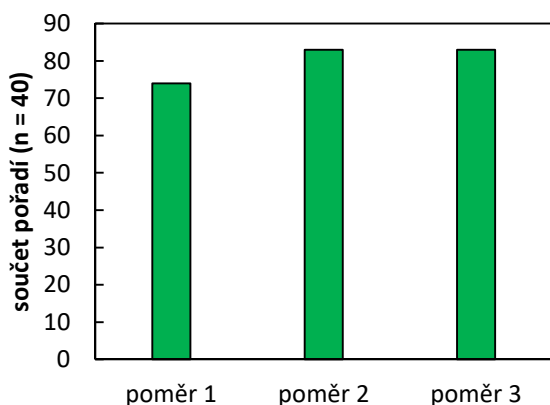
Na základě předešlých sensorických zkoušek a hodnocení expertů byl jako nejvhodnější základ pro dvoudruhové sirupy vybrán šalvějový sirup. V rámci dalšího testování byla vybírána nejvhodnější receptura (poměr šalvějového sirupu k dalšímu minoritnímu sirupu, měnil se jen poměr šalvějového sirupu) a sensoricky nejvhodnější příchut'. V poslední fázi bylo testováno zda by bylo vhodné vybrané dvoudruhové sirupy dobarvovat.

Výběr vhodné receptury dvoudruhového sirupu pomocí pořadového testu

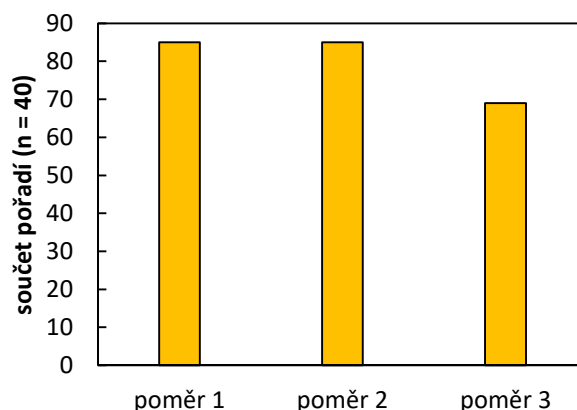
Cílem pořadového testu bylo vybrat nejvhodnější poměr šalvějového sirupu k dalším variantám (mátový, meduňkový, třezalkový). Pořadí vzorků bylo hodnoceno od nejlepší po nejhorší (1 ⇒ 3), a tedy nejnižší hodnota na ose součtu pořadí odpovídá zvolenému optimálnímu poměru. Poměry 1–3 jsou v pořadí od nejméně po nejvíce převládající složku šalvějovou. Na základě Friedmanova testu pro každou kombinaci bylo vyhodnoceno, že mezi recepturami nejsou statisticky významné

rozdíly ($P > 0,05$). Z Obr. 62 je však zřejmé, že v případě kombinace šalvěj-máta je nevhodnější/nejchutnější poměr s méně převládající šalvějovou příchutí, u kombinace šalvěj-meduňka a šalvěj-třezalka naopak poměr s převahou šalvějové příchuti. Vzhledem k tomu, že mátový a šalvějový sirup byly v předchozích testech označeny jako nejchutnější, byly tyto výsledky v souladu s naším očekáváním.

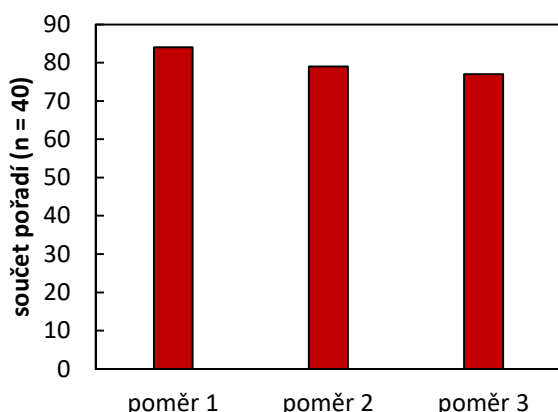
a)



b)



c)

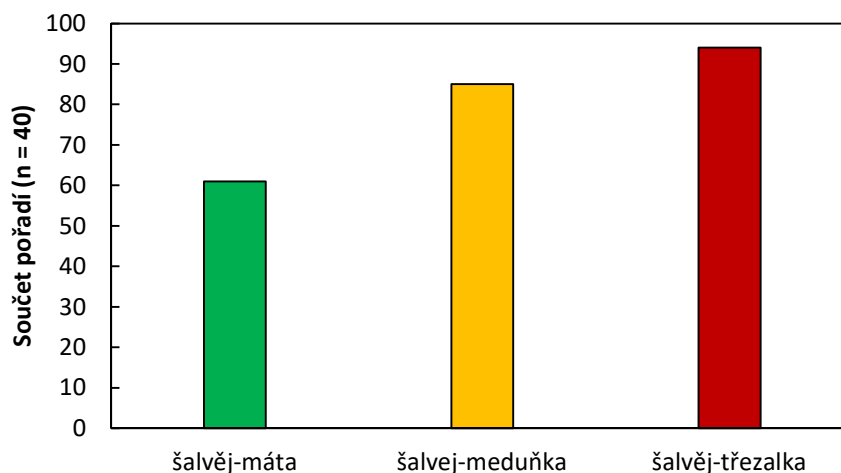


Obr. 62: Výběr vhodné receptury a) šalvějovo-mátového b) šalvějovo-meduňkového, c) šalvějovo-třezalkového nápoje připraveného ze sirupu 10násobným ředěním

Výběr vhodné příchuti dvoudruhového sirupu pomocí pořadového testu

Vybrané receptury jednotlivých příchutí byly v dalším kole předloženy hodnotitelům za účelem výběru nejlepší příchuti z hlediska chutnosti/celkové přijatelnosti. Pořadí vzorků bylo hodnoceno opět od nejlepší po nejhorší ($1 \Rightarrow 3$), nejnižší součet pořadí odpovídá nejpřijatelnějšímu vzorku. Výsledky pořadového testu jsou prezentovány na Obr. 63. Z výsledků je patrné, že šalvějovo-mátový nápoj byl nejchutnější, naopak šalvějovo-třezalkový byl u hodnotitelů nejméně preferován. Statistická analýza potvrdila, že mezi vzorky šalvějovo-mátového v porovnání s šalvějovo-meduňkovým a šalvějovo-třezalkovým nápojem byl shledán statisticky významný rozdíl. Na základě pořadového testu lze označit za nejchutnější příchut' šalvějovo-mátovou. Zároveň bylo

zjištěno, že pokud je meduňkový sirup v menší koncentraci v kombinaci s jiným sirupem, jeho *off-flavour* už není detekovaný a lze vyrobit senzoričky přijatelný zajímavý produkt.



Obr. 63: Výběr vhodné příchutě dvoudruhového sirupu pořadovým testem

Párová porovnávací zkouška dvoudruhových sirupů bez a s přidavkem aróniového koncentrátu

V poslední fázi bylo testováno, zda by hodnotitelé více oceňovali nápoj obarvený vhodným barvivem. Za tímto účelem byly sirupové základy dobarvovány koncentrátem z arónie (koncentrace v sirupu 0,5 %). Zajímala nás preference z hlediska barvy, ale také chuti, protože barva může významným způsobem ovlivňovat i vnímání chuti. Z výsledků párové porovnávací zkoušky (Tab. 35) je zřejmé, že hodnotitelé preferují nedobarvovanou variantu jak z hlediska barvy, tak i chuti. Norma ČSN EN ISO 5495 uvádí minimální potřebný počet preferenčních hlasů 26 pro 40 hodnotitelů, aby výsledek byl statisticky významný. V případě barvy u kombinace šalvěj-máta a šalvěj-meduňka byl tedy zaznamenán rozdíl, v případě chuti u kombinace šalvěj-máta a šalvěj-třezalka, kdy preferenčně byla vhodnější nedobarvená varianta.

Tab. 35: Párové porovnávání barvy a chuti dvoudruhových nápojů bez a s přidavkem aróniového koncentrátu

kombinace	barva*		chuť*	
	bez koncentrátu	s koncentrátem	bez koncentrátu	s koncentrátem
šalvěj-máta	32	8	29	11
šalvěj-meduňka	30	10	22	18
šalvej-třezalka	22	18	26	14

*hodnoty v tabulce uvádí počet kladných odpovědí pro jednotlivé varianty nápojů

Všechny použité senzoričky testy prokázaly, že z jednodruhových sirupů byl nejlépe hodnocen mátový sirup, z dvoudruhových sirupů šalvějovo-mátový. Dle závěrečného dotazníku by si některý z testovaných sirupů (nápojů z nich připravených) koupilo 39 z 40 dotazovaných. Konkrétně se jednalo o sirup mátový, šalvějovo-mátový nebo šalvějovo-meduňkový, cena kterou byli ochotni zaplatit se pohybovala od 30 do 100 Kč za 500 ml sirupu.

6 ZÁVĚRY

Předložená práce je studií zaměřenou na komplexní charakterizaci extraktů z léčivých rostlin pomocí spektroskopických a chromatografických technik s důrazem na vliv rozpouštědla, posklizňové úpravy vzorku, lokality a roku produkce na vybrané parametry a následnou aplikaci vybraných extraktů z léčivých rostlin do sirupů. Tematicky je práce rozdělena do dvou částí. První část práce je zaměřena na charakterizaci extraktů z léčivých rostlin a druhá část na aplikaci vybraných extraktů z léčivých rostlin do sirupů.

V první části práce byly pomocí kombinace metod EPR, UV-VIS spektroskopie, HPLC a ICP-OES charakterizovány extrakty z 10 vybraných druhů léčivých rostlin, které byly sbírány ze dvou různých lokalit (Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně, Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně) v průběhu dvou let (2015, 2016) a posklizňově upravovány dvěma způsoby (mražení, sušení). Celkově bylo sledováno 39 parametrů (32 parametrů bylo charakteristických pro vzorky léčivých rostlin) konkrétně obsah fenolických sloučenin (TPC, TFC, 12 konkrétních fenolických sloučenin), barevných charakteristik (L^* , a^* , b^* , C^* , h° , BI), antioxidačních vlastností ($TEAC_{ABTS^{+}}$, %RS) a obsah 10 minerálních látek (Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Zn). Léčivé rostliny byly extrahovány dynamickou extrakcí třemi různými rozpouštědly (deionizovaná voda, 50% ethanol a DMSO).

Z provedené komplexní charakterizace léčivých rostlin vyplývají následující závěry:

- Sledované parametry léčivých rostlin jsou různou mírou ovlivňovány použitým extrakčním systémem, posklizňovou úpravou vzorků, rokem produkce, původem vzorků (lokalitou) i druhovou skladbou.
- Druh extrakčního činidla výrazně ovlivňuje složení extraktů, včetně koncentrace fenolických látek, flavonoidů, barviv, látek s antioxidačním účinkem tak i zastoupení jednotlivých minerálních látek.
- Za nejvhodnější extrakční systém pro zmražené vzorky z hlediska výtěžnosti fenolických látek, flavonoidů a antioxidantů lze označit DMSO.
- Nejvhodnější extrakční systém pro sušené vzorky z hlediska výtěžnosti fenolických látek, flavonoidů a antioxidantů lze označit 50% ethanol.
- Z potravinářského hlediska pro extrakci fenolických sloučenin a antioxidantů je vhodnější použití 50% ethanolu, vzhledem k dráždivosti a hygroskopičnosti DMSO.
- Vhodnější úpravou léčivých rostlin v případě protických systémů (voda, 50% ethanol) je sušení, naopak u aprotického rozpouštědla DMSO zmrazování, která poskytuje vyšší obsahy fenolických sloučenin, flavonoidů, barviv, látek s antioxidačním účinkem a minerálních látek.
- Úprava sušením byla vybrána u 50% ethanolu jako vhodnější pro aplikaci do potravin vzhledem k vyššímu obsahu fenolických sloučenin a vzhledem ke vhodnosti při dlouhodobějším skladování.
- Co se týká zhodnocení nejlepších vzorků z hlediska obsahu fenolických sloučenin a antioxidačních vlastností není možné výsledky generalizovat, protože každý vzorek je ve všeobecnosti biologický systém a má různou odezvu na podmínky oxidačního stresu. Významným parametrem je redoxní potenciál složek, jejich vzájemné koncentrační poměry a možné synergické či antagonistické působení. Z hlediska obsahu fenolických

sloučenin, flavonoidů a radikál-zhášecí aktivity stanovené pomocí ABTS^{•+} se výborným zdrojem těchto sloučenin zdají být léčivé rostliny z čeledi Lamiaceae (máta peprná, meduňka lékařská, šalvěj muškátová, šalvěj lékařská, yzop lékařský) a z čeledi Hypericeae (třezalka tečkovaná).

- Byla potvrzena schopnost extraktů zhášet kation radikál ABTS^{•+}, schopnost extraktů terminovat hydroxylové radikály nebyla jednoznačně potvrzena vzhledem k ovlivnění měření pravděpodobně významným zdrojem prooxidantů v extraktech (přechodné kovy, kyselina askorbová, karotenoidy aj.).
- I když výsledky jednotlivých spektroskopických a chromatografických analýz odhalily značnou variabilitu a nejednoznačné rozdíly, multivariační statistické metody umožnily úspěšnou diferenciaci a klasifikaci vzorků léčivých rostlin podle posklizňové úpravy, roku produkce a v menší míře i u lokalit, kde bylo nejvíce podobností, vzhledem k tomu, že lokality byly vzdáleny 50 km, klimatické podmínky byly velmi podobné. Dále umožnily diferenciaci a klasifikaci extraktů podle použitého extrakčního činidla naznačující, že rozpouštědla se odlišují svým charakterem, polaritou.

Na základě výsledků komplexní charakterizace léčivých rostlin lze konstatovat, že kombinaci UV-VIS, EPR spektroskopie, HPLC a ICP-OES s využitím metod multivariační statistické analýzy je možné efektivně využít pro rozlišení vzorků léčivých rostlin podle zvolených kritérií (posklizňové úpravy, geografického původu, roku produkce i použitého extrakčního systému).

Druhou částí práce byla aplikace vybraných extraktů léčivých rostlin do sirupů. Na základě analýz a také dostupnosti léčivých rostlin od dodavatele (Calendula a.s.) byly vybrány pro aplikaci do sirupů následující léčivé rostliny: máta peprná, meduňka lékařská, třezalka tečkovaná a šalvěj lékařská a 25% ethanol místo 50% ethanolu (vzhledem k limitaci ethanolu v surovině, k minimalizaci manipulace se surovinou). Vyrobené jednodruhové a dvoudruhové sirupy s přídavkem ethanolového extraktu a nápoje z nich připravené ředěním byly testovány metodami sensorické analýzy.

Společné závěry této části práce jsou shrnuty v následujícím přehledu:

- Byl optimalizován proces extrakce – poměr léčivé rostliny:rozpouštědla 1:10, doba extrakce 8 h, při níž nasákavost bylin byla 50–62 %.
- Byla optimalizována receptura jednodruhových sirupů – u máty a šalvěje byla vybrána střední koncentrace, u třezalky nejkonzentrovanejší a u meduňky nejméně koncentrovaná varianta.
- Máťový sirup byl vyhodnocen jako nejchutnější a nepřijatelnější jednodruhový sirup.
- Šalvějový sirup byl vybrán jako základ pro dvoudruhové sirupy.
- Byla optimalizována receptura dvoudruhových sirupů – v případě kombinace šalvěj-máta je nejchutnější poměr s méně převládající šalvějovou příchutí, u kombinace šalvěj-meduňka a šalvěj-třezalka naopak poměr s převahou šalvějové příchuti.
- Šalvějovo-máťový sirup byl vyhodnocen jako sensoricky nepřijatelnější dvoudruhový sirup.
- Bylo zjištěno, že dvoudruhové sirupy není nutno dobarvovat.

Na základě senzoričké analýzy bylo prokázáno, že z jednodruhových sirupů byl nejlépe hodnocen máťový sirup, z dvoudruhových sirupů šalvějovo-máťový, tyto sirupy by po dalším testování bylo možné uvést do výroby a obohatit tak trh s potravinami.

7 SEZNAM POUŽITÝCH LITERÁRNÍCH ZDROJŮ

- [1] PATEL, P., N. M. PATEL a P. M. PATEL. WHO guidelines on quality control of herbal medicines. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*. 2011, **2**(4), pp. 1-106.
- [2] SANTOS, J., M. HERRERO, J. A. MENDIOLA, M. T. OLIVA-TELES, E. IBÁÑEZ, C. DELERUE-MATOS a M. B. P. P. OLIVEIRA. Fresh-cut aromatic herbs: Nutritional quality stability during shelf-life. *LWT - Food Science and Technology*. 2014, **59**(1), pp. 101-107.
- [3] BAHRAMSOLTANI, R., M. H. FARZAEI a R. RAHIMI. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. *Archives of Dermatological Research*. 2014, **306**(7), pp. 601-617.
- [4] *Situační a výhledová zpráva: Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny* [online]. Ministerstvo zemědělství, 2012 [cit. 2017-07-16]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/188525/SVZ_2012_konecna_verze.pdf
- [5] *Situační a výhledová zpráva: Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny* [online]. Ministerstvo zemědělství, 2014 [cit. 2017-07-16]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/403652/SVZ_LAKR_12_2014.pdf
- [6] KUNLE, O. F., H. O. EGHAREVBA a P. O. AHMADU. Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*. 2012, **4**(3), pp. 101-112.
- [7] *WHO guidelines on good agricultural and collection practices [GACP] for medicinal plants* [online]. World Health Organization, 2003 [cit. 2017-07-16]. Dostupné z: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42783/1/9241546271.pdf>
- [8] SILVA JUNIOR, J. O. C., R. M. R. COSTA, F. M. TEIXEIRA a W. L. R. BARBAROSA. Processing and Quality Control of Herbal Drugs and Their Derivatives. Y. Shoyama. *Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas*. 1st ed. Rijeka: InTech, 2011, p. 196-205. ISBN 978-953-307-682-9.
- [9] ARAÚJO, M. G. F. a T. M. BAUAB. Microbial Quality of Medicinal Plant Materials. I. Akyar. *Latest Research into Quality Control*. 1st ed. Rijeka: InTech, 2012, p. 514. ISBN 978-953-51-0868-9.
- [10] BRODOWSKA, A., K. ŚMIGIELSK a A. NOWAK. Comparison of methods of herbs and spices decontamination. *Chemik*. 2014, **68**(2), pp. 97-102.
- [11] ADU-GYAMFI, A., V. APPIAH a J. NKETSIA-TABIRI. Preliminary studies on decontamination of some dried herbal products by gamma irradiation. *Journal of Medicinal Plant Research*. 2014, **8**(2), pp. 116-120.
- [12] GHISLENI, D. D. M., M. S. BRAGA, I. S. KIKICHI, M. BRASOVEANU, M. R. NEMTANU, K. DUA a T. J. A. PINTO. The Microbial Quality Aspects and Decontamination Approaches for the Herbal Medicinal Plants and Products: An in-Depth Review. *Current Pharmaceutical Design*. 2016, **22**(1), pp. 4264-4287.
- [13] AZWANIDA, N. N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*. 2015, **4**(3), pp. 1-6.
- [14] *Commodity Specific Food Safety Guidelines for the Production, Harvest, Post-Harvest, and Processing Unit Operations of Fresh Culinary Herbs* [online]. University of Georgia, 2013 [cit. 2017-07-16]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM337902.pdf>

- [15] BUTOROVA, L., M. POLOVKA a E. VÍTOVÁ. Comparison of volatiles identified in *Aronia melanocarpa* and *Amelanchier alnifolia* using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2016, **55**(1), pp. 57-68.
- [16] OLIVEIRA, A. I., C. PINHO, B. SARMENTO a A. C. DIAS. Neuroprotective Activity of *Hypericum perforatum* and Its Major Components. *Frontiers in plant science*. 2016, **7**(1004), pp. 1-15.
- [17] KENNEDY, D. O. a E. L. WIGHTMAN. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. *Advances in Nutrition*. 2011, **2**(1), pp. 32-50.
- [18] OGBEMUDIA, F. O. a E. O. THOMPSON. Variation in Plants Secondary Metabolites and Potential Ecological Roles – A Review. *International Journal of Modern Biology and Medicine*. 2014, **5**(3), pp. 111-130.
- [19] SAXENA, M., J. SAXENA, R. NEMA, D. SINGH a A. GUPTA. Phytochemistry of Medicinal Plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013, **1**(6), pp. 169-182.
- [20] KUSUMA, I. W., MURDIYANTO, E. T. ARUNG, SYAFRIZAL a Y. KIM. Antimicrobial and antioxidant properties of medicinal plants used by the Bentian tribe from Indonesia. *Food Science and Human Wellness*. 2014, **3**(3-4), pp. 191-196.
- [21] JOTHI KARUMARI, R., S. SUMATHI, M. ANITHA, R. R. VANIMAKHAL a S. EZHILARASI BALASUBRAMANIAN. Analysis of Physico - Chemical and Qualitative Inorganic Elements in the Selected Herbal Plants. *International Journal of Pharma Research & Review*. 2014, **3**(8), pp. 8-13.
- [22] NEGI, J. S., V. K. BISHT, A. K. BHANDARI a R. C. SUNDRIYAL. Determination of mineral contents of *Digitalis purpurea* L. and *Digitalis lanata* Ehrh. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 2012, **12**(2), pp. 463-469.
- [23] GJORGIEVA, D., T. KADIFKOVA PANOVSKA, T. RUSKOVSKA, K. BAČEVA a T. STAFILOV. Influence of Heavy Metal Stress on Antioxidant Status and DNA Damage in *Urtica dioica*. *BioMed Research International*. 2013, **2013**(1), pp. 1-6.
- [24] ADNAN, M., J. HUSSAIN, M. T. SHAH, Z. K. SHINWARI, F. ULLAH, A. BAHADER, N. KHAN, A. L. KHAN a T. WATANABE. Proximate and nutrient composition of medicinal plants of humid and sub-humid regions in North-west Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010, **4**(4), pp. 339-345.
- [25] PRUSINOWSKA, R. a K. B. ŚMIGIELSKI. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L). A review. *Herba Polonica*. 2014, **60**(2), pp. 56-66.
- [26] DUDA, S. C., L. A. MARGHITAS, D. DEZMIREAN, M. DUDA, R. MARGAOAN a O. BOBIS. Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of *Agastache foeniculum*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Nepeta cataria*: Effect of harvest time and plant species. *Industrial Crops and Products*. 2015, **77**(23), pp. 499-507.
- [27] YADIKAR, N., K. M. BOBAKULOV, K. A. ESHBAKOVA a H. A. AISA. Phenolic compounds from *Lavandula angustifolia*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2017, **53**(3), pp. 262-264.
- [28] ADASZYŃSKA-SKWIRZYŃSKA, M. a M. DZIĘCIOŁ. Comparison of phenolic acids and flavonoids contents in various cultivars and parts of common lavender (*Lavandula angustifolia*) derived from Poland. *Natural Product Research*. 2017, **27**(1), pp. 1-6.
- [29] TURGUT, A. C., F. M. EMEN, H. S. CANBAY, R. E. DEMIRDOGEN, N. CAM, D. KILIC a T. YESILKAYNAK. Chemical Characterization of *Lavandula angustifolia*

- Mill. as a Phytocosmetic Species and Investigation of its Antimicrobial Effect in Cosmetic Products. *Journal of Turkish Chemical Society*. 2017, **4**(1), pp. 283-298.
- [30] MIGUEL, M., L. BARROS, C. PEREIRA, R. C. CALHELHA, P. A. GARCIA, M. CASTRO, C. SANTOS-BUELGA a I. C. FERREIRA. Chemical characterization and bioactive properties of two aromatic plants: *Calendula officinalis* L. (flowers) and *Mentha cervina* L. (leaves). *Food and Function*. 2016, **7**(5), pp. 2223-2232.
- [31] OLENNIKOV, D. N. a N. I. KASHCHENKO. Componential Profile and Amylase Inhibiting Activity of Phenolic Compounds from *Calendula officinalis* L. Leaves. *The Scientific World Journal*. 2014, **2014**(1), pp. 1-9.
- [32] OLENNIKOV, D. N. a N. I. KASHCHENKO. New Isorhamnetin Glycosides and other Phenolic Compounds from *Calendula officinalis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2013, **49**(5), pp. 833-840.
- [33] SABIR, S. M., M. F. KHAN, J. B. TEXEIRA ROCHA, A. A. BOLIGON a M. L. ATHAYDE. Phenolic profile, antioxidant activities and genotoxic evaluations of *Calendula officinalis*. *Journal of Food Biochemistry*. 2015, **39**(3), pp. 316-324.
- [34] MATEI, A. O., F. GATEA a G. L. RADU. Analysis of Phenolic Compounds in Some Medicinal Herbs by LC-MS. *Journal of Chromatographic Science*. 2015, **53**(7), pp. 1147-1154.
- [35] DOGAN, S., M. E. DIKEN a M. DOGAN. Antioxidant, phenolic and protein contents of some medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010, **4**(23), pp. 2566-2573.
- [36] ARORA, D., A. RANI a A. SHARMA. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacognosy Review*. 2013, **7**(14), pp. 179-187.
- [37] GOGOASA, I., J. VIOLETA, L. M. ALDA, A. VELCIOV, M. RADA, S. ALDA, C. SIRBULESCU, D. M. BORDEAN a I. GERGEN. Mineral Content of Some Medicinal Herbs. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*. 2013, **17**(4), pp. 65-67.
- [38] DUCAT, G., Y. R. TORRES, H. S. DALLA SANTA, I. K. CAETANO, S. A. KLEINUBING, D. STOCK, L. TUSSOLINI, T. H. JUSTO a S. P. QUINÁIA. Correlation among metallic ions, phenolic compounds and antimicrobial action in medicinal plants extracts. *Journal of Food Quality*. 2011, **34**(5), pp. 306-314.
- [39] SHRIVASTAVA, M. a L. K. DWIVEDI. Therapeutic potential of *Hypericum perforatum*: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2015, **6**(12), pp. 4982-4988.
- [40] ASGARPANA, J. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Hypericum perforatum* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012, **6**(12), pp. 1387-1394.
- [41] RAMALHETE, N., A. MACHADO, R. SERRANO, E. T. GOMES, H. MOTA-FILIFE a O. SILVA. Comparative study on the in vivo antidepressant activities of the Portuguese *Hypericum foliosum*, *Hypericum androsaemum* and *Hypericum perforatum* medicinal plants. *Industrial Crops and Products*. 2015, **82**(1), pp. 29-36.
- [42] GHASEMI PIRBALOUTI, A., M. FATAHI-VANANI, L. CRAKER a H. SHIRMARDI. Chemical composition and bioactivity of essential oils of *Hypericum helianthemoides*, *Hypericum perforatum* and *Hypericum scabrum*. *Journal Pharmaceutical Biology*. 2014, **52**(2), pp. 175-181.
- [43] MARRELLI, M., G. STATTI, F. CONFORTI a F. MENICHINI. New Potential Pharmaceutical Applications of *Hypericum* Species. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2016, **16**(9), pp. 710-720.

- [44] ZHAO J., W. LIU a J. C. WANG. Recent Advances Regarding Constituents and Bioactivities of Plants from the Genus *Hypericum*. *Chemistry & Biodiversity*. 2015, **12**(3), pp. 309-349.
- [45] VELINGKAR, V. S., G. L. GUPTA a N. B. HEGDE. A current update on phytochemistry, pharmacology and herb–drug interactions of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry Reviews*. 2017, **16**(53), pp. 1-20.
- [46] KOYU, H. a M. Z. HAZNEDAROGLU. Investigation of impact of storage conditions on *Hypericum perforatum* L. dried total extract. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2015, **23**(3), pp. 545-551.
- [47] ORČIĆ, D. Z., N. M. MIMICA-DUKIĆ, M. M. FRANCIŠKOVIĆ, S. S. PETROVIĆ a E. D. JOVIN. Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. *Chemistry Central Journal*. 2011, **5**(1), pp. 34-42.
- [48] HOSNI, K., K. MSAADA, M. B. TAARIT a B. MARZOUK. Fatty acid composition and tocopherol content in four Tunisian *Hypericum* species: *Hypericum perforatum*, *Hypericum tomentosum*, *Hypericum perforatum* and *Hypericum ericoides* Ssp. *Roberti*. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017, **10**(2), pp. 2736-2741.
- [49] PAVLOVA, D. K., I. KARADJOVA a I. KRASTEVA. Essential and toxic element concentrations in *Hypericum perforatum*. *Australian Journal of Botany*. 2015, **63**(2), pp. 1-6.
- [50] MIHALJEV, Z., M. ZIVKOV-BALOS, Z. CUPIC a S. JAKSIC. Levels of some microelements and essential heavy metals in herbal teas in Serbia. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2014, **71**(3), pp. 985-391.
- [51] OWEN, J. D., S. B. KIRTON, S. J. EVANS a J. L. STAIR. Elemental fingerprinting of *Hypericum perforatum* (St John's Wort) herb and preparations using ICP-OES and chemometrics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, **125**(1), pp. 15-21.
- [52] FILIPIAK-SZOK, A., M. KURZAWA a E. SZŁYK. Determination of toxic metals by ICP-MS in Asiatic and European medicinal plants and dietary supplements. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2015, **30**(1), pp. 54-58.
- [53] PYTLAKOWSKA, A. KITA, P. JANOSKA, M. POŁOWNIAKA a V. KOZIK. Multi-element analysis of mineral and trace elements in medicinal herbs and their infusions. *Food Chemistry*. 2012, **135**(2), pp. 494-501.
- [54] BLASKÓ Á., Z. GAZDAG, P. GRÓF, G. MÁTÉ, S. SÁROSI, J. KRISCH, C. VÁQVÖLQYI, L. MAKSZIN a L. PESTI. Effects of clary sage oil and its main components, linalool and linalyl acetate, on the plasma membrane of *Candida albicans*: an in vivo EPR study. *Apoptosis*. 2017, **22**(2), pp. 175-187.
- [55] JASSBI, A. R., S. ZARE, O. FIRUZI a J. XIAO. Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species. *Phytochemistry Reviews*. 2016, **15**(5), pp. 829-867.
- [56] SAFAEI-GHOMI, J., R. MASOOMI, F. J. KASHI a H. BATOOLI. Bioactivity of the Essential Oil and Methanol Extracts of Flowers and Leaves of *Salvia sclarea* L. from Central Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2016, **19**(4), pp. 885-896.
- [57] ŠULNIŪTĖ, V., A. PUKALSKAS a P. R. VENSKUTONIS. Phytochemical composition of fractions isolated from ten *Salvia* species by supercritical carbon dioxide and pressurized liquid extraction methods. *Food Chemistry*. 2016, **224**(1), pp. 37-47.
- [58] SZENTMIHÁLYI, K. a M. T. CSEDÓ. Comparative study on tannins, flavonoids, terpenes and mineral elements of some *Salvia* species. In: *XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants*. Toronto: Acta Horticulturae, 2004. p. 463-470. ISBN 978-90-66055-07-0.

- [59] MIRAJ, S., RAFIEIAN-KOPAEI a S. KIANI. Melissa officinalis L: A Review Study With an Antioxidant Prospective. *Journal of Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*. 2016, **22**(3), pp. 385-394.
- [60] MIRAJ, S., N. AZIZI a S. KIANI. A review of chemical components and pharmacological effects of Melissa officinalis L. *Der Pharmacia Lettre*. 2016, **8**(6), pp. 229-237.
- [61] ŽLABUR, J. Š., S. VOĆA, N. DOBRIČEVIĆ, S. PLIESTIĆ, A. GALIĆ, A. BORIČEVIĆ a N. BORIĆ. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from lemon balm and peppermint leaves. *International Agrophysics*. 2016, **30**(1), pp. 95-104.
- [62] FRĄSZCZAK, B., M. GAŚECKA, A. GOLCZ a R. ZAWIRSKA-WOJTASIAK. The chemical composition of lemon balm and basil plants grown under different light conditions. *Acta scientiarum Polonorum*. 2015, **14**(2015), pp. 93-104.
- [63] SINGH, R., M. A. M. SHISHNI a A. BELKHEIR. Antibacterial and antioxidant activities of Mentha piperita L. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015, **8**(3), pp. 322-328.
- [64] RIACHI, L. G. a C. DE MARIA. Peppermint antioxidants revisited. *Food Chemistry*. 2015, **176**(1), pp. 72-81.
- [65] FIALOVÁ, S., D. TEKELOVÁ, K. RENDEKOVÁ, J. KLINČOK, M. KOLÁRIK, K. KURUCOVÁ a D. GRANČAI. Phenolic compounds variation in Mentha L. Species in the course of a four-years period. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae*. 2015, **62**(9), pp. 2-7.
- [66] BALAKRISHNAN, A. Therapeutic Uses of Peppermint – A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences & Research*. 2015, **7**(7), pp. 474-476.
- [67] TAHERPOUR, A. A., S. KHAEF, A. YARI, S. NIKEFSHAR, M. FATHI a S. GHAMRABI. Chemical composition analysis of the essential oil of Mentha piperita L. from Kermanshah, Iran by hydrodistillation and HS/SPME methods. *Journal of Analytical Science and Technology*. 2017, **8**(11), pp. 1-6.
- [68] URIBE, E., D. MARÍN, A. VEGA-GALVÉZ, I. QUISPE-FUENTES a A. RODRÍGUEZ. Assessment of vacuum-dried peppermint (Mentha piperita L.) as a source of natural antioxidants. *Food Chemistry*. 2016, **190**(1), pp. 559-565.
- [69] EBRAHIMZADEH, M. A., S. ESLAMI, S. M. NABAVI, S. F. NABAVI, A. H. MOGHADDAM a A. R. BEKHRADNIA. Estimation of Essential and Toxic Mineral Elements in Mentha Species. *Asian Journal of Chemistry*. 2011, **23**(4), pp. 1648-1650.
- [70] GHORBANI, A. a M. ESMAEILIZADEH. Pharmacological properties of Salvia officinalis and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2017, **7**(4), pp. 433-440.
- [71] GRDIŠA, M., M. JUG-DUJAKOVIĆ, M. LONČARIĆ, K. CAROVIĆ-STANKO, T. T. NINČEVIĆ, Z. LIBER a Z. ŠATOVIĆ. Dalmatian sage (Salvia officinalis L.): A review of biochemical contents, medical properties and genetic diversity. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2015, **80**(2), pp. 69-78.
- [72] TAARIT, M. B., K. MSAADA, K. HOSNI a B. MARZOUK. Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (Salvia officinalis L.) leaves under NaCl stress. *Food Chemistry*. 2010, **119**(3), pp. 951-956.
- [73] ASAMENEW, G., K. ASRES, D. BISRAT, A. MAZUMDER a P. LINDEMANN. Studies on Chemical Compositions, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils of Salvia officinalis Linn. Grown in Two Locations of Ethiopia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2017, **20**(2), pp. 426-437.
- [74] GIFFEN, J. E., A. D. LESSIAK, A. J. DANE, R. B. COBY a R. A. MUSAH. Rapid Species-level Identification of Salvias by Chemometric Processing of Ambient Ionisation Mass Spectrometry-derived Chemical Profiles. *Phytochemical Analysis*. 2016, **28**(1), pp. 16-26.

- [75] LOPRESI, A. L. Salvia (Sage): A Review of its Potential Cognitive-Enhancing and Protective Effects. *Drugs R D*. 2017, **17**(1), pp. 53-64.
- [76] PAVLIĆ, B., S. VIDOVIĆ, J. VLADIĆ, R. RADOSAVLJEVIĆ, M. CINDRIĆ a Z. ZEKOVIĆ. Subcritical water extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by-products—Process optimization by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2016, **116**(1), pp. 36-45.
- [77] MEHTA, D. Review on Pharmacological profile of *Salvia officinalis*. *Planta Activa*. 2012, **2012**(4), pp. 203-207.
- [78] CINDRIĆ, I. J., M. ZEINER, E. GLAMUZINA a G. STINGEDER. Elemental characterisation of the medical herbs *Salvia officinalis* L. and *Teucrium montanum* L. grown in Croatia. *Microchemical Journal*. 2013, **107**(1), pp. 185-189.
- [79] SHINGISOV, A. U., R. S. ALIBEKOV, B. S. MYRKALYKOV, S. A. MUSAYEVA, K. A. URAZBAYEVA, S. K. ISKAKOVA, A. R. TASPOLTAYEVA a Z. I. KOBZHASAROVA. Physicochemical Characteristics of The New Polyphyto-Component Composition for Food Industry. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 2016, **13**(2), pp. 879-886.
- [80] SAID-AL AHL, H. A. H., Z. K. ABBAS, A. S. SABRA a K. G. TKACHENKO. Essential Oil Composition of *Hyssopus officinalis* L. Cultivated in Egypt. *International Journal of Plant Science and Ecology*. 2015, **1**(2), pp. 49-53.
- [81] FATHIAZAD, F. a S. HAMEDEYAZDAN. A review on *Hyssopus officinalis* L.: Composition and biological activities. *African Journal of Microbiology Research*. 2011, **5**(17), pp. 1959-1966.
- [82] VLASE, L., D. BENEDEC, D. HANGANU, G. DAMIAN, I. CSILLAG, B. SEVASTRE, A. C. MOT, R. SILAQHI-DUMITRESCU a I. TILEA. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules*. 2014, **19**(5), pp. 5490-5507.
- [83] STANKOVIĆ, N., T. MIHAJLOV-KRSTEV, B. ZLATKOVIĆ, J. MATEJIĆ, V. STANKOV JOVANOVIĆ, B. KOCIĆ a L. ČOMIĆ. Comparative Study of Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Essential Oils of Selected Aromatic Plants from Balkan Peninsula. *Planta Medica*. 2016, **82**(7), pp. 650-661.
- [84] BŁAŻEWICZ, A., T. BAJ, R. ŚWIEBODA a Ł. ŚWIĄTEK. Determination of Heavy Metals in Aerial Part of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) Using High Performance Ion Chromatography with the Aid of a Linear and Non-Linear Weighted Least-Squares Regression Model. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2007, **16**(2), pp. 191-198.
- [85] GONÇALVES JÚNIOR, A. C., H. NACKE, G. F. COELHO, D. SCHWANTES, E. A. D. CARVALHO a A. J. D. MORAES. Nutrients and metals contents in hyssop (*Hyssopus officinalis*) plants growing in a clayish soil with mineral and organic. *Científica*. 2013, **41**(2), pp. 251-261.
- [86] TUSEVSKI, O., A. KOSTOVSKA, A. ILOSKA, L. TRAJKOVSKA a S. GANDOVSKA SIMIC. Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Central European Journal of Biology*. 2014, **9**(9), pp. 888-900.
- [87] PEIRETTI, P. G. a F. GAI. Chemical composition, nutritive value, fatty acid and amino acid contents of *Galega officinalis* L. during its growth stage and in regrowth. *Animal Feed Science and Technology*. 2006, **130**(3-4), pp. 257-267.
- [88] KAHKESHANI, N., A. HADJIAKHOONDI, N. MAAFI a M. KHANAVI. Standardization of a galactogogue herbal mixture based on its total phenol and flavonol contents and antioxidant activity. *Research Journal of Pharmacognosy*. 2015, **2**(1), pp. 35-39.

- [89] BELEŽENTIENĖ, L. a V. SPRUOGIS. Experience of fodder Galega orientalis (Lam.) and traditional fodder grasses use for forage production in organic farm. *Veterinarija Ir Zootechnika*. 2011, **56**(78), pp. 19-26.
- [90] RAHIMI-MADISEH, M., A. MALEKPOUR-TEHRANI, M. BAHMANI a M. RAFIEIAN-KOPAEI. The research and development on the antioxidants in prevention of diabetic complications. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016, **9**(9), pp. 825-831.
- [91] KHODADADI, S. Administration of Galega officinalis in experimental and clinical investigations; a narrative review. *Annals of Research in Antioxidants*. 2016, **1**(1), pp. 1-4 p.
- [92] BELEŽENTIENĖ, L. a S. MIKULIONIENĖ. Chemical composition of galega mixtures silages. *Agronomy Research*. 2006, **4**(2), pp. 483-492.
- [93] CSUPOR, D., A. CSORBA a J. HOHMANN. Recent Advances in the Analysis of Flavonolignans of Silybum Marianum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, **130**(1), pp. 301-317.
- [94] GRAF, T. N., N. B. CECH, S. J. POLYAK a N. H. OBERLIES. A validated UHPLC-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of flavonolignans in milk thistle (*Silybum marianum*) extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, **126**(1), pp. 26-33.
- [95] ABOUZIDA, S. F., S. N. CHEN a G. F. PAULI. Silymarin content in *Silybum marianum* populations growing in Egypt. *Industrial Crops and Products*. 2016, **83**(1), pp. 729-737.
- [96] PEREIRA, C., L. BARROS, A. M. CARVALHO, C. SANTOS-BUELGA a I. C. FERREIRA. Infusions of artichoke and milk thistle represent a good source of phenolic acids and flavonoids. *Food & Function*. 2015, **6**(1), pp. 56-62.
- [97] MHAMBI, B., F. ABBASSI, A. SMAOUI, C. ABDELLY a B. MARZOUK. Fatty acids, essential oil and phenolics composition of *Silybum marianum* seeds and their antioxidant activities. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016, **29**(3), pp. 953-959.
- [98] ISMAILI, S. A., H. HARHAR, S. GHARBY, H. BOURAZMI, M. TABYAOUI, S. KITANE, M. A. EL BELGHITI a Z. CHARROUF. Chemical composition of two non-conventional oils in Morocco: *Melia azadirachta* and *Silybum marianum* (L.). *Journal of Materials and Environmental Science*. 2016, **7**(6), pp. 2208-2213.
- [99] YALDIZ, G. Effects of potassium sulfate [K₂SO₄] on the element contents, polyphenol content, antioxidant and antimicrobial activities of milk thistle [*Silybum marianum*]. *Pharmacognosy Magazine*. 2017, **13**(49), pp. 102-107.
- [100] IONESCU, D., M. POPESCU, G. D. RIZEA a F. MIHALCEA. Polyphenols and Minerals, Antioxidants in the Plants Used in the Natural Treatment of Hepatobiliary Disorders. *Revista de Chimie*. 2014, **65**(5), pp. 507-511.
- [101] NJERU, S. N., C. G. MATASYOH, C. M. MWENDIA a G. K. KOBIA. A Review of some Phytochemicals commonly found in Medicinal Plants. *International Journal of Medicinal plants*. 2013, **105**(1), pp. 135-140.
- [102] SAKARKAR, D. M. a V. N. DESHMUKH. Ethnopharmacological Review of Traditional Medicinal Plants for Anticancer Activity. *International Journal of PharmTech Research*. 2011, **3**(1), pp. 298-308.
- [103] SURYA, S., A. D. SALAM, D. V. TOMY, B. CARLA, R. A. KUMAR a C. SUNIL. Diabetes mellitus and medicinal plants-a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2014, **4**(5), pp. 337-347.
- [104] TABASSUM, N. a F. AHMAD. Role of natural herbs in the treatment of hypertension. *Pharmacognosy Reviews*. 2011, **5**(9), pp. 30-40.
- [105] DHAMA, K., R. TIWARI, S. CHAKRABORTY, M. SAMINATHAN, A. KUMAR, K. KARTHIK, M. Y. WANI, AMARPAL, S. VIR SINGH a A. RAHAL. Evidence Based

- Antibacterial Potentials of Medicinal Plants and Herbs Countering Bacterial Pathogens Especially in the Era of Emerging Drug Resistance: An Integrated Update. *International Journal of Pharmacology*. 2014, **10**(1), pp. 1-43.
- [106] ABBAS, Z. K., S. SAGGU, M. I. SAKERAN, N. ZIDAN, H. REHMAN a A. A. ANSARI. Phytochemical, antioxidant and mineral composition of hydroalcoholic extract of chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2015, **22**(3), pp. 322-326.
- [107] SILVA, L. R., A. SOUSA a M. TAVEIRA. Characterization of Portuguese honey from Castelo Branco region according to their pollen spectrum, physicochemical characteristics and mineral contents. *Journal of Food Science and Technology*. 2017, **54**(8), pp. 2551-2561.
- [108] KIRIMER, N., S. MOKHTARZADEH, B. DEMIRCI, F. GOGER, K. M. KHAWAR a F. DEMIRCI. Phytochemical profiling of volatile components of *Lavandula angustifolia* Miller propagated under in vitro conditions. *Industrial Crops and Products*. 2016, **96** (1), pp. 120-125.
- [109] APROTOSOAI, A. C., E. GILLE, A. TRIFAN, V. S. LUCA a A. MIRON. Essential oils of *Lavandula* genus: a systematic review of their chemistry. *Phytochemistry Reviews*. 2017, **16**(53), pp. 1-39.
- [110] PIRES, T. C., M. I. DIAS, L. BARROS a I. C. FERREIRA. Nutritional and chemical characterization of edible petals and corresponding infusions: Valorization as new food ingredients. *Food Chemistry*. 2017, **220**(1), pp. 337-343.
- [111] MARTIN D., N. NAVARRO DEL HIERRO, D. VILLANUEVA BERMEJO, R. FERNANDÉZ-RUIZ, T. FORNARI a G. REQLERO. Bioaccessibility and Antioxidant Activity of *Calendula officinalis* Supercritical Extract as Affected by in Vitro Codigestion with Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, **64**(46), pp. 8828-8837.
- [112] SAUSSERDE, R. a K. KAMPUSS. Composition of carotenoids in *Calendula officinalis* L.) flowers. In: *9th Baltic Conference on Food Science and Technology "Food for Consumer Well-Being" FOODBALT*. Jelgava: Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology, 2014. p. 13-18. ISSN 2255-9817.
- [113] YERENOVA, B. Y., Y. PRONINA a E. B. MEDVEDKOV. Production of melon-based juices with enriching herbal supplements. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2016, **22**(5), pp. 840-848.
- [114] TKACHENKO, A. a I. PAKHOMOVA. Consumer properties improvement of sugar cookies with fillings with non-traditional raw materials with high biological value. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2016, **3**(11), pp. 54-61.
- [115] *Opinion of the Scientific Committee on Food on the presence of hypericin and extracts of Hypericum sp. in flavourings and other food ingredients with flavouring properties* [online]. Scientific Committee on Food, 2002 [cit. 2017-07-24]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out113_en.pdf
- [116] KAUR, T., H. A. BHAT, R. BHAT, A. KUMAR, K. BINDU, S. KOUL a D. VYAS. Physio-chemical and antioxidant profiling of *Salvia sclarea* L. at different climates in north-western Himalayas. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015, **37**(13), pp. 1-10.
- [117] CAROCHO, M., L. BARROS, R. C. CALHELHA, A. ĆIRIĆ, M. SOKOVIĆ, C. SANTOS-BUELGA, P. MORALES a I. C. FERREIRA. Melissa officinalis L. decoctions as functional beverages: a bioactive approach and chemical characterization. *Food & Function*. 2015, **6**(7), pp. 2240-2248.
- [118] SCHOLEY, A., A. GIBBS, C. NEALE, N. PERRY, A. OSSOUKHOVA, V. BILOQ, M. KRAS, C. SCHOLZ, M. SASS a S. BUCHWALD-WERNER. Anti-Stress Effects of Lemon Balm-Containing Foods. *Nutrients*. 2014, **6**(11), pp. 4805-4821.

- [119] SAATCHI, A., M. M. KADIVAR, S. SOLEIMANIAN ZAD a M. S. ABAEE. Application of Some Antifungal and Antioxidant Compounds Extracted from Some Herbs to Be Used in Cakes as Biopreservatives. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2014, **16**(1), pp. 561-568.
- [120] CAROCHO M., J. C. BARREIRA, A. BENTO, V. FERNANDÉZ-RUIZ, P. MORALES a I. C. FERREIRA. Chestnut and lemon balm based ingredients as natural preserving agents of the nutritional profile in matured "Serra da Estrela" cheese. *Food Chemistry*. 2016, **204**(1), pp. 185-193.
- [121] *Informační centrum bezpečnosti potravin: Přírodní konzervační látky* [online]. Ministerstvo zemědělství, 2006 [cit. 2017-07-24]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/prirodni-konzervacni-latky.aspx>
- [122] LUPINSKAYA, S. M. Technological features of the use of wild-growing raw materials in the production of sour-milk beverages. *Foods and Raw Materials*. 2014, **2**(2), pp. 32-39.
- [123] DYAB, A. S., A. M. ALI a H. I. MATUK. Enhancement and Evaluation of Peppermint (*Mentha Piperita* L.) Beverage. *International Journal of Life Sciences Research*. 2015, **3**(1), pp. 175-185.
- [124] ASEFI, N. Stabilization of sunflower oil by pennyroyal (*Mentha piperita*) extracts during accelerated storage. *International Journal of Food Properties*. 2017, **20**(1), pp. 30-40.
- [125] BÖSZÖRMÉNYI, A., E. HÉTHELYI, A. FARKAS, G. HORVÁTH, N. PAPP, E. LEMBERKOVICS a E. SZOKE. Chemical and genetic relationships among sage (*Salvia officinalis* L.) cultivars and Judean sage (*Salvia judaica* Boiss.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, **57**(11), pp. 4663-4667.
- [126] PORTE, A., R. L. O. GODOY a L. H. MAIA-PORTE. Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). *A Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2013, **15**(3), pp. 438-441.
- [127] HAYOUNI, E. A., I. CHRAIEF, M. ABEDRABBA, M. BOUIX, J. Y. LEVEAU, H. MOHAMMED a M. HAMDÍ. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, **125**(3), pp. 242-251.
- [128] MIRODDI, M., M. NAVARRA a M. C. QUATTROPANI. Systematic Review of Clinical Trials Assessing Pharmacological Properties of *Salvia* Species on Memory, Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *CNS Neuroscience*. 2014, **20**(6), pp. 485-495.
- [129] ORAON, A., J. ATANU, P. S. PRAJAPATI a P. SUVERA. Application of Herbs in Functional Dairy Products – A Review. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*. 2017, **5**(3), pp. 1-7.
- [130] JAHANTIGH, O., F. NAJAFI, H. NAGHDI BADI, R. A. KHAVARI-NEJAD a F. SANJARIAN. Essential oil composition of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) under salt stress at flowering stage. *Journal of Essential Oil Research*. 2016, **27**(5), pp. 458-464.
- [131] ZAWIŚLAK, G. Hyssop herb yield and quality depending on harvest term and plant spacing. *Acta Scientiarum Polonorum*. 2011, **10**(3), pp. 331-342.
- [132] HATİPOĞLUA, G., M. SÖKMEN, E. BEKTAŞ, D. DAFERERA, A. SÖKMEN, E. DEMİR a H. ŞAHİN. Automated and standard extraction of antioxidant phenolic compounds of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*. *Industrial Crops and Products*. 2013, **43**(1), pp. 427-433.
- [133] MICHALCZYK, M., R. MACURA, I. TESAROWICZ a J. BANAS. Effect of adding essential oils of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) on the shelf life of ground beef. *Meat Science*. 2012, **90**(3), pp. 842-850.
- [134] AL-WABEL, N. A., H. M. MOUSA, O. H. OMER a A. M. ABDEL-SALAM. Biological Evaluation of Aqueous Herbal Extracts and Stirred Yoghurt Filtrate Mixture Against

- Alloxan-Induced Oxidative Stress and Diabetes in Rats. *International Journal of Pharmacology*. 2008, **4**(2), pp. 135-139.
- [135] ANDREZEJEWSKA, J., T. MARTINELLI a K. SADOWSKA. Silybum marianum: non-medical exploitation of the species. *Annals of Applied Biology*. 2015, **167**(3), pp. 285-297.
- [136] JUODEIKIENE, G., D. CIZEIKIENE, V. CESKEVICIUTE, D. VIDMANTIENE, L. BASINSKIENE, E. AKUNECA, M. STANKEVICIUS, A. MARUSKA, E. BARTKIENE, O. RAGAZINSKIENE a A. PETRAUSKAS. Solid-State Fermentation of Silybum marianum L. Seeds Used as Additive to Increase the Nutritional Value of Wheat Bread. *Food Technology and Biotechnology*. 2013, **51**(4), pp. 528-538.
- [137] ZHU, S., Y. DONG, J. TU, Y. ZHOU a C. DA. Amino acid composition and in vitro digestibility of protein isolates from Silybum marianum. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 2013, **11**(1), pp. 136-140.
- [138] KHODDAMI, A., M. WILKES a T. ROBERTS. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. 2013, **18**(3), pp. 2328-2375.
- [139] DAI, J., R. J. MUMPER a T. ROBERTS. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. 2010, **15**(10), pp. 7313-7352.
- [140] SANI, I. M., S. IQBAL, K. W. CHAN a M. ISMAIL. Effect of Acid and Base Catalyzed Hydrolysis on the Yield of Phenolics and Antioxidant Activity of Extracts from Germinated Brown Rice (GBR). *Molecules*. 2012, **17**(12), pp. 7584-7594.
- [141] IFEOMA, O. a S. OLUWAKANYINSOL. Screening of Herbal Medicines for Potential Toxicities. S. Gowder. *New Insights into Toxicity and Drug Testing*. 1st ed. Rijeka: InTech, 2013 p. 63-88. ISBN 978-953-51-0946-4.
- [142] SCHERER, R. a H. T. GODOY. Effects of extraction methods of phenolic compounds from Xanthium strumarium L. and their antioxidant activity. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2014, **16**(1), pp. 41-46.
- [143] MUSTAPA, A. N., A. MARTIN, R. B. MATO a M. J. COCERO. Extraction of phytochemicals from the medicinal plant Clinacanthus nutans Lindau by microwave-assisted extraction and supercritical carbon dioxide extraction. *Industrial Crops and Products*. 2015, **74**(1), pp. 83-94.
- [144] PASRIJA, D. a C. ANANDHARAMAKRISHNAN. Techniques for Extraction of Green Tea Polyphenols: A Review. *Food and Bioprocess Technology*. 2015, **8**(5), pp. 935-950.
- [145] MAGWAZA, L. S., U. L. OPARA, P. J. R. CRONJE, S. LANDAHL, J. ORDAZ ORTIZ a L. A. TERRY. Rapid methods for extracting and quantifying phenolic compounds in citrus rinds. *Food Science and Nutrition*. 2016, **4**(1), pp. 4-10.
- [146] XU, W., K. CHU, H. LI, Y. ZHANG, H. ZHENG, R. CHEN a L. CHEN. Ionic Liquid-Based Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids from Bauhinia championii (Benth.) Benth. *Molecules*. 2012, **17**(12), pp. 14323-14335.
- [147] ALTEMIMI, A., D. G. WATSON, R. CHOUDHARY, M. R. DASARI a D. A. LIGHTFOOT. Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. *PLOS ONE*. 2016, **11**(2), pp. 1-20.
- [148] JING, C. L., X. F. DONG a J. M. TONG. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoid Compounds and Antioxidants from Alfalfa Using Response Surface Method. *Molecules*. 2015, **20**(9), pp. 15550-15571.
- [149] OTERO-PAREJA, M., L. CASAS, M. FERNÁNDEZ-PONCE, C. MANTELL a E. J. MARTÍNEZ DE LA OSSA. Green extraction of antioxidants from different varieties of red grape pomace. *Molecules*. 2015, **20**(6), pp. 9686-9702.
- [150] KARALE, C. K., P. J. DERE, S. M. DHONDE, B. S. HONDE a A. P. KOTE. An Overview on Supercritical Fluid Extraction for Herbal Drugs. *International Journal of Review Article Pharmaceutical Innovations*. 2011, **1**(3), pp. 93-106.

- [151] BABOVIC, N., S. DJILAS, M. JADRANIN, V. VAJS, J. IVANOVIC, S. PETROVIC a I. ZIZOVIC. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. *Innovative Food Science*. 2010, **11**(1), pp. 98-107.
- [152] PLATONOV, I. A., L. V. PAVLOVA, E. A. NOVIKOVA, N. V. NIKITCHENKO a I. Y. ROSCHUPKINA. Extraction of biologically active compounds from medicinal plant raw material by extractants in subcritical state. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 2014, **50**(6), pp. 762-767.
- [153] ALUPULUI, A., I. CĂLINESCU a V. LAVRIC. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Scientific Bulletin, Series B*. 2012, **74**(2), pp. 129-142.
- [154] WANG, Y. Q., Z. F. WU, G. KE a M. YANG. An Effective Vacuum Assisted Extraction Method for the Optimization of Labdane Diterpenoids from *Andrographis paniculata* by Response Surface Methodology. *Molecules*. 2015, **20**(1), pp. 430-445.
- [155] AHMADI, M., E. ELM SVENSSON a K. ENGVALL. Application of Solid-Phase Microextraction (SPME) as a Tar Sampling Method. *Energy*. 2013, **27**(7), pp. 3853-3860.
- [156] ZDERIC, A., E. ZONDERVAN a J. MEULDIJK. Breakage of Cellular Tissue by Pulsed Electric Field: Extraction of Polyphenols from Fresh Tea Leaves. *Chemical Engineering Transaction*. 2013, **13**(1), pp. 1795-1800.
- [157] BOUSSETTA, N., N. GRIMI a E. VOROBIEV. Pulsed Electrical Technologies Assisted Polyphenols Extraction from Agricultural Plants and Bioresources: A Review. *International Journal of Food Processing Technology*. 2015, **2**(1), pp. 1-10.
- [158] KALCHEVA-KARADZHOVA, K., V. SHIKOV, K. MIHALEV, G. DOBREV, D. LUDNEVA a N. PENOV. Enzyme-Assisted Extraction of Polyphenols From Rose (*Rosa Damascena* Mill.) Petals. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*. 2014, **18**(2), pp. 65-72.
- [159] PURI, M., D. SHARMA a C. J. BARROW. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*. 2012, **30**(1), pp. 37-44.
- [160] BARFI, B., A. ASGHARI, M. RAJABI, A. BARFI a I. SAEIDI. Simplified miniaturized ultrasound-assisted matrix solid phase dispersion extraction and high performance liquid chromatographic determination of seven flavonoids in citrus fruit juice and human fluid samples: Hesperetin and naringenin as biomarkers. *Journal of Chromatography A*. 2013, **1311**(1), pp. 30-40.
- [161] ZHANG, H., M. KANG, H. ZHANG a Y. YONG. Matrix solid phase dispersion extraction for determination of flavonoids in the flower of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. by capillary zone electrophoresis. *Analytical Methods*. 2014, **6**(3), pp. 766-773.
- [162] MONASTERIO, R. P., A. R. FONTANA a M. F. SILVA. Matrix solid-phase dispersion: a simple and fast technique for the determination of phenolic compounds in olive oil by liquid chromatography. *Analytical Methods*. 2014, **6**(22), pp. 8986-8995.
- [163] KARASOVÁ, G., J. LEHOTAY, J. SÁDECKÁ, I. SKAČÁNI a M. LACHOVÁ. Selective extraction of derivatives of p-hydroxy-benzoic acid from plant material by using a molecularly imprinted polymer. *Journal of Separation Science*. 2005, **28**(18), pp. 2468-2476.
- [164] BELOBORODOV, V., I. VOSKOBOYNIKOVA, V. KOLKHIR, A. SAVVATEEV a N. ZAKHAROVA. Determination of marker compounds in combined herbal extract-based anti-prostatitis herbal product. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2016, **7**(2), pp. 423-429.
- [165] KARASOVÁ, G., J. LEHOTAY, E. KŁODZINSKA, R. GADZAŁA-KOPCIUCH a B. BUSZEWSKI. Comparison of several extraction methods for the isolation of benzoic acid derivatives from *Melissa officinalis*. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2006, **29**(11), pp. 1633-1644.

- [166] CAO, X., Q. WANG, Y. LI, G. BAI, H. REN a Y. ITO. Isolation and purification of series bioactive components from *Hypericum Perforatum* L. by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in Biomedical and Life Sciences*. 2011, **879**(7-8), pp. 480-488.
- [167] PYRZYNSKA, K. a A. SENTKOWSKA. Recent Developments in the HPLC Separation of Phenolic Food Compounds. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2015, **45**(1), pp. 41-51.
- [168] ZENÃO, S., A. AIRES, C. DIAS, M. J. SAAVEDRA a C. FERNÁNDES. Antibacterial potential of *Urtica dioica* and *Lavandula angustifolia* extracts against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic foot ulcers. *Journal of Herbal Medicine*. 2017, **10**(1), pp. 53-58.
- [169] NICOLAI, M., P. PEREIRA, R. F. VITOR, C. PINTO REIS, A. ROBERTO a P. RIJO. Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants. *Measurement*. 2016, **89**(1), pp. 328-332.
- [170] HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, D., I. F. PÉREZ-RAMÍREZ, M. RAMOS-GÓMEZ, S. MENDOZA-DÍAZ, G. LOARCA-PINA a R. REYNOSO-CAMACHO. Phytochemical characterization and effect of *Calendula officinalis*, *Hypericum perforatum*, and *Salvia officinalis* infusions on obesity-associated cardiovascular risk. *Medical Chemistry Research*. 2016, **25**(1), pp. 163-172.
- [171] DEUSCHLE, V. C. K. N., R. A. N. DEUSCHLE, M. PIANA, A. A. BOLIGON, M. R. B. BORTOLUZZI, V. DAL PRÁ, C. B. DOLWISCH, F. O. LIMA, L. M. CARVALHO a M. L. ATHAYDE. Phytochemical evaluation and in vitro antioxidant and photo-protective capacity of *Calendula officinalis* L. leaves. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2015, **17**(4), pp. 693-701.
- [172] MEKINIĆ, I. G., F. BURCUL, I. BLAZEVIĆ, D. SKROZA, D. KERUM a V. KATALINIĆ. Antioxidative/acetylcholinesterase inhibitory activity of some asteraceae plants. *Natural Product Communications*. 2013, **8**(4), pp. 471-474.
- [173] KLADAR, N., B. SRĐENOVIĆ, N. GRUJIĆ, B. BOKIĆ, M. RAT, G. ANAČKOV a B. BOŽIN. Ecologically and ontogenetically induced variations in phenolic compounds and biological activities of *Hypericum maculatum* subsp. *maculatum*, Hypericaceae. *Brazilian Journal of Botany*. 2015, **38**(4), pp. 703-715.
- [174] KWIECIEŃ, I., A. SZYDŁOWSKA, B. KAWKA, L. BEERHUES a H. EKIERT. Accumulation of biologically active phenolic acids in agitated shoot cultures of three *Hypericum perforatum* cultivars: 'Elixir', 'Helos' and 'Topas'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2015, **123**(2), pp. 273-281.
- [175] TEMIZEL, K. E. Estimation of the phenolics content of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) grown under different water and salt levels based on reflectance spectroscopy. *Kuwait Journal of Science*. 2015, **42**(3), pp. 210-222.
- [176] TEMERDASHEV, Z. A., N. A. FROLOVA a I. A. KOLYCHEV. Determination of phenolic compounds in medicinal herbs by reversed-phase HPLC. *Journal of Analytical Chemistry*. 2011, **66**(4), pp. 407-414.
- [177] BANDONIENE, D., M. MURKOVIC a P. R. VENSKUTONIS. Determination of rosmarinic acid in sage and borage leaves by high-performance liquid chromatography with different detection methods. *Journal of Chromatographic Science*. 2005, **43**(7), pp. 372-376.
- [178] ŽELJAN, M., A. ANTOLIĆ, I. BABIĆ, S. JURIĆ a M. BOJIĆ. Quantitative analysis of phenolic acids and antiplatelet activity of *Melissa officinalis* leaf extracts. *Natural Product Communications*. 2017, **12**(1), pp. 93-94.

- [179] SKENDI, A., M. IRAKLI a P. CHATZOPOULOU. Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2017, **6**(1), pp. 62-69.
- [180] CUNHA, F., S. R. TINTINO, F. FIGUEREDO, L. BARROS, A. E. DUARTE, M. C. VEGA GOMEZ, C. C. CORONEL, M. ROLÓN, N. LEITE, C. E. SOBRAL-SOUZA, S. V. BRITO, E. P. WACZUC, A. A. BOLIGON, M. ATHAYDE, J. P. KAMDEM, H. D. COUTINHO a J. FRANCO. HPLC-DAD phenolic profile, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activity of *Melissa officinalis*. *Pharmaceutical Biology*. 2016, **54**(9), pp. 1664-1670.
- [181] ARCEUSZ, A. a M. WESOŁOWSKI. Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013, **83**(1), pp. 215-220.
- [182] PROESTOS, C. a M. KOMAITIS. Analysis of naturally occurring phenolic compounds in Aromatic Plants by RP-HPLC Coupled to Diode Array Detector (DAD) and GC-MS after Silylation. *Foods*. 2013, **2**(1), pp. 90-99.
- [183] PEREIRA, E., A. I. PIMENTA, R. C. CALHELHA, A. L. ANTONIO, L. BARROS, C. SANTOS-BUELGA, S. CABO VERDE a I. C. F. R. FERREIRA. Infusions of gamma irradiated *Aloysia citrodora* L. and *Mentha x piperita* L.: Effects on phenolic composition, cytotoxicity, antibacterial and virucidal activities. *Industrial Crops and Products*. 2017, **97**(1), pp. 582-590.
- [184] NAJAFIAN, S., M. MORADI a M. SEPEHRIMANESH. Polyphenolic contents and antioxidant activities of two medicinal plant species, *Mentha piperita* and *Stevia rebaudiana*, cultivated in Iran. *Comparative Clinical Pathology*. 2016, **25**(4), pp. 743-747.
- [185] MAHDAVIKIA, F. a M. J. SAHARKHIZ. Phytotoxic activity of essential oil and water extract of peppermint (*Mentha × piperita* L. CV. Mitcham). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2015, **2**(4), pp. 146-153.
- [186] RODRÍGUEZ-SOLANA, R., J. M. SALGADO, J. M. DOMÍNGUEZ a S. CORTÉS-DIÉGUEZ. Comparison of soxhlet, accelerated solvent and supercritical fluid extraction techniques for volatile (GC-MS and GC/FID) and phenolic compounds (HPLC-ESI/MS/MS) from lamiaceae species. *Phytochemical Analysis*. 2014, **26**(1), pp. 61-71.
- [187] FARNAD, N., R. HEIDARI a B. ASLANIPOUR. Phenolic composition and comparison of antioxidant activity of alcoholic extracts of Peppermint (*Mentha piperita*). *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2014, **8**(2), pp. 113-121.
- [188] PUTNIK, P., D. BURSAĆ KOVAČEVIĆ, M. PENIĆ, M. FEGEŠ a V. DRAGOVIĆ-UZELAC. Microwave-Assisted Extraction (MAE) of Dalmatian Sage Leaves for the Optimal Yield of Polyphenols: HPLC-DAD Identification and Quantification. *Food Analytical Methods*. 2016, **9**(8), pp. 2385-2394.
- [189] LI, B., C. ZHANG, L. PENG, Z. LIANG, X. YAN, Y. ZHU a Y. LIU. Comparison of essential oil composition and phenolic acid content of selected *Salvia* species measured by GC-MS and HPLC methods. *Industrial Crops and Products*. 2015, **69**(1), pp. 329-334.
- [190] FARHAT, M. B., R. CHAOUCH-HAMADA, J. A. SOTOMAYOR, A. LANDOULSI a M. J. JORDÁN. Antioxidant potential of *Salvia officinalis* L. residues as affected by the harvesting time. *Industrial Crops and Products*. 2014, **54**(1), pp. 78-85.
- [191] FARHAT, M. B., A. LANDOULSI, R. CHAOUCH-HAMADA, J. A. SOTOMAYOR a M. J. JORDÁN. Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial Crops and Products*. 2013, **49**(1), pp. 904-914.
- [192] SAJEWICZ, M., D. STASZEK, M. WAKSMUNDZKA-HAJNOS a T. KOWALSKA. Comparison of TLC and HPLC fingerprints of phenolic acids and flavonoids fractions

- derived from selected sage (*Salvia*) species. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2012, **35**(10), pp. 1388-1403.
- [193] BAJ, T., A. BŁAŻEWICZ, Ł. ŚWIĄTEK, T. WOLSKI, R. KOCJAN a K. GŁOWNIAK. Analysis of phenolic acids in Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) by HPLC-DAD with monolithic column Chromolith™ RP-18e. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin Polonia*. 2011, **4**(5), pp. 59-65.
- [194] KARAKAŞ, F. P., G. ŞAHİN a A. TÜRKER. Enhancement of direct shoot regeneration and determination of bioactive secondary metabolites in leaves of *galega officinalis* L. *Turkish Journal of Biology*. 2016, **40**(1), pp. 1311-1319.
- [195] ANWARI, D. a R. JAMEI. A comparative study between the leaf and flowers of some Asteraceae plants with respect to their antioxidant activity compounds. *Current Nutrition & Food Science*. 2016, **12**(4), pp. 296-303.
- [196] ELADAWI, H., Y. R. ABDEL-FATTAH a A. A. EL-WAHAB. Application of numerical modeling for optimization of selective hot water extraction of taxifolin from 'milk thistle' seeds. *African Journal of Biotechnology*. 2011, **10**(48), pp. 9804-9811.
- [197] MARUŠKA, A., J. PROSEVIČIUS, K. BIMBIRAITE-SURVILIENE, O. KORNYŠOVA, O. RAGAZINSKIENE a V. RATAUTAITĖ. Comparison of phytochemical composition of medicinal plants by means of chromatographic and related techniques. *Procesia Chemistry*. 2010, **2**(1), pp. 83-91.
- [198] ROJHT, H., I. J. KOŠIR a S. TVRDAN. Chemical analysis of three herbal extracts and observation of their activity against adults of *Acanthoscelides obtectus* and *Leptinotarsa decemlineata* using a video tracking system. *Journal of Plant Diseases and Protection* 2012, **119**(2), pp. 59-67.
- [199] PROESTOS, C., D. SERELI a M. KOMAITIS. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*. 2006, **95**(1), pp. 44-52.
- [200] HELMJA, K., M. VAHER, T. PÜSSA, A. ORAV, A. VIITAK, T. LEVANDI a M. KALJURAND. Variation in the composition of the essential oils, phenolic compounds and mineral content of *Hypericum perforatum* L. growing in Estonia. *Natural Product Research*. 2011, **25**(5), pp. 496-510.
- [201] CAO, J., J. WEI, K. TIAN, H. SU, J. WAN a P. LI. Simultaneous determination of seven phenolic acids in three *Salvia* species by capillary zone electrophoresis with β -cyclodextrin as modifier. *Journal of Separation Science*. 2014, **37**(24), pp. 3738-3744.
- [202] ROBLOVÁ, V., M. BITTOVÁ, P. KUBÁŇ a V. KUBÁŇ. Capillary electrophoresis fingerprinting and spectrophotometric determination of antioxidant potential for classification of *Mentha* products. *Journal of Separation Science*. 2016, **39**(14), pp. 2862-2868.
- [203] BARDAKCI ALTAN, H., G. AKAYDIN, H. KIRMIZIBEKMEZ a E. YESILADA. Validated HPTLC Method for the Quantitative Analysis of Rosmarinic Acid in Several *Salvia* Sp. *Turkish Journal of Pharmaceutical Science*. 2014, **11**(3), pp. 245-254.
- [204] KAMBOJ, A., R. GUPTA, A. RANA a R. KAUR. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for determination of the Total phenolic content from extract of *Terminalia bellerica*. *European journal od biomedical and pharmaceutical sciences*. 2015, **2**(3), pp. 201-215.
- [205] AMORATI, R. a L. VALGIMIGLI. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research*. 2015, **49**(5), pp. 633-649.
- [206] PEKAL, A. a K. PYRZYNSKA. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*. 2014, **7**(9), pp. 1776-1782.
- [207] BABA, S. A. a S. A. MALIK. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah University for Science*. 2015, **9**(4), pp. 449-454.

- [208] TOBOLKOVÁ, B. *Moderní postupy hodnocení kvalitativních parametrů potravin*. Brno, 2013, 168 s. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [209] OTANG, W. M., D. S. GRIERSON a N. R. NDIP. Phytochemical studies and antioxidant activity of two South African medicinal plants traditionally used for the management of opportunistic fungal infections in HIV/AIDS patients. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012, **12**(1), pp. 43-53.
- [210] PISOSCHI, A. M. a G. P. NEGULESCU. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 2011, **1**(1), pp. 1-10.
- [211] PAULOVÁ, H., H. BOCHOŘÁKOVÁ a E. TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, **98**(4), pp. 174-179.
- [212] JUNK, M. J. N. *Assessing the Functional Structure of Molecular Transporters by EPR Spectroscopy*. 1st ed. Berlin: Springer, 2012, 212 p. ISBN 978-3-642-25135-1.
- [213] HE, W., Y. LIU, WAMER G. W. a J. J. YIN. Electron spin resonance spectroscopy for the study of nanomaterial-mediated generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2014, **22**(1), pp. 49-63.
- [214] POLOVKA, M. EPR spectroscopy: A tool to characterize stability and antioxidant properties of foods. *Journal of Food Nutrition Research*. 2006, **45**(1), pp. 1-11.
- [215] SGHERRI, C., C. PINZINO, F. NAVARI-IZZO, F. DO IZZO a M. F. QUARTACCI. Antioxidant potential in lipophilic and hydrophilic extracts from medical herbs (*Salvia officinalis* and *Echinacea angustifolia*). A comparison between assays based on electron paramagnetic resonance and spectrophotometry. *Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 2012, **7**(4), pp. 417-424.
- [216] SÁDECKÁ, J., M. POLOVKA, E. KOLEK, E. BELAJOVÁ, B. TOBOLKOVÁ, Ľ. DAŠKO a J. DUREC. Orange juice with pulp: impact of pasteurization and storage on flavour, polyphenols, ascorbic acid and antioxidant activity. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2014, **53**(4), pp. 371-388.
- [217] TOBOLKOVÁ, B., J. DUREC, E. BELAJOVÁ, M. MIHALÍKOVÁ, M. POLOVKA, M. SUHAJ, Ľ. DAŠKO a P. ŠIMKO. Effect of storage on physico-chemical properties of pineapple juice with addition of small pineapple pieces. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2013, **52**(3), pp. 181-190.
- [218] TOBOLKOVÁ, B., M. POLOVKA, E. BELAJOVÁ, M. KOREŇOVSKÁ a M. SUHAJ. Characterisation of some Slovak and European organic and conventional wines based on instrumental and multivariate analysis. *European Food Research and Technology*. 2014, **239**(3), pp. 441-451.
- [219] BUTOROVÁ, L., M. POLOVKA, J. POŘÍZKA a E. VÍTOVÁ. Multi-experimental characterization of selected medical plants growing in the Czech Republic. *Chemical Papers*. 2017, **104**(12), pp. 1-17.
- [220] PAWŁOWSKA-GÓRAL, K., P. RAMOS, B. PILAWA a E. KURZEJA. Application of EPR Spectroscopy to Examination of the Effect of Sterilization Process on Free Radicals in Different Herbs. *Food Biophysics*. 2013, **8**(1), pp. 60-68.
- [221] SANYAL, B., S. CHATTERJEE, P. S. VARIYAR a A. SHARMA. Application of EPR Spectroscopy to Identify Irradiated Indian Medicinal Plant Products. *Journal of Food Science*. 2012, **77**(6), pp. 710-718.
- [222] YARBAŞI, Z., B. KARABULUT a A. KARABULUT. An EPR Study of Gamma Irradiated Medicinal Plants: Cress Seeds and Mistletoe. *Gazi University Journal of Science*. 2011, **24**(2), pp. 203-207.
- [223] AHMADI, M., A. M. M. ABD-ALLA a S. MOHARRAMIPOUR. Combination of gamma radiation and essential oils from medicinal plants in managing *Tribolium castaneum* contamination of stored products. *Applied Radiation and Isotopes*. 2013, **78**(1), pp. 16-20.

- [224] POLOVKA, M. a M. SUHAJ. Classification and prediction of g-irradiation of ten commercial herbs and spices by means of multivariate evaluation of their extracts properties. Comparative study. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2013, **52**(1), pp. 45-60.
- [225] POLOVKA, M. a M. SUHAJ. Detection of caraway and bay leaves irradiation based on their extracts' antioxidant properties evaluation. *Food Chemistry*. 2010, **119**(1), pp. 391-401.
- [226] RANA, S., R. CHAWLA, R. KUMAR, S. SINGH, A. ZHELEVA, Y. DIMITROVA, V. GADJEVA, R. ARORA, S. SULTANA a R. K. SHARMA. Electron paramagnetic resonance spectroscopy in radiation research: Current status and perspectives. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*. 2010, **2**(2), pp. 80-87.
- [227] UCHIYAMA, H., Q. L. ZHAO a M. A. HASSAN. EPR-Spin Trapping and Flow Cytometric Studies of Free Radicals Generated Using Cold Atmospheric Argon Plasma and X-Ray Irradiation in Aqueous Solutions and Intracellular Milieu. *PLOS ONE*. 2015, **10**(8), pp. 1-19.
- [228] ALAM, M. N., N. J. BRISTI a M. RAFIQUZZAMAN. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013, **21**(2), pp. 143-152.
- [229] SOCHOR, J., M. RYVOLOVA, O. KRYSSTOFOVA, P. SALAS, J. HUBALEK, V. ADAM, L. TRNKOVA, L. HAVEL, M. BEKLOVA, J. ZEHNALIK, I. PROVAZNIK a R. KIZEK. Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules*. 2010, **15**(12), pp. 8618-8640.
- [230] PYRZYNSKA, K. a A. PEKAL. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*. 2013, **5**(17), pp. 4288-4295.
- [231] BADARINATH, A. V., K. MALLIKARJUNA RAO, C. M. CHETTY, S. RAMKANTH, T. V. S. RAJAN a K. GHANAPRAKASH. A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. *International Journal of PharmTech Research*. 2010, **2**(2), pp. 1276-1285.
- [232] KEDARE, S. B. a R. P. SINGH. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. 2011, **48**(4), pp. 412-422.
- [233] CHANTA, S. a R. DAVE. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medical plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*. 2009, **3**(13), pp. 981-996.
- [234] MARTYSIAK-ŻUROWSKA, D. a W. WENTA. A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 2012, **11**(1), pp. 83-89.
- [235] SHALABY, E. A. a S. M. M. SHANAB. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*. 2013, **42**(5), pp. 556-564.
- [236] HAWKINS, C. L. a M. J. DAVIES. Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2014, **1840**(2), pp. 708-721.
- [237] FAURE, A. M., M. L. ANDERSEN a L. NYSTRÖM. Ascorbic acid induced degradation of beta-glucan: Hydroxyl radicals as intermediates studied by spin trapping and electron spin resonance spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*. 2012, **87**(3), pp. 2160-2168.
- [238] PAPASTERGIADIS, A., E. MUBIRU, H. VAN LANGENHOVE a B. DE MEULENAER. Malondialdehyde Measurement in Oxidized Foods: Evaluation of the Spectrophotometric Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Test in Various Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, **60**(38), pp. 9589-9594.

- [239] NURZYŃSKA-WIERDAK, R. a G. ZAWISLAK. Chemical composition and antioxidant activity of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) aboveground parts. *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus*. 2016, **15**(5), pp. 225-241.
- [240] GARCÍA- RISCO, M. R., L. MOUHID, L. SALAS-PÉREZ, A. LÓPEZ-PADILLA, S. SANTOYO, L. JAIME, A. RAMÍREZ DE MOLINA, G. REGLERO a T. FORNANI. Biological Activities of Asteraceae (*Achillea millefolium* and *Calendula officinalis*) and Lamiaceae (*Melissa officinalis* and *Origanum majorana*) Plant Extracts. *Plants Food for Human Nutrition*. 2017, **72**(1), pp. 96-102.
- [241] ASHRAF, A., M. RIAZ, M. NASRULLAH a H. M. A. QAYYUM. Phytochemical, antioxidant and cytotoxicity studies of *Calendula officinalis* (Pot marigold) leaves extracts. *Oxidation Communications*. 2017, **39**(1), pp. 120-130.
- [242] JESHVAGHANI, Z. A., M. RAHIMMALEK, M. TALEBI a S. A. H. GOLI. Comparison of total phenolic content and antioxidant activity in different *Salvia* species using three model systems. *Industrial Crops and Products*. 2015, **77**(1), pp. 409-414.
- [243] KASPARAVIČIENĖ, G., J. JURGELEVIĆ, Z. KALVĖNIENĖ, S. VELŽIENĖ, A. SAVICKAS a D. KAZLAUSKIENĖ. Evaluation of extraction factors influence on total phenolic content and antioxidant activity of *Melissa officinalis* L. leaves extracts. *Chemija*. 2016, **28**(1), pp. 58-63.
- [244] SARIKURKCU, C., S. TARGAN, M. S. OZER a B. TEPE. Fatty acid composition, enzyme inhibitory, and antioxidant activities of the ethanol extracts of selected wild edible plants consumed as vegetables in the Aegean region of Turkey. *International Journal of Food Properties*. 2016, **20**(3), pp. 560-572.
- [245] DULETIC-LAUŠEVIC, S., A. ALIMPIC, D. PAVLOVIC, P. D. MARIN a D. LAKUŠIĆ. *Salvia officinalis* of different origins Antioxidant activity, phenolic and flavonoid content of extracts. *Agro Food Industry Hi Tech*. 2016, **27**(1), pp. 52-55.
- [246] NILE, S. H., A. S. NILE a Y. KEUM. Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods. *3 Biotech*. 2017, **7**(1), pp. 76.
- [247] LUCINI, L., D. KANEB, M. PELLIZZONI, A. FERRARI, E. TREVISI, G. RUZICKOVA a D. ARSLAN. Phenolic profile and in vitro antioxidant power of different milk thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] cultivars. *Industrial Crops and Products*. 2016, **83**(1), pp. 11-16.
- [248] WELNA, M., A. SZYMCZYCHA-MADEJA a P. POHL. A comparison of samples preparation strategies in the multi-elemental analysis of tea by spectrometric methods. *Food Research International*. 2013, **53**(2), pp. 922-930.
- [249] CHEN, Y., J. XU, M. YU, X. CHEN a J. SHI. Lead contamination in different varieties of tea plant (*Camellia sinensis* L.) and factors affecting lead bioavailability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010, **90**(9), pp. 1501-1507.
- [250] CAO, H., L. QIAO, H. ZHANG a J. CHEN. Exposure and risk assessment for aluminium and heavy metals in Puerh tea. *Science of The Total Environment*. 2010, **408**(14), pp. 2777-2784.
- [251] YANG, L., Y. L. LI, X. J. GUOXJ, X. Q. MA a Q. YAN. Comparison of dry ashing, wet ashing and microwave digestion for determination of trace elements in *Periostracum serpentis* an *Periostracum cicadae* by ICP-AES. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2013, **58**(3), pp. 1876-1879.
- [252] SZYMCZYCHA-MADEJA, A., M. WELNA a P. POHL. Determination of Elements in Energy Drinks by ICP OES with Minimal Sample Preparation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2013, **24**(10), pp. 1606-1612.
- [253] ROJE, V. Fast method of multi-elemental analysis of stream sediment samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) with prior single-step

- microwave-assisted digestion. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2011, **22**(3), pp. 532-539.
- [254] ENDERS, A. a J. LEHMANN. Comparison of Wet-Digestion and Dry-Ashing Methods for Total Elemental Analysis of Biochar. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2012, **43**(7), pp. 1042-1052.
- [255] KORKMAZ GÖRÜR, F., R. KESER, N. AKÇAY, S. DIZMAN a N. T. OKUMUŞOĞLU. Radionuclides and heavy metals concentrations in Turkish market tea. *Food Control*. 2011, **22**(12), pp. 2065-2070.
- [256] SZYMCZYCHA-MADEJA, A., M. WELNA a W. ZYRNICKI. Multi-Element Analysis, Bioavailability and Fractionation of Herbal Tea Products. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2013, **24**(5), pp. 777-787.
- [257] AKSUNER, N., E. HENDEN, Z. AKER, E. ENGIN a S. SATIK. Determination of essential and non-essential elements in various tea leaves and tea infusions consumed in Turkey. *Food Additives and Contaminants: Part B*. 2012, **5**(2), pp. 126-132.
- [258] BELAY, K. a A. TADESSE. Comparison of Digestion Methods for Determination of Pb (II), Cr (VI) and Cd (II) Contents In Some Ethiopia Spices Using Atomic Absorption Spectroscopy. *International Journal of Academic Scientific Research*. 2014, **2**(3), pp. 42-53.
- [259] YILMAZ, E. a M. SOYLAK. Solid phase extraction of Cd, Pb, Ni, Cu, and Zn in environmental samples on multiwalled carbon nanotubes. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2014, **186**(9), pp. 5461-5468.
- [260] AMIN, A. S. a A. S. AL-ATTAS. Study of the solid phase extraction and spectrophotometric determination of nickel using 5-(4'-chlorophenylazo)-6-hydroxypyrimidine-2,4-dione in environmental samples. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2012, **16**(4), pp. 451-459.
- [261] ALVES, V. N., S. S. O. BORGES, W. B. NETO a N. M. M. COELHO. Determination of Low Levels of Lead in Beer Using Solid-Phase Extraction and Detection by Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*. 2011, **2011**(1), pp. 1-6.
- [262] OWEN, J. D. *Investigation of the Elemental Profiles of Hypericum perforatum as used in Herbal Remedies*. Hertfordshire, 2013, 226 p. Ph.D. Thesis. University of Hertfordshire.
- [263] MOHAMMADI, S. Z., H. HAMIDIAN, L. KARIMZADEH a Z. MOEINADINI. Tween 80 coated alumina: An alternative support for solid phase extraction of copper, nickel, cobalt and cadmium prior to flame atomic absorption spectrometric determination. *Arabian Journal of Chemistry*. 2016, **9**(2), pp. 1290-1296.
- [264] SOYLAK, M., E. YILMAZ, M. GHAEDI a M. MONTAZEROZOHORI. Solid phase extraction on multiwalled carbon nanotubes and flame atomic absorption spectrometry combination for determination of some metal ions in environmental and food samples. *Toxicological*. 2011, **93**(5), pp. 873-885.
- [265] ALOTHMAN, Z. A., M. HABILA, E. YILMAZ a M. SOYLAK. Solid phase extraction of Cd(II), Pb(II), Zn(II) and Ni(II) from food samples using multiwalled carbon nanotubes impregnated with 4-(2-thiazolylazo)resorcinol. *Microchimica Acta*. 2012, **177**(3-4), pp. 397-403.
- [266] CALLEJA, A., V. RÍOS, M. LUQUE, R. OSTOS, A. GRILO, A. M. CAMEÁN a I. MORENO. Development of a New Method for the Determination of Manganese, Cadmium, Mercury and Lead in Whole Blood and Amniotic Fluid by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Journal of Toxins*. 2014, **1**(1), pp. 1-10.
- [267] *Overview of Most Commonly Used Analytical Techniques for Elemental Analysis* [online]. Petro Industry News, 2014 [cit. 2017-07-27]. Dostupné z: <https://www.petro-online.com/articles/analytical->

- [268] AKINYELE, I. O. a O. S. SHOKUNBI. Comparative analysis of dry ashing and wet digestion methods for the determination of trace and heavy metals in food samples. *Food Chemistry*. 2015, **173**(1), pp. 682-684.
- [269] MEYERS, R. A. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation*. 1st ed. Chichester: John Wiley, 2011, 894 p. ISBN 978-0-470-97333-2.
- [270] KADAR, A., L. NOËL, R. CHEKRI, C. VASTEL, S. MILLOUR a T. GUÉRIN. Optimisation of ICP-MS collision/reaction cell conditions for the determination of elements likely to be interfered (V, Cr, Fe, Co, Ni, As and Se) in foodstuffs. *Talanta*. 2011, **85**(5), pp. 2605-2613.
- [271] GUNN, D. Simplifying Mixed-Food Microwave Sample Preparation for ICP-MS Analysis. *Spectroscopy*. 2014, **29**(11), pp. 1-3.
- [272] MARGUÍ, E. a R. VAN GRIKEN. *X-ray fluorescence spectrometry and related techniques: an introduction*. 1st ed. New York: Momentum Press, 2013, 143 p. ISBN 978-160-6503-911.
- [273] ALI, M., T. CHOUDHURY, B. HOSSAIN a M. ALI. Determination of traces of molybdenum and lead in foods by x-ray fluorescence spectrometry. *Springerplus*. 2014, **3**(341), pp. 1-9.
- [274] CORDOVILLA, M. P., M. BUENO, C. APARACIO a M. URRESTARAZU. Effects of salinity and the interaction between *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia* on growth, ethylene production and essential oil contents. *Journal of Plant Nutrition*. 2013, **37**(6), pp. 875-888.
- [275] BOZHANOV, S. R. a I. B. KARADJOVA. Determination of Trace Metals in Bulgarian Lavender Oil by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Essential Oil Research*. 2011, **20**(6), pp. 549-555.
- [276] TOKALIOĞLU, Ş. Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by ICP-MS and multivariate analysis. *Food Chemistry*. 2012, **134**(4), pp. 2504-2508.
- [277] HAIDU, D., D. PÁRKÁNYI a R. I. MOLDOVAN. Elemental Characterization of Romanian Crop Medicinal Plants by Neutron Activation Analysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2017, **2017**(1), pp. 1-12.
- [278] AHMAD, F., A. RAHMAN, M. QADIRUDDIN a S. QURESHI. Elemental analysis of *Calendula officinalis* plant and its probable therapeutic role in health. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*. 2003, **46**(4), pp. 225-310.
- [279] SENILA, M., A. DROLC, A. PINTAR, L. SENILA a E. LEVEI. Validation and measurement uncertainty evaluation of the ICP-OES method for the multi-elemental determination of essential and nonessential elements from medicinal plants and their aqueous extracts. *Journal of Analytical Science and Technology*. 2014, **5**(37), pp. 1-9.
- [280] SZENTMIHÁLYI, K., E. HÉTLEYI, V. VIRÁG a M. THEN. Mineral elements in muscat sage plant (*Salvia sclarea* L.) and essential oil. *Acta Biologica Szegediensis*. 2009, **53**(1), pp. 35-38.
- [281] DZIDA, K., G. ZAWIŚLAK a K. KARCZMARZ. Yields and biological value of three herbal species from the Lamiaceae family. *Journal of Elementology*. 2015, **20**(2), pp. 273-283.
- [282] STANOJKOVIC-SEBIC, A., R. PIVIC, D. JOSIC, Z. DINIC a A. STANOJVIC. Heavy metals content in selected medicinal plants commonly used as components for herbal formulations. *Journal of Agricultural Sciences*. 2015, **21**(1), pp. 317-325.

- [283] LEAL, A. S., G. PRADO, T. C. BOMFIM GOMES, F. PEIXOTO SEPE a I. DALMÁZIO. Determination of metals in medicinal plants highly consumed in Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, **49**(3), pp. 599-607.
- [284] ARSLAN, D., M. M. ÖZCAN a H. O. MENGEŞ. Evaluation of drying methods with respect to drying parameters, some nutritional and colour characteristics of peppermint (*Mentha x piperita* L.). *Energy Conversion and Management*. 2010, **51**(12), pp. 2769-2775.
- [285] VELCIOV, A., S. POPESCU, A. RIVIS, I. DAVID a I. GOGOASA. The evaluation of some bioelements in different types of Herbal Teas and their infusions. In: *15th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2015*. Albena: International Multidisciplinary Scientific GeoConference, 2015. p. 863-870.
- [286] THEN, M., R. SZÓLLÓSY, K. VÁSÁRHELYI-PERÉDI a K. SZENTMIHÁLYI. Polyphenol-, Mineral Element Content and Total Antioxidant Power of Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. In: *XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants*. Toronto: Acta Horticulturae 629, 2004. p. 123-129. ISBN 978-90-66055-07-0.
- [287] DGHAİM, R., S. A. KHATIB, H. RASOOL a M. A. KHAN. Determination of Heavy Metals Concentration in Traditional Herbs Commonly Consumed in the United Arab Emirates. *Journal of Environmental and Public Health*. 2015, **2015**(1), pp. 1-6.
- [288] STORELLI, M. M. Evaluation of toxic metal (Hg, Cd, Pb), polychlorinated biphenyl (PCBs), and pesticide (DDTs) levels in aromatic herbs collected in selected areas of Southern Italy. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2014, **21**(2), pp. 946-953.
- [289] MUGNAI, S., E. AZZARELLO, C. PANDOLFI a S. MANCUSO. Zinc and cadmium accumulation in *Hyssopus officinalis* L. and *Satureja montana* L. In: *I International Symposium on the Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation*. Sanremo: ISHS Acta Horticulturae 723, 2006. p. 361-366. ISBN 978-90-66056-69-5.
- [290] LAWLESS, H. T. *Quantitative Sensory Analysis: Psychophysics, Models and Intelligent Design*. 1st ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2013, 416 p. ISBN: 978-0-470-67346-1.
- [291] STONE, H., R. BLEIBAUM a H. THOMAS. *Sensory Evaluation Practices*. 4th ed. Cambridge: Academic Press, 2012, 446 p. ISBN: 9780123820877.
- [292] LAWLESS, H. T. a H. HEYMANN. *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*. 1st ed. Berlin: Springer, 2010, 596 p. ISBN 978-1-4419-6488-5.
- [293] RAAL, A. a V. MATTO. Palatability perception of herbal teas: Impact of extraction time and saccharose. *Journal of Medicinal Plant Research*. 2012, **6**(12), pp. 2514-2519.
- [294] BELŠČAK, CVITANOVIĆ, A., A. BUŠIĆ, A. LJUBIĆ, A. VOJVODIĆ a K. DRAŽENKA. Evaluation of the nutraceutical potential of medicinal plants from the Lamiaceae family: HPLC profiling, antioxidant capacity and sensory acceptability. In: *8th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists*. Kopřivnice: 2014. p. 42-47. ISBN 978-953-99725-6-9.
- [295] BAKOTA, E. L., J. K. WINKLER-MOSER, M. A. BERHOW, F. J. ELLER a S. F. VAUGHN. Antioxidant activity and sensory evaluation of a rosmarinic acid-enriched extract of *Salvia officinalis*. *Journal of Food Science*. 2015, **80**(4), pp. 711-717.
- [296] MRÁZKOVÁ, I. *Ovlivnění chutnosti bylinných čajů pomocí sensoricky aktivních látek*. Zlín, 2008, 103 s. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [297] OŠŤÁDALOVÁ, M. *Hodnocení organoleptických vlastností vybraných bylinných čajů*. Zlín, 2007, 110 s. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [298] ÖZCELİK, B., A. KARADAG, T. CINBAS a P. YOLDI. Influence of Extraction Time and Different Sage Varieties on Sensory Characteristics of a Novel Functional Beverage by RSM. *Food Science and Technology International*. 2009, **15**(2), pp. 111-118.

- [299] KARABEGOVIĆ, I. T., P. V. VUKOSAVLJEVIĆ, M. M. NOVAKOVIĆ a M. L. LAZIĆ. Influence of the storage on bioactive compounds and sensory attributes of herbal liqueur. *Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2012, **7**(4), pp. 1587-1598.
- [300] LESKOŠEK-ČUKALOVIĆ, I., S. DESPOTOVIĆ, V. NEDOVIĆ, N. LAKIĆ a M. NIKŠIĆ. New type of beer - Beer with improved functionality and defined pharmacodynamic properties. *Food Technology and Biotechnology*. 2010, **48**(3), pp. 384-391.
- [301] KORTEI, N. K., G. T. ODAMTENN, M. OBODAI, V. APPIAH a P. T. AKONOR. Determination of color parameters of gamma irradiated fresh and dried mushrooms during storage. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. 2015, **10**(1-2), pp. 66-71.
- [302] PARSONS, M. *Atlas of Spectral Interferences in ICP Spectroscopy*. 1st ed. Boston: Springer, 1980, 644 p. ISBN 978-1-4684-1026-6.
- [303] ČSN ISO 5496. *Senzorická analýza - Metodologie - Zasyvěčení do problematiky a výcvik posuzovatelů při zjišťování a rozlišování pachů*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2009, 19 s.
- [304] ČSN ISO 8586-1. *Senzorická analýza - Obecná směrnice pro výběr, výcvik a sledování činnosti posuzovatelů - Část 1: Vybrání posuzovatelé*. Praha: Český normalizační institut, 2002, 23 s.
- [305] ČSN ISO 8586-2:2008. *Senzorická analýza - Obecná směrnice pro výběr, výcvik a sledování činnosti posuzovatelů - Část 2: Odborní senzoričtí posuzovatelé*. Praha: Český normalizační institut, 2008, 8 s.
- [306] ČSN ISO 3972. *Senzorická analýza - Metodologie - Metoda zkoumání citlivosti chuti*. Praha: Český normalizační institut, 2001, 9 s.
- [307] ČSN 8589. *Senzorická analýza - Obecné pokyny pro uspořádání senzorického pracoviště*. Praha: Český normalizační institut, 2008, 19 s.
- [308] ČSN ISO 8587. *Senzorická analýza - Metodologie - Pořadová zkouška*. Praha: Český normalizační institut, 2008, 22 s.
- [309] ČSN EN ISO 13 299. *Senzorická analýza - Metodologie - Všeobecné pokyny pro vytvoření senzorického profilu*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010, 27 s.
- [310] ČSN ISO 4121. *Senzorická analýza - Obecné pokyny pro použití kvantitativních odpovědních stupnic*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2009, 13 s.
- [311] ČSN EN ISO 5495. *Senzorická analýza - Metodologie - Párová porovnávací zkouška*. Praha: Český normalizační institut, 2008, 24 s.
- [312] CHANG, C. C., H. Y. LIN, C. Y. CHANG a Y. C. LIU. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering*. 2006, **77**(3), pp. 478-485.
- [313] SEMENOV, G. V., I. S. KRASNOVA, O. A. SUVOROV, I. D. SHUVALOVA a N. D. POSOKHOV. Influence of freezing and drying on phytochemical properties of various fruit. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 2015, **12**(2), pp. 1311-1320.
- [314] SHOFIAN, N. M., A. A. HAMID, A. OSMAN, N. SAARI, F. ANWAR, M. S. PAK DEK a M. R. HAIRUDDIN. Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011, **12**(7), pp. 4678-4692.
- [315] KOUŘIMSKÁ, L., K. EŠLEROVÁ a Y. KHATRI. The effect of storage on quality of herbs genus *Origanum*. *Potravinářstvo*. 2016, **10**(1), pp. 207-214.
- [316] ROSHANAK, S., M. RAHIMMALEK a S. A. GOLI. Evaluation of seven different drying treatments in respect to total flavonoid, phenolic, vitamin C content, chlorophyll,

- antioxidant activity and color of green tea (*Camellia sinensis* or *C. assamica*) leaves. *Journal of Food Science and Technology*. 2016, **53**(1), pp. 721-729.
- [317] KUMAR, S., A. YADAV, M. YADAV a J. P. YADAV. Effect of climate change on phytochemical diversity, total phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Aloe vera* (L.) Burm.f. *BMC Research Notes*. 2017, **10**(60), pp. 1-12.
- [318] SONI, U., S. BRAR a V. GAUTTAM KUMAR. Effect of seasonal variation on secondary metabolites of medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2015, **2**(1), pp. 3654-3662.
- [319] KAUR, T., R. BHAT a D. VYAS. Effect of contrasting climates on antioxidant and bioactive constituents in five medicinal herbs in Western Himalayas. *Journal of Mountain Science*. 2016, **13**(3), pp. 484-492.
- [320] LIU, W., J. LIU, D. YIN a X. ZHAO. Influence of Ecological Factors on the Production of Active Substances in the Anti-Cancer Plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S. Ying. *PlosOne*. 2015, **10**(4), pp. 1-22.
- [321] ADÁMKOVÁ, A., L. KOUŘIMSKÁ a B. KADLECOVÁ. The effect of drying on antioxidant activity of selected Lamiaceae herbs. *Potravinárstvo*. 2015, **9**(1), pp. 252-257.
- [322] DERAKHSHANI, Z., A. HASSANI, A. PIRZAD, R. ABDOLLAHI a M. DALKANI. Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity in some medicinal herbs cultivated in Iran. *Botanica Serbica*. 2012, **36**(2), pp. 117-122.
- [323] SKOTTI, E., E. ANASTASAKI, G. KANELLOU, M. POLISSIOU a P. A. TARANTILIS. Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*. 2014, **53**(1), pp. 46-54.
- [324] SYTAR, O., I. HEMMERICH, M. ZIVCAK, C. RAUCH a M. BRESTIC. Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2016, pp. In press.
- [325] MAŠKOVIĆ, P. Z., J. D. MLADENović, M. S. CVIJOVIĆ, G. AĆAMOVIĆ-DOKOVIĆ, S. R. SOLUJIĆ a M. M. RADOJKOVIĆ. Phenolic content, antioxidant and antifungal activities of acetonic, ethanolic and petroleum ether extracts of *Hypericum perforatum* L. *Hemijaska industrija*. 2011, **65**(2), pp. 159-164.
- [326] BUTOROVÁ, L. *Charakterizace plodů aronie (Aronia melanocarpa) a muchovníku (Amelanchier Alnifolia)*. Brno, 2014, 105 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [327] DO, Q. D., A. E. ANGKAWIJAYA, P. L. TRAN-NGUYEN, L. H. HUYNH, F. E. SOETAREDJO, S. ISMADJI a Y. H. JU. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2014, **22**(3), pp. 296-302.
- [328] DENT, M., V. DRAGOVIĆ-UZELAC, M. PENIĆ, M. BRNČIĆ, T. BOSILKJOV a B. LEVAJ. The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technology and Biotechnology*. 2013, **51**(1), pp. 84-91.
- [329] BUTOROVÁ, L., E. VÍTOVÁ a M. POLOVKA. Monitoring of selected parameters in *Amelanchier alnifolia* extracts by UV-VIS- NIR and EPR spectroscopy. In: *CECE 2014 11th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*. Brno: Institute of Analytical Chemistry of the CAS, 2014. p. 137-140. ISBN 978-80-904959-2- 0.
- [330] BUTOROVÁ, L., B. TOBOLKOVÁ a M. POLOVKA. Využití moderních analytických technik pro charakterizaci plodů aronie a muchovníku. In: *Aplikované přírodní vědy*. Trnava: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnavě, 2014. p. 79-84. ISBN 978-80-8105-565-2.

- [331] ŠTAVÍKOVÁ, L. *Charakterizace vlastností extraktů z hroznových bobulí pomocí moderních analytických metod*. Brno, 2010, 108 s. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [332] TAIT, M. A. a D. S. HIK. Is dimethylsulfoxide a reliable solvent for extracting chlorophyll under field conditions? *Photosynthesis Research*. 2003, **78**(1), pp. 87-91.
- [333] LAFEUILLE, J. L., S. LEFÉVRE a J. LEBUHOTEL. Quantitation of chlorophylls and 22 of their colored degradation products in culinary aromatic herbs by HPLC-DAD-MS and correlation with color changes during the dehydration process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, **62**(8), pp. 1926-1935.
- [334] MIZOBUTSIL, G. P., F. L. FINGER, R. A. RIBEIRO, R. PUSCHMANN, L. LAFETÁ DE MELO NEVES a W. FERREIRA DA MOTA. Effect of pH and temperature on peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp. *Scientia Agricola*. 2010, **67**(2), pp. 213-217.
- [335] HAQUE, M. S., M. M. ISLAM, M. D. RAKIB a A. H. HAQUE. A regulatory approach on low temperature induced enzymatic and anti oxidative status in leaf of Pui vegetable (*Basella alba*). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2014, **21**(4), pp. 366-373.
- [336] KUMAR, S. a A. K. PANDEY. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. 2013, **2013**(1), pp. 1-16.
- [337] CHEW, K. K., S. Y. NG, Y. Y. THOO, M. Z. KHOO, W. M. WAN AIDA a C. W. HO. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. *International Food Research Journal*. 2011, **18**(1), pp. 571-578.
- [338] ARGYROPOULOS, D. a J. MÜLLER. Kinetics of change in colour and rosmarinic acid equivalents during convective drying of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2014, **1**(1), pp. 15-22.
- [339] ARSLAN, D. a M. M. ÖZCAN. Evaluation of drying methods with respect to drying kinetics, mineral content and colour characteristics of rosemary leaves. *Energy Conversion and Management*. 2008, **49**(5), pp. 1258-1264.
- [340] RUBINSKIENĖ, M., P. VIŠKELIS, E. DAMBRAUSKIENĖ, J. VIŠKELIS a R. KARKLELIENĖ. Effect of drying methods on the chemical composition and color of peppermint (*Mentha x piperita* L.) leaves. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2015, **102**(2), pp. 223-228.
- [341] BOONSONG, P., N. LAOHAKUJIT, O. KERDCHOECHUEN a F. B. MATTA. Detection of Pigments and Natural Colorants from Thai Herbal Plants for Possible Use as Coloring Dyes. *HortScience*. 2011, **46**(2), pp. 265-272.
- [342] MARTINOV, M., I. O. MUJIC a J. MÜLLER. Impact of drying air temperature on course of drying and quality of *Hypericum perforatum* L. *Journal of medicinal and spice plants*. 2007, **12**(3), pp. 136-140.
- [343] ARGYROPOULOS, D. a J. MÜLLER. Effect of convective drying on quality of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Procedia Food Science*. 2011, **1**(1), pp. 1932-1939.
- [344] ARABHOSSEINI, A., S. PADHYE, W. HUISMAN, A. VAN BOXTEL a J. MÜLLER. Effect of drying on the color of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) leaves. *Food and Bioprocess Technology*. 2011, **4**(7), pp. 1281-1287.
- [345] KARAMUCKI, T., M. JAKUBOWSKA, A. RYBARCZYK, R. SZARUGA, J. GARDZIELEWSKA a W. NATALCZYK-SZYMKOWSKA. Relationship between CIE L*a*b* and CIE L*C*h scale color parameters determined when applying Illuminant C and observer 2° and illuminant D65 and observer 10° and proximate chemical composition and quality traits of porcine *Longissimus lumborum* muscle. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2006, **15**(2), pp. 129-135.

- [346] BENZIE, I. F. F. a WACHTEL-GALOR. *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2011, 500 p. ISBN-13: 978-1-4398-0713-2.
- [347] FERREIRA ZIELINSKI, A. A., C. W. I. HAMINIUK, A. ALBERTI, A. NOGUEIRA, I. M. DEMIATE a D. GRANATO. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. *Food Research International*. 2014, **60**(1), pp. 246-254.
- [348] BUTOROVÁ, L., M. POLOVKA, B. TOBOLKOVÁ a E. VÍTOVÁ. Assessment of antioxidant properties of different types of herbs by EPR and UV- VIS spectroscopy. *Czech Chemical Society Symposium Series*. 2015, **13**(2), pp. 56-58.
- [349] SIRIAMORNUN, S., O. KAISOON a N. MEESO. Changes in color, antioxidant activities and carotenoids (lycopene, b-carotene, lutein) of marigold flower (*Tagetes erecta* L.) resulting from different drying processes. *Journal of Functional Foods*. 2012, **4**(4), pp. 757-766.
- [350] RATHORE, A. a Y. T. JASRAI. Evaluating chlorophyll content in selected plants with varying photosynthetic pathways using opti-science CCM-200. *International Journal of Recent Scientific Research*. 2013, **4**(2), pp. 119-121.
- [351] APAK, R., M. ÖZYÜREK, K. GÜÇLÜ a E. ÇAPANOĞLU. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, **64**(5), pp. 997-1027.
- [352] KRISHNAN, V., S. AHMAD a M. MAHMOOD. Antioxidant Potential in Different Parts and Callus of *Gynura procumbens* and Different Parts of *Gynura bicolor*. *BioMed Research International*. 2015, **2015**(1), pp. 1-7.
- [353] KOWALCZYK, D., M. ŚWIECA, J. CICHOCKA a U. GAWLIK-DZIKI. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. *Journal of The Institute of Brewing*. 2013, **119**(3), pp. 103-110.
- [354] SULTANA, B., F. ANWAR a M. ASHRAF. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*. 2009, **14**(6), pp. 2167-2180.
- [355] KRATCHANOVA, M., P. DENEV, M. CIZ, A. LOJEK a A. MIHAILOV. Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Biochimica Polonica*. 2010, **57**(2), pp. 229-234.
- [356] KOUŘIMSKÁ, L., M. SABOLOVÁ, B. DVOŘÁKOVÁ, I. ROUBIČKOVÁ, J. PÁNEK a P. NOVÝ. Antioxidant activity of Lamiaceae herbs grown under organic and conventional farming. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 2014, **45**(1), pp. 19-25.
- [357] SRIVASTAVA, J. a S. GUPTA. Extraction, Characterization, Stability and Biological Activity of Flavonoids Isolated from Chamomile Flowers. *Molecular and Cellular Pharmacology*. 2009, **1**(3), pp. 1-15.
- [358] PATEL, V. R., P. R. PATEL a S. S. KAJAL. Antioxidant activity of some selected medicinal plants in western region of India. *Advances in Biological Research*. 2010, **4**(1), pp. 23-26.
- [359] GONCALVES, S., D. GOMES, P. COSTA a A. ROMANO. The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*. 2011, **43**(1), pp. 465-471.
- [360] NASRI, H. a M. RAFIEIAN-KOPAEI. Medicinal Plants And Antioxidants: Why They Are Not Always Beneficial? *Iran Journal of Public Health*. 2014, **43**(2), pp. 255-257.
- [361] SADOWSKA-BARTOSZ, I., A. PA CZKA, M. MOŁOŃ a G. BARTOSZ. Dimethyl sulfoxide induces oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 2013, **13**(8), pp. 820-830.

- [362] POLJSKAK, B. a P. RASPOR. The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox in vitro: a comparative study. *Journal of applied Toxicology*. 2008, **28**(2), pp. 183-188.
- [363] PROCHÁZKOVÁ, D., I. BOUŠOVÁ a N. WILHELMOVÁ. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 2011, **82**(4), pp. 513-523.
- [364] ZHENG, W. a S. WANG. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, **49**(11), pp. 5165-5170.
- [365] BAÂTOUR, O., I. TARCHOUN, N. NASRI, J. HARRATHI, E. DRAWI, MOUHIBA MOUHIBA, B. NASRI-AYACHI, B. MARZOUK a M. LACHAÂL. Effect of growth stages on phenolics content and antioxidant activities of shoots in sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) varieties under salt stress. *African Journal of Biotechnology*. 2012, **11**(99), pp. 16486-16493.
- [366] BORGES, L. L., S. F. ALVES, B. L. SAMPAIO, E. C. CONCEIÇÃO, M. T. F. BARA a J. R. PAULA. Environmental factors affecting the concentration of phenolic compounds in *Myrcia tomentosa* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2013, **23**(2), pp. 230-238.
- [367] ORPHANIDES, A., V. GOULAS a V. GEKAS. Effect of drying method on the phenolic content and antioxidant capacity of spearmint. *Czech Journal of Food Sciences*. 2013, **31**(5), pp. 509-513.
- [368] VELICKOVIĆ, J. M., D. S. DIMITRIJEVIĆ, S. S. MITIĆ, N. M. MITIĆ a D. A. KOSTIĆ. The determination of the phenolic composition, antioxidative and heavy metals in the extracts of *Calendula officinalis* L. *Advanced technologies*. 2014, **3**(2), pp. 46-51.
- [369] KOLASANI, A., H. XU a M. MILLIKAN. Determination and comparison of mineral elements in traditional Chinese herbal formulae at different decoction times used to improve kidney function-chemometric approach. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*. 2011, **8**(5), pp. 191-197.
- [370] GUMIŃSKI, C. Solubility and the periodic table of elements. *Pure and Applied Chemistry*. 2015, **87**(5), pp. 477-485.
- [371] MUSA, A. a E. O. OGBADOYI. Effect of Cold Storage on the Concentrations of some Nutrients, Anti-nutrients and Toxic Substances in the Leaves of *Vernonia amygdalina* (Bitter leaf). *Advances in Research*. 2014, **2**(1), pp. 24-39.
- [372] eAGRI. Nařízení vlády č. 75/2015 Sb., o podmínkách provádění agroenvironmentálně-klimatických opatření a o změně nařízení vlády č. 79/2007 Sb. [online]. Ministerstvo zemědělství, 2009 [cit. 2018-03-01].
Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/101894284.html>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2-D LC	Two Dimesion Liquid Chromatography
AAPH	2,2-azobis 2-amidopropan dihydrochlorid
AAS	Atomic Absorption Spectrometry
ABTS/ABTS ^{•+}	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonové kyseliny/ kation radikál 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonové kyseliny
AMVN	2,2-azobis-2,4-dimethylvaleronitril
ANOVA	Analysis of variance
ASE	Accelerated Solvent Extraction
BI	Browning index
BMPO	5-tertbutoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxid
CCC	Counter Current Chromatography
CDA	Canonical Discriminant Analysis
CE	Capillar Electrophoresis
CO	Calendula officinalis
CUPRAC	Cupric ion reducing antioxidant capacity
CZE	Capillar Zone Electrophoresis
DAD	Diode Array Detector
DEPMPO	5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxid
DMCA	Dimethylaminocinnamaldehyd
DMPD ^{•+}	N,N-dimethyl-p-fenylendiamin
DMPO	5,5,-dimethylpyrroline N-oxid
DMSO	dimethylsulfoxid
DPPH [•] /DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl/ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radikál
EAD	Electro-Array Detector
EAE	Enzyme Assisted Extraction
ECD	Electrochemical Detector
EO	Essential oil
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
ESI	Electro Spray Ionization
ETAAS	Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry
FAAS	Flame Atomic Absorption Spectrometry
FAB	Fast Atom Bombardment
FC	Folin-Ciocalteu
FD	Folin-Denis
FID	Flame Ionization Detector
FLU	Fluorescence
FRAP	Ferric reducing antioxidant potential
GAE	Gallic Acid Equivalent
GAP	Good Agricultural Practice
GC	Gas Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry

GMP	Good Manufacturing Practice
GO	Galega officinalis
HACCP	Hazard analysis and critical control points
HDD	High dynamic detection system
HILIC	Hydrophilic interaction chromatography
HO	Hyssopus officinalis
H-ORAC	Hydrophilic Oxygen radical absorbance capacity
HORAC	Hydroxyl Radical Averting Capacity
HP	Hypericum perforatum
HPE	High Pressure Extraction
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
LAKR	Léčivé aromatické a kořeninové rostliny
LA	Lavandula angustifolia
LC	Liquid Chromatography
LOD	Limits of detection
LOQ	Limits of quantification
L-ORAC	Lipophilic Oxygen radical absorbance capacity
MAE	Microwave-Assisted Extraction
MDA	Malondialdehyd
MK	Mastná kyselina
MO	Melissa officinalis
MP	Mentha piperita
MP	Mobile Phase
MS	Mass Spectrometry
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion
MUFA	Monounsaturated Fatty acids
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PBN	Fenyl-tert-butylnitron
PC	Paper Chromatography
PCA	Principal Component Analysis
PCF	Principal Component Factoring
PDA	Photodiode Array Detector
PEF	Pulse Electric Field Assisted Extraction
PFE	Pressurized Fluid Extraction
POBN	α -(4-pyridyl N-oxide)-N-tert-butylnitron
PROXYL	3-karbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-N-oxyl
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography

RS	Radicals scavenged
RSD	Relative Standard Deviation
SAFA	Saturated Fatty Acids
SAE	Sequential Alkaline Extraction
SFE	Supercritical Fluid Extraction
SM	<i>Silybum marianum</i>
SO	<i>Salvia officinalis</i>
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid Phase Microextraction
SS	<i>Salvia sclarea</i>
SWE	Subcritical Water Extraction
TAA	Total Antioxidant Activity
TAC	Total Anthocyanin Content
TBA	Thiobarbituric acid
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidiny-N-oxyl
TEMPOL	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl
TFC	Total Flavonoid Content
TLC	Thin Layer Chromatography
TPC	Total Phenolic Content
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
UAE	Ultrasound-assisted extraction
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV-VIS	UltraViolet-Visible Spectroscopy
UV-VIS-NIR	UltraViolet-Visible Near-Infrared Spectroscopy
VMAE	Vacuum Microwave-Assisted Extraction
XRF	X-Ray Fluorescence

9 SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1 Dotazník pro první blok senzorické analýzy
- Příloha 2 Dotazník pro druhý blok senzorické analýzy
- Příloha 3 Dotazník pro třetí blok senzorické analýzy
- Příloha 4 Dotazník pro čtvrtý blok senzorické analýzy
- Příloha 5 Dílčí výsledky TPC
- Příloha 6 Dílčí výsledky TFC
- Příloha 7 Naměřené barevné charakteristiky vodných extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016)
- Příloha 8 Naměřené barevné charakteristiky vodných extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016)
- Příloha 9 Naměřené barevné charakteristiky ethanolových extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016)
- Příloha 10 Naměřené barevné charakteristiky ethanolových extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016)
- Příloha 11 Naměřené barevné charakteristiky DMSO extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016)
- Příloha 12 Naměřené barevné charakteristiky DMSO extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016)
- Příloha 13 Dílčí výsledky $TEAC_{ABTS^{++}}$
- Příloha 14 Průměrné hodnoty $\cdot OH$ radikálové aktivity vyjádřené jako RS v % u vodných, ethanolových a dimethylsulfoxidových extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně a Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016)
- Příloha 15 Pearsonovy korelace celkových fenolických sloučenin (TPC), flavonoidů (TFC), radikál zhášecí-aktivity ($TEAC_{ABTS^{++}}$), $\cdot OH$ radikálové aktivity (RS%) a stanovených kovů u DMSO extraktů ze zmražených léčivých rostlin
- Příloha 16 Pearsonovy korelace celkových fenolických sloučenin (TPC), flavonoidů (TFC), radikál zhášecí-aktivity ($TEAC_{ABTS^{++}}$), $\cdot OH$ radikálové aktivity (RS%) a stanovených kovů u DMSO extraktů ze sušených léčivých rostlin
- Příloha 17 Pearsonovy korelace celkových fenolických sloučenin (TPC), flavonoidů (TFC), radikál zhášecí-aktivity ($TEAC_{ABTS^{++}}$), $\cdot OH$ radikálové aktivity (RS%) a stanovených kovů u vodných extraktů ze zmražených léčivých rostlin
- Příloha 18 Pearsonovy korelace celkových fenolických sloučenin (TPC), flavonoidů (TFC), radikál zhášecí-aktivity ($TEAC_{ABTS^{++}}$), $\cdot OH$ radikálové aktivity (RS%) a stanovených kovů u vodných extraktů ze sušených léčivých rostlin

- Příloha 19 Pearsonovy korelace celkových fenolických sloučenin (TPC), flavonoidů (TFC), radikál zhášecí-aktivity ($TEAC_{ABTS^{•+}}$), $\cdot OH$ radikálové aktivity (RS%) a stanovených kovů u ethanolových extraktů ze zmražených léčivých rostlin
- Příloha 20 Pearsonovy korelace celkových fenolických sloučenin (TPC), flavonoidů (TFC), radikál zhášecí-aktivity ($TEAC_{ABTS^{•+}}$), $\cdot OH$ radikálové aktivity (RS%) a stanovených kovů u ethanolových extraktů ze sušených léčivých rostlin
- Příloha 21 Průměrné hodnoty obsahu konkrétních fenolických sloučenin v $mg \cdot kg^{-1}$ u všech extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně (MU) a Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně (ZU) produkovaných během dvou let (2015, 2016)
- Příloha 22 Průměrné hodnoty obsahu konkrétních fenolických sloučenin v $mg \cdot kg^{-1}$ u všech extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně (MU) a Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně (ZU) produkovaných během dvou let (2015, 2016) pokračování
- Příloha 23 Průměrné hodnoty obsahu Ca, Na, K, Mg a P v $mg \cdot kg^{-1}$ u všech extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016)
- Příloha 24 Průměrné hodnoty obsahu Cu, Fe, Mn, Zn a Al v $mg \cdot kg^{-1}$ u všech extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016)
- Příloha 25 Průměrné hodnoty obsahu Ca, Na, K, Mg a P v $mg \cdot kg^{-1}$ u všech extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016)
- Příloha 26 Průměrné hodnoty obsahu Cu, Fe, Mn, Zn a Al v $mg \cdot kg^{-1}$ u všech extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016)
- Příloha 27 Publikační činnost autorky
- Příloha 28 Životopis autorky

10 PŘÍLOHY

Příloha 1: Dotazník pro první blok senzorické analýzy

DOTAZNÍK PRO SENZORICKOU ANALÝZU
bylinných nealkoholických nápojů
část první

Vážení hodnotitelé,
zhodnoťte, prosím, předložené vzorky bylinných nápojů.
Děkujeme vám za spolupráci a přejeme dobrou chuť.

Hodnotitel:

Datum:

Čas:

Kouříte?

1. Znáte/konzumujete bylinné nealkoholické nápoje ? ano/ne

Jaké ?

2. Pokud ano, vaše stanovisko před ochutnáváním?

- a) bylinné nápoje mám velmi rád/a
- b) bylinné nápoje nemám příliš rád/a
- c) bylinné nápoje nemám vůbec rád/a

3. Pořadový test

Seřaďte vzorky od nejchutnějšího k nejméně přijatelnému. Zkuste poznat bylinnou příchut' předložených nápojů.

Řada A

Pořadí číslo	Kód vzorku	Poznámka
1.		nejlepší
2.		
3.		nejhorší

Identifikace příchutě

--

Příloha 2: Dotazník pro druhý blok senzorické analýzy

**DOTAZNÍK PRO SENZORICKOU ANALÝZU
bylinných nealkoholických nápojů
část druhá**

Vážení hodnotitelé,
zhodnoťte, prosím, předložené vzorky bylinných nápojů.
Děkujeme vám za spolupráci a přejeme dobrou chuť.

Hodnotitel:

Datum:

Čas:

1. Pořadový test (bylinné nápoje)

Seřaďte vzorky bylinných nápojů podle chutnosti/celkové přijatelnosti od nejchutnějšího po nejméně chutný.

Pořadí číslo	Kód vzorku	Poznámka
1.		nejlepší
2.		
3.		
4.		nejhorší

2. Hodnocení podle stupnice (bylinné nápoje)

Zhodnoťte předložené vzorky bylinných nápojů v následujících znacích (vzhled a barva, vůně, chuť, celková přijatelnost). Své hodnocení zapište do přiložené tabulky.

Kód vzorku	Vzhled a barva	Vůně	Chuť (<i>flavour</i>)	Celková přijatelnost
X47				
Z81				
W65				
Y39				

Použijte hedonickou stupnici:

- 1 – nepřijatelná
- 2 – nevyhovující
- 3 – méně dobrá
- 4 – dobrá
- 5 – velmi dobrá
- 6 – výborná
- 7 – vynikající

Definice stupně vynikající:

Vzhled a barva – zcela čirý, jiskrný, barva světle žlutá, jemná, charakteristická pro bylinný nápoj

Vůně – příjemná, bylinná

Chuť (*flavour*) – příjemná, bylinná, sladkokyselá, aromatická, osvěžující

Celková přijatelnost – berte v úvahu všechny zmíněné sensorické vlastnosti s hlavním důrazem na chuť

3. Profilový test (bylinné nápoje)

Pokuste se vyjádřit intenzitu vybraných deskriptorů **chuti** bylinných nápojů, posuďte, do jaké míry uvedené dílčí charakteristické chutě vytvářejí celkový dojem chuti. Pokuste se identifikovat bylinnou příchut'.

V kategorii „jiná“ uveďte jakoukoli další chuť, která Vám připadá výrazná v daném vzorku (pokud vnímáte, pokuste se popsat jaká).

Použijte intenzitní stupnici

1. Neznatelná
2. Velmi slabá
3. Slabá
4. Střední
5. Silnější
6. Dosti silná
7. Velmi silná

Kód vzorku

--	--	--

Sladká	1	2	3	4	5	6	7	
Kyselá	1	2	3	4	5	6	7	
Bylinná (uveďte jaká)	1	2	3	4	5	6	7
Trpká	1	2	3	4	5	6	7	
Jiná (uveďte jaká)	1	2	3	4	5	6	7

4. Hodnocení podle stupnice (bylinné sirupy)

Zhodnoťte předložené vzorky bylinných sirupů v následujících znacích (vzhled a barva, vůně, chuť, textura, celková přijatelnost). Své hodnocení zapište do přiložené tabulky.

Použijte hedonickou stupnici:

- 1 – nepřijatelná
- 2 – nevyhovující
- 3 – méně dobrá
- 4 – dobrá
- 5 – velmi dobrá
- 6 – výborná
- 7 – vynikající

Kód vzorku	Vzhled a barva	Vůně	Chuť (<i>flavour</i>)	Textura	Celková přijatelnost
M12					
O98					
P49					
N56					

Definice stupně vynikající:

Vzhled a barva – zcela čirý, tekutý, barva hnědá/žlutá/medová (dle typu)

Vůně – příjemná, výrazně bylinná

Chuť (*flavour*) – příjemná, výrazně bylinná, aromatická, sladká, kyselková

Textura – medovitá konzistence s jemnými bublinkami, téměř tekutá, jemná homogenní struktura

Celková přijatelnost – berte v úvahu všechny zmíněné senzorycké vlastnosti s hlavním důrazem na chuť

5. Profilový test (bylinné sirupy)

Pokuste se vyjádřit intenzitu vybraných deskriptorů **vůně** bylinných sirupů, posuďte, do jaké míry uvedené dílčí charakteristické vůně vytvářejí celkový dojem vůně.

V kategorii „jiná“ uveďte jakoukoli další vůni, která Vám připadá výrazná v daném vzorku (pokud vnímáte, pokuste se popsat jaká).

Použijte intenzitní stupnici

1. Neznatelná
2. Velmi slabá
3. Slabá
4. Střední
5. Silnější
6. Dosti silná
7. Velmi silná

Kód vzorku

--	--	--

Bylinná (uved'te jaká) 1 2 3 4 5 6 7

Lihová 1 2 3 4 5 6 7

Jiná (uved'te jaká) 1 2 3 4 5 6 7

6. Profilový test (bylinné sirupy)

Pokuste se vyjádřit intenzitu vybraných deskriptorů **chuti** bylinných sirupů, posuďte, do jaké míry uvedené dílčí charakteristické chutě vytvářejí celkový dojem chuti. Pokuste se identifikovat bylinnou příchuť.

V kategorii „jiná“ uveďte jakoukoli další chuť, která Vám připadá výrazná v daném vzorku (pokud vnímáte, pokuste se popsat jaká).

Použijte intenzitní stupnici

1. Neznatelná
2. Velmi slabá
3. Slabá
4. Střední
5. Silnější
6. Dosti silná
7. Velmi silná

Kód vzorku

--	--	--

Sladká 1 2 3 4 5 6 7

Kyselá 1 2 3 4 5 6 7

Bylinná (uved'te jaká) 1 2 3 4 5 6 7

Lihová (alkoholová) 1 2 3 4 5 6 7

Jiná (uved'te jaká) 1 2 3 4 5 6 7

Příloha 3: Dotazník pro třetí blok senzorické analýzy

DOTAZNÍK PRO SENZORICKOU ANALÝZU
bylinných nealkoholických nápojů
část třetí

Vážení hodnotitelé,
zhodnoťte, prosím, předložené vzorky bylinných nápojů.
Děkujeme vám za spolupráci a přejeme dobrou chuť.

Hodnotitel:

Datum:

Čas:

1. Pořadový test šalvějovo-mátový nápoj

Seřaďte vzorky bylinných nápojů podle chutnosti/celkové přijatelnosti od nejchutnějšího po nejméně chutný.

Pořadí číslo	Kód vzorku	Poznámka
1.		nejlepší
2.		
3.		nejhorší

Příloha 4: Dotazník pro čtvrtý blok senzorické analýzy

DOTAZNÍK PRO SENZORICKOU ANALÝZU
bylinných nealkoholických nápojů
část čtvrtá

Vážení hodnotitelé,
zhodnoťte, prosím, předložené vzorky bylinných nápojů.
Děkujeme vám za spolupráci a přejeme dobrou chuť.

Hodnotitel:

Datum:

Čas:

1. Pořadový test dvoudruhových bylinných nápojů

Seřaďte vzorky bylinných nápojů podle chutnosti/celkové přijatelnosti od nejchutnějšího po nejméně chutný.

Pořadí číslo	Kód vzorku	Poznámka
1.		nejlepší
2.		
3.		nejhorší

2. Párový porovnávací test dvoudruhových bylinných nápojů podle barvy

Vyberte (podtrhněte/označte) z předložených dvojic bylinných nápojů vždy ten, který Vám připadá barevně lepší/přijatelnější.

Řada E	63	18
Řada F	33	76
Řada G	58	90

3. Párový porovnávací test dvoudruhových bylinných nápojů podle chuti

Vyberte (podtrhněte/označte) z předložených dvojic bylinných nápojů vždy ten, který Vám připadá chuťově lepší/přijatelnější.

Řada E	63	18
Řada F	33	76
Řada G	58	90

Byli byste ochotni si koupit některý z jednodruhových nebo dvoudruhových sirupů, které jste testovali?

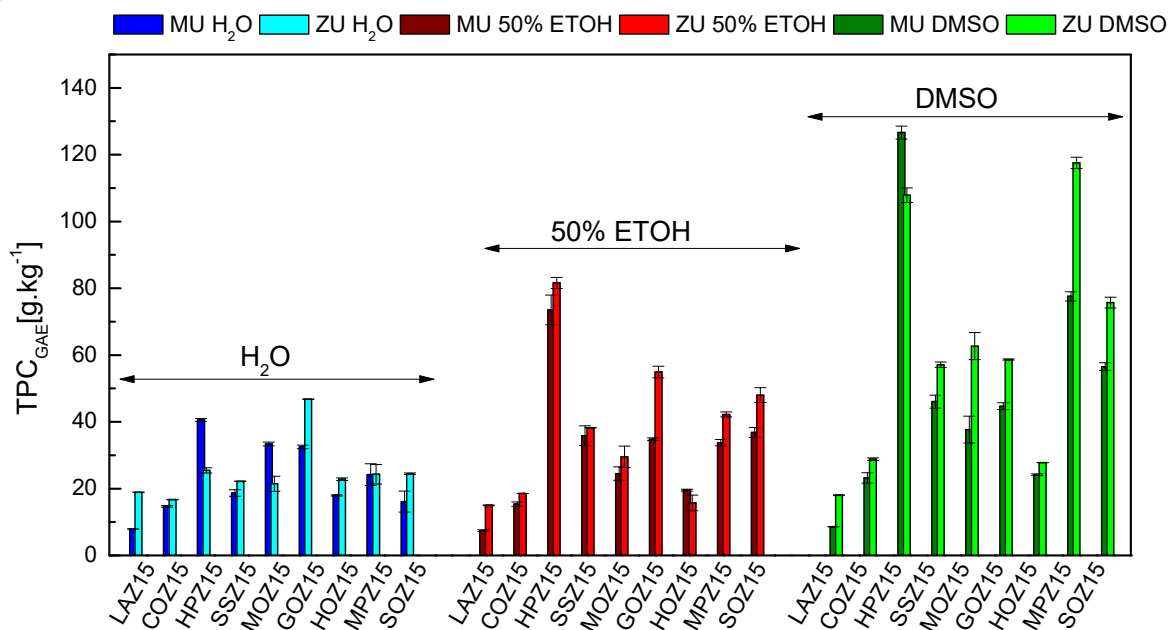
Pokud ano, za jakou cenu za 500 ml sirupu?

Pokud ano, který ze dvou-druhových sirupů byste zakoupili?

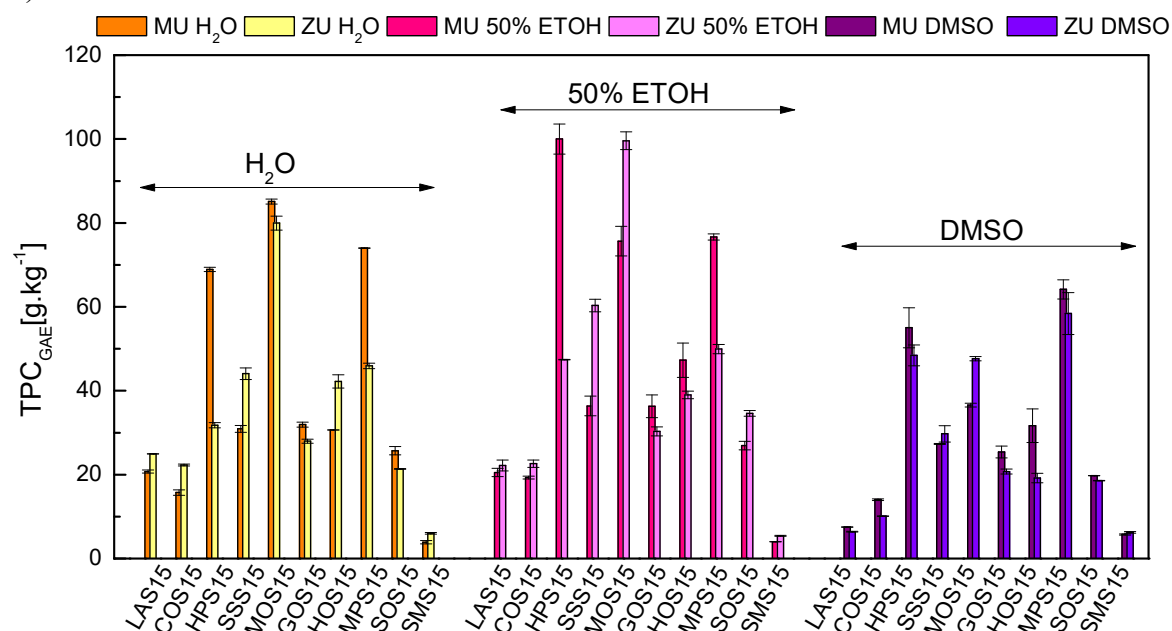
Pokud ne tak proč?

Příloha 5: Dílčí výsledky TPC – Celkový obsah fenolických sloučenin (TPC) v různých extraktech (H_2O , 50% ETOH, DMSO) připravených a) ze zmražených a b) sušených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit (MU, ZU) a produkovaných v roce 2015. Označení vzorků: LA – levandule lékařská, CO – měsíček lékařský, HP – třezalka tečkovaná, SS – šalvěj muškátová, MO – meduňka lékařská, GO – jestřabina lékařská, HO – yzop lékařský, MP – máta peprná, SO – šalvěj lékařská, SM – ostropestřec mariánský; Z – zmražené, S – sušené, 15 – rok 2015

a)

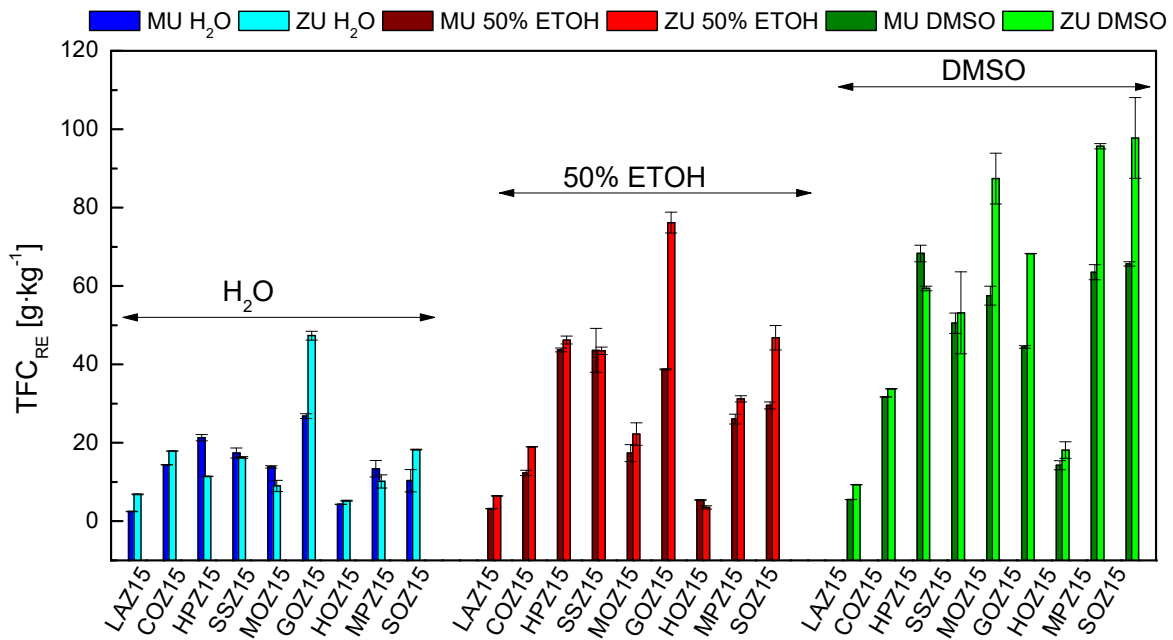


b)

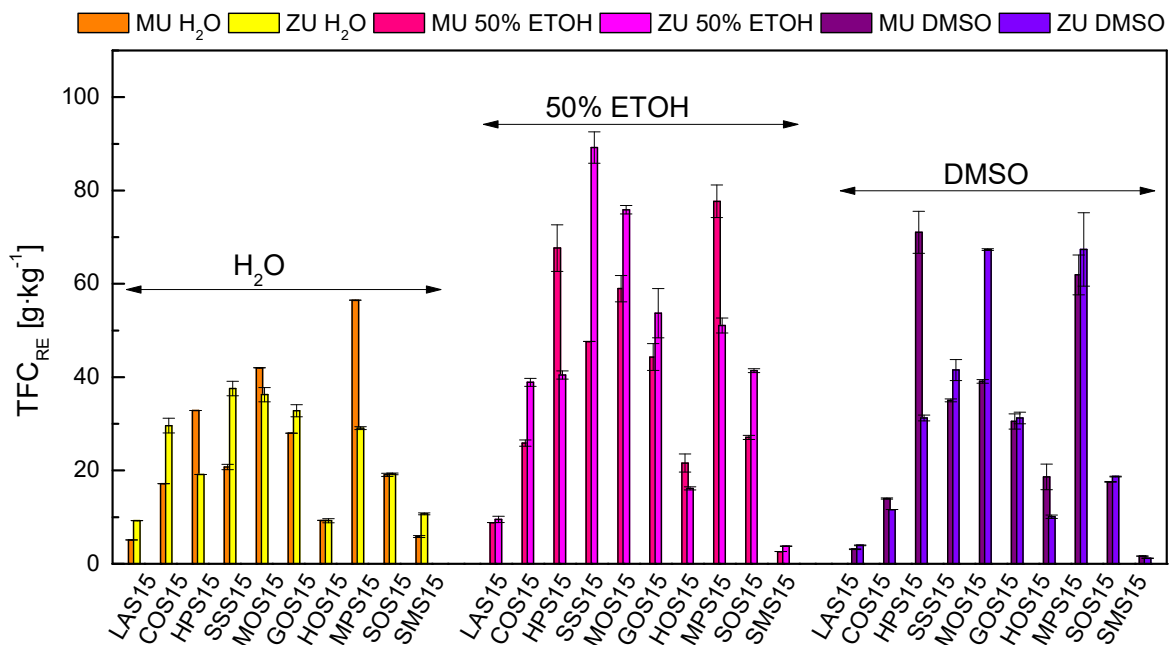


Příloha 6: Dílčí výsledky TFC – Celkový obsah flavonoidů (TFC) v různých extraktech (H_2O , 50% ETOH, DMSO) připravených a) ze zmražených a b) sušených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit (MU, ZU) a produkovaných v roce 2015. Označení vzorků: LA – levandule lékařská, CO – měsíček lékařský, HP – třezalka tečkovaná, SS – šalvěj muškátová, MO – meduňka lékařská, GO – jestřabina lékařská, HO – yzop lékařský, MP – máta peprná, SO – šalvěj lékařská, SM – ostropestřec mariánský; Z – zmražené, S – sušené, 15 – rok 2015

a)



b)



Příloha 7: Naměřené barevné charakteristiky vodných extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

ID	L*	a*	b*	C*	h°	BI
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně – zmražené 2015</i>						
LAMZ15	99,48 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,80 ± 0,01	0,81 ± 0,01	81,81 ± 0,62	0,87 ± 0,01
COMZ15	98,21 ± 0,37	0,20 ± 0,00	1,53 ± 0,00	1,54 ± 0,01	83,03 ± 0,30	1,67 ± 0,02
HPMZ15	99,38 ± 0,05	-0,17 ± 0,00	0,72 ± 0,02	0,74 ± 0,06	103,05 ± 0,84	0,58 ± 0,01
SSMZ15	98,60 ± 0,07	0,06 ± 0,00	0,60 ± 0,03	0,60 ± 0,03	84,75 ± 0,32	0,64 ± 0,03
MOMZ15	99,07 ± 0,04	0,14 ± 0,00	2,64 ± 0,02	2,65 ± 0,01	87,16 ± 0,42	2,74 ± 0,01
GOMZ15	99,15 ± 0,13	0,04 ± 0,00	0,63 ± 0,00	0,63 ± 0,05	86,29 ± 0,41	0,65 ± 0,00
HOMZ15	98,82 ± 0,12	0,11 ± 0,00	1,13 ± 0,00	1,14 ± 0,01	84,46 ± 1,08	1,20 ± 0,02
MPMZ15	98,25 ± 0,04	-0,11 ± 0,00	2,53 ± 0,00	2,54 ± 0,00	92,44 ± 0,22	2,47 ± 0,00
SOMZ15	98,97 ± 0,10	0,01 ± 0,00	0,72 ± 0,00	0,72 ± 0,04	87,37 ± 3,28	0,72 ± 0,00
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně – zmražené 2016</i>						
LAMZ16	99,13 ± 0,03	0,16 ± 0,00	0,89 ± 0,00	0,91 ± 0,03	79,77 ± 0,71	1,00 ± 0,04
COMZ16	98,23 ± 0,10	0,61 ± 0,00	1,81 ± 0,02	1,93 ± 0,02	70,53 ± 4,33	2,27 ± 0,07
HPMZ16	98,86 ± 0,06	0,09 ± 0,00	1,27 ± 0,00	1,28 ± 0,01	86,16 ± 4,18	1,33 ± 0,13
SSMZ16	99,48 ± 0,06	-0,02 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,03	90,57 ± 1,14	0,97 ± 0,02
MOMZ16	99,10 ± 0,04	-0,03 ± 0,00	1,62 ± 0,02	1,62 ± 0,01	90,73 ± 0,60	1,59 ± 0,02
GOMZ16	99,40 ± 0,03	-0,12 ± 0,00	0,84 ± 0,03	0,85 ± 0,00	97,82 ± 0,37	0,75 ± 0,02
HOMZ16	99,04 ± 0,07	0,22 ± 0,00	1,35 ± 0,04	1,37 ± 0,04	80,66 ± 0,58	1,50 ± 0,04
MPMZ16	98,92 ± 0,04	0,10 ± 0,00	1,36 ± 0,05	1,36 ± 0,05	85,86 ± 0,27	1,42 ± 0,06
SOMZ16	98,73 ± 0,06	0,07 ± 0,00	1,35 ± 0,04	1,35 ± 0,04	87,03 ± 0,14	1,40 ± 0,04
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně – sušené 2015</i>						
LAMS15	99,04 ± 0,07	0,06 ± 0,00	1,42 ± 0,02	1,42 ± 0,02	87,74 ± 0,39	1,45 ± 0,03
COMS15	98,46 ± 0,34	-0,21 ± 0,00	2,09 ± 0,03	2,09 ± 0,04	95,72 ± 0,07	1,94 ± 0,03
HPMS15	98,38 ± 0,07	-0,19 ± 0,00	1,14 ± 0,01	1,16 ± 0,01	99,39 ± 0,30	1,00 ± 0,01
SSMS15	98,14 ± 0,09	0,03 ± 0,00	2,76 ± 0,09	2,76 ± 0,09	89,30 ± 0,09	2,81 ± 0,10
MOMS15	96,64 ± 0,02	0,25 ± 0,00	7,85 ± 0,05	7,86 ± 0,05	88,19 ± 0,06	8,46 ± 0,06
GOMS15	99,34 ± 0,06	-0,51 ± 0,00	2,20 ± 0,01	2,26 ± 0,01	103,10 ± 0,65	1,82 ± 0,03
HOMS15	98,21 ± 0,21	0,01 ± 0,00	2,83 ± 0,00	2,83 ± 0,00	88,86 ± 0,09	2,85 ± 0,05
MPMS15	97,40 ± 0,07	-0,37 ± 0,00	7,00 ± 0,06	7,01 ± 0,06	93,02 ± 0,06	7,00 ± 0,07
SOMS15	98,54 ± 0,04	-0,16 ± 0,00	2,66 ± 0,11	2,66 ± 0,11	93,45 ± 0,39	2,55 ± 0,12
SMMS15	96,36 ± 0,03	0,38 ± 0,00	3,11 ± 0,09	3,14 ± 0,09	83,09 ± 0,41	3,49 ± 0,09
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně – sušené 2016</i>						
LAMS16	99,07 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,62 ± 0,04	0,62 ± 0,02	86,19 ± 0,93	0,65 ± 0,02
COMS16	99,05 ± 0,03	-0,13 ± 0,00	0,64 ± 0,02	0,65 ± 0,03	101,54 ± 1,35	0,54 ± 0,01
HPMS16	98,66 ± 0,07	-0,19 ± 0,00	0,62 ± 0,04	0,65 ± 0,01	107,15 ± 0,42	0,48 ± 0,00
SSMS16	98,82 ± 0,02	0,01 ± 0,00	1,70 ± 0,03	1,70 ± 0,03	89,83 ± 0,41	1,70 ± 0,03
MOMS16	97,68 ± 0,04	0,23 ± 0,01	4,89 ± 0,15	4,89 ± 0,15	87,25 ± 0,13	5,18 ± 0,17
GOMS16	98,43 ± 0,03	-0,53 ± 0,00	3,31 ± 0,02	3,36 ± 0,02	99,16 ± 0,66	2,94 ± 0,03
HOMS16	98,63 ± 0,04	0,20 ± 0,00	2,70 ± 0,15	2,71 ± 0,15	85,84 ± 0,21	2,85 ± 0,10
MPMS16	96,67 ± 0,12	-0,14 ± 0,00	9,01 ± 0,26	9,01 ± 0,26	89,08 ± 0,02	9,66 ± 0,30
SOMS16	98,71 ± 0,03	-0,09 ± 0,00	2,34 ± 0,01	2,34 ± 0,01	92,30 ± 0,47	2,27 ± 0,02
SMMS16	93,59 ± 0,77	0,86 ± 0,00	8,17 ± 0,06	8,21 ± 0,27	84,04 ± 0,44	9,60 ± 0,95

Příloha 8: Naměřené barevné charakteristiky vodných extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

ID	L*	a*	b*	C*	h°	BI
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně – zmražené 2015</i>						
LAZZ15	99,32 ± 0,04	0,10 ± 0,00	1,07 ± 0,01	1,08 ± 0,01	84,91 ± 0,29	1,13 ± 0,01
COZZ15	97,45 ± 0,06	0,39 ± 0,01	1,86 ± 0,03	1,80 ± 0,02	78,69 ± 2,49	2,17 ± 0,02
HPZZ15	99,07 ± 0,14	-0,35 ± 0,01	1,86 ± 0,01	1,87 ± 0,02	103,05 ± 0,84	1,60 ± 0,02
SSZZ15	99,47 ± 0,02	0,05 ± 0,00	1,24 ± 0,01	1,24 ± 0,01	87,82 ± 0,37	1,26 ± 0,01
MOZZ15	99,27 ± 0,04	0,10 ± 0,00	1,93 ± 0,01	1,93 ± 0,01	86,95 ± 0,23	1,99 ± 0,01
GOZZ15	98,88 ± 0,05	-0,04 ± 0,00	0,63 ± 0,01	0,63 ± 0,01	93,90 ± 1,08	0,59 ± 0,00
HOZZ15	98,68 ± 0,02	0,03 ± 0,00	1,17 ± 0,04	1,17 ± 0,04	88,65 ± 0,42	1,18 ± 0,04
MPZZ15	98,55 ± 0,02	-0,05 ± 0,00	0,96 ± 0,01	0,96 ± 0,01	92,99 ± 0,32	0,92 ± 0,00
SOZZ15	98,57 ± 0,02	-0,12 ± 0,00	1,50 ± 0,00	1,50 ± 0,03	94,53 ± 1,02	1,41 ± 0,00
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně – zmražené 2016</i>						
LAZZ16	99,00 ± 0,02	0,06 ± 0,00	1,48 ± 0,03	1,48 ± 0,03	87,82 ± 0,48	1,51 ± 0,04
COZZ16	98,18 ± 0,05	0,29 ± 0,00	2,69 ± 0,01	2,71 ± 0,01	83,92 ± 0,65	2,93 ± 0,02
HPZZ16	99,07 ± 0,02	-0,10 ± 0,00	1,62 ± 0,02	1,62 ± 0,02	93,49 ± 1,17	1,54 ± 0,02
SSZZ16	98,98 ± 0,04	0,07 ± 0,00	1,11 ± 0,01	1,11 ± 0,01	86,41 ± 0,79	1,16 ± 0,02
MOZZ16	98,43 ± 0,04	0,20 ± 0,00	2,71 ± 0,01	2,71 ± 0,01	85,72 ± 0,45	2,87 ± 0,02
GOZZ16	99,04 ± 0,02	1,04 ± 0,02	1,04 ± 0,02	1,04 ± 0,02	90,03 ± 0,77	1,80 ± 0,01
HOZZ16	98,92 ± 0,06	0,07 ± 0,00	1,33 ± 0,01	1,33 ± 0,02	87,10 ± 0,56	1,37 ± 0,01
MPZZ16	98,92 ± 0,01	-0,01 ± 0,00	1,60 ± 0,03	1,60 ± 0,02	90,32 ± 0,17	1,58 ± 0,02
SOZZ16	98,88 ± 0,06	-0,03 ± 0,00	1,50 ± 0,02	1,50 ± 0,02	91,09 ± 0,35	1,47 ± 0,01
LAZZ16	99,00 ± 0,02	0,06 ± 0,00	1,48 ± 0,03	1,48 ± 0,01	87,82 ± 0,48	1,51 ± 0,02
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně – sušené 2015</i>						
LAZS15	98,66 ± 0,03	0,03 ± 0,00	1,89 ± 0,07	1,89 ± 0,07	88,99 ± 0,31	1,91 ± 0,02
COZS15	98,07 ± 1,14	-0,60 ± 0,00	2,35 ± 0,23	2,56 ± 0,45	104,25 ± 2,59	1,94 ± 0,02
HPZS15	98,96 ± 0,10	-0,05 ± 0,00	1,04 ± 0,04	1,04 ± 0,04	92,64 ± 0,51	1,00 ± 0,03
SSZS15	95,45 ± 0,04	0,70 ± 0,02	8,99 ± 0,11	9,01 ± 0,11	85,52 ± 0,08	10,20 ± 0,10
MOZS15	96,86 ± 0,12	0,47 ± 0,04	6,08 ± 0,34	6,10 ± 0,35	85,61 ± 0,16	6,68 ± 0,21
GOZS15	98,72 ± 0,04	-0,46 ± 0,00	2,13 ± 0,01	2,18 ± 0,01	102,11 ± 0,05	1,79 ± 0,01
HOZS15	98,62 ± 0,08	0,08 ± 0,00	1,68 ± 0,16	1,68 ± 0,15	87,26 ± 0,36	1,74 ± 0,01
MPZS15	98,20 ± 0,05	-0,21 ± 0,00	3,19 ± 0,05	3,19 ± 0,05	93,80 ± 0,06	3,06 ± 0,05
SOZS15	98,38 ± 0,02	-0,01 ± 0,00	2,47 ± 0,11	2,47 ± 0,11	90,42 ± 0,30	2,48 ± 0,01
SMZS15	95,05 ± 0,08	0,76 ± 0,01	6,13 ± 0,06	6,17 ± 0,06	82,90 ± 0,07	7,09 ± 0,07
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně – sušené 2016</i>						
LAZS16	98,98 ± 0,08	0,02 ± 0,00	1,31 ± 0,03	1,31 ± 0,03	88,96 ± 0,82	1,32 ± 0,03
COZS16	98,97 ± 0,01	-0,31 ± 0,03	1,61 ± 0,13	1,64 ± 0,13	101,08 ± 0,32	1,37 ± 0,01
HPZS16	98,66 ± 0,07	-0,26 ± 0,00	1,63 ± 0,03	1,65 ± 0,03	99,12 ± 0,12	1,43 ± 0,01
SSZS16	98,73 ± 0,06	-0,02 ± 0,00	2,65 ± 0,03	2,65 ± 0,03	90,10 ± 0,51	2,64 ± 0,03
MOZS16	98,03 ± 0,26	0,11 ± 0,00	4,43 ± 0,60	4,43 ± 0,60	88,60 ± 0,26	4,59 ± 0,01
GOZS16	98,99 ± 0,03	-0,46 ± 0,00	2,26 ± 0,02	2,31 ± 0,02	101,43 ± 0,31	1,92 ± 0,03
HOZS16	98,82 ± 0,05	0,05 ± 0,00	1,45 ± 0,05	1,45 ± 0,05	88,04 ± 0,47	1,48 ± 0,05
MPZS16	97,29 ± 0,24	0,10 ± 0,00	6,21 ± 0,67	6,21 ± 0,67	89,12 ± 0,09	6,51 ± 0,05
SOZS16	98,52 ± 0,04	-0,40 ± 0,02	3,03 ± 0,08	3,05 ± 0,08	97,48 ± 0,21	2,75 ± 0,01
SMZS16	94,46 ± 0,20	0,72 ± 0,03	6,29 ± 0,16	6,33 ± 0,16	83,47 ± 0,14	7,28 ± 0,21

Příloha 9: Naměřené barevné charakteristiky ethanolových extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

ID	L*	a*	b*	C*	h°	BI
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně – zmražené 2015</i>						
LAMZ15	99,48 ± 0,09	-0,03 ± 0,00	0,34 ± 0,00	0,34 ± 0,00	94,79 ± 2,51	0,32 ± 0,00
COMZ15	99,06 ± 0,11	-0,43 ± 0,00	1,19 ± 0,02	1,27 ± 0,01	109,85 ± 1,22	0,87 ± 0,01
HPMZ15	98,88 ± 0,05	0,04 ± 0,00	0,97 ± 0,01	0,97 ± 0,00	87,44 ± 5,60	0,99 ± 0,01
SSMZ15	99,42 ± 0,01	-0,51 ± 0,00	1,43 ± 0,00	1,51 ± 0,00	109,52 ± 0,42	1,04 ± 0,02
MOMZ15	99,38 ± 0,07	-0,27 ± 0,00	1,42 ± 0,02	1,44 ± 0,01	100,67 ± 1,00	1,21 ± 0,03
GOMZ15	99,63 ± 0,03	-0,42 ± 0,00	0,94 ± 0,00	1,02 ± 0,01	113,84 ± 1,21	0,62 ± 0,00
HOMZ15	99,23 ± 0,04	-0,23 ± 0,00	1,46 ± 0,03	1,48 ± 0,01	99,06 ± 0,42	1,28 ± 0,03
MPMZ15	98,94 ± 0,03	-0,56 ± 0,00	2,58 ± 0,02	2,64 ± 0,02	102,18 ± 0,27	2,17 ± 0,03
SOMZ15	99,12 ± 0,07	-0,36 ± 0,00	1,40 ± 0,02	1,45 ± 0,01	104,39 ± 0,54	1,13 ± 0,04
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně – zmražené 2016</i>						
LAMZ16	99,17 ± 0,03	-0,07 ± 0,00	0,75 ± 0,01	0,75 ± 0,01	84,94 ± 0,18	0,79 ± 0,01
COMZ16	99,11 ± 0,18	-0,13 ± 0,00	1,86 ± 0,03	1,86 ± 0,03	94,03 ± 0,28	1,75 ± 0,03
HPMZ16	98,59 ± 0,17	0,24 ± 0,00	1,01 ± 0,06	1,04 ± 0,04	76,15 ± 2,02	1,19 ± 0,01
SSMZ16	99,14 ± 0,05	-0,25 ± 0,00	0,93 ± 0,01	0,96 ± 0,02	104,88 ± 1,12	0,74 ± 0,01
MOMZ16	98,90 ± 0,05	-0,28 ± 0,00	1,38 ± 0,05	1,41 ± 0,05	101,32 ± 0,38	1,18 ± 0,02
GOMZ16	98,95 ± 0,03	-0,49 ± 0,01	1,16 ± 0,01	1,26 ± 0,01	112,71 ± 1,26	0,80 ± 0,00
HOMZ16	99,30 ± 0,05	0,02 ± 0,00	0,73 ± 0,01	0,73 ± 0,01	88,41 ± 0,64	0,74 ± 0,00
MPMZ16	99,24 ± 0,02	-0,29 ± 0,00	1,59 ± 0,02	1,62 ± 0,02	100,22 ± 0,90	1,37 ± 0,03
SOMZ16	99,23 ± 0,01	-0,42 ± 0,00	1,68 ± 0,02	1,74 ± 0,01	104,11 ± 0,18	1,36 ± 0,04
LAMZ16	99,17 ± 0,03	0,07 ± 0,00	0,74 ± 0,01	0,75 ± 0,01	84,94 ± 0,18	0,79 ± 0,00
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně – sušené 2015</i>						
LAMS15	98,92 ± 0,06	0,03 ± 0,00	0,70 ± 0,01	0,70 ± 0,00	87,28 ± 0,48	0,72 ± 0,01
COMS15	98,91 ± 0,03	-0,39 ± 0,00	1,80 ± 0,02	1,85 ± 0,02	102,20 ± 0,15	1,51 ± 0,03
HPMS15	97,01 ± 0,30	-0,14 ± 0,00	2,79 ± 0,05	2,79 ± 0,02	93,03 ± 2,30	2,74 ± 0,03
SSMS15	98,98 ± 0,05	-0,11 ± 0,00	1,47 ± 0,03	1,48 ± 0,03	94,12 ± 1,01	1,39 ± 0,03
MOMS15	98,85 ± 0,04	-0,26 ± 0,00	1,47 ± 0,03	1,50 ± 0,03	100,02 ± 0,19	1,28 ± 0,03
GOMS15	98,56 ± 0,03	-1,05 ± 0,00	3,34 ± 0,05	3,50 ± 0,05	107,38 ± 0,27	2,59 ± 0,03
HOMS15	98,94 ± 0,03	-0,17 ± 0,00	1,21 ± 0,02	1,22 ± 0,02	97,84 ± 0,04	1,08 ± 0,02
MPMS15	98,65 ± 0,02	-0,72 ± 0,00	2,81 ± 0,01	2,90 ± 0,01	104,33 ± 0,11	2,29 ± 0,01
SOMS15	98,92 ± 0,03	-0,29 ± 0,00	1,72 ± 0,00	1,74 ± 0,00	99,44 ± 0,51	1,50 ± 0,01
SMMS15	98,56 ± 0,03	0,11 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,27 ± 0,000	65,84 ± 0,83	0,33 ± 0,03
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně – sušené 2016</i>						
LAMS16	99,17 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,16 ± 0,00	29,24 ± 5,12	0,18 ± 0,00
COMS16	99,10 ± 0,02	-0,15 ± 0,00	0,73 ± 0,04	0,74 ± 0,04	101,47 ± 0,81	0,62 ± 0,00
HPMS16	97,59 ± 0,11	0,22 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,03 ± 0,01	77,60 ± 1,00	1,18 ± 0,02
SSMS16	99,17 ± 0,08	-0,37 ± 0,02	2,08 ± 0,06	2,11 ± 0,06	100,10 ± 0,48	1,80 ± 0,04
MOMS16	99,32 ± 0,17	-0,28 ± 0,07	1,55 ± 0,40	1,58 ± 0,41	100,27 ± 0,26	1,34 ± 0,03
GOMS16	98,46 ± 0,04	-1,99 ± 0,07	5,52 ± 0,16	5,87 ± 0,17	109,83 ± 0,19	4,14 ± 0,01
HOMS16	98,63 ± 0,04	0,20 ± 0,02	2,70 ± 0,15	2,71 ± 0,15	85,84 ± 0,21	2,85 ± 0,02
MPMS16	96,67 ± 0,12	-0,14 ± 0,00	9,01 ± 0,26	9,01 ± 0,26	89,08 ± 0,02	9,66 ± 0,02
SOMS16	98,71 ± 0,03	-0,09 ± 0,02	2,34 ± 0,01	2,34 ± 0,01	92,31 ± 0,47	2,27 ± 0,02
SMMS16	99,13 ± 0,04	0,01 ± 0,00	0,40 ± 0,04	0,39 ± 0,04	89,41 ± 1,03	0,40 ± 0,00

Příloha 10: Naměřené barevné charakteristiky ethanolových extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

ID	L*	a*	b*	C*	h°	BI
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně – zmražené 2015</i>						
LAZZ15	99,35 ± 0,04	-0,06 ± 0,00	0,41 ± 0,00	0,42 ± 0,00	97,09 ± 0,02	0,37 ± 0,00
COZZ15	98,88 ± 0,03	-0,49 ± 0,00	1,40 ± 0,03	1,49 ± 0,03	109,26 ± 1,14	1,04 ± 0,01
HPZZ15	97,79 ± 0,33	0,78 ± 0,00	0,82 ± 0,00	1,21 ± 0,01	67,37 ± 1,74	1,40 ± 0,00
SSZZ15	99,14 ± 0,01	-0,11 ± 0,00	1,06 ± 0,03	1,06 ± 0,03	95,79 ± 0,19	0,97 ± 0,00
MOZZ15	99,23 ± 0,06	-0,42 ± 0,00	1,95 ± 0,03	2,00 ± 0,03	102,32 ± 0,48	1,63 ± 0,02
GOZZ15	99,58 ± 0,01	-0,46 ± 0,00	1,01 ± 0,00	1,11 ± 0,00	114,15 ± 0,31	0,67 ± 0,00
HOZZ15	99,17 ± 0,07	-0,09 ± 0,00	0,92 ± 0,00	0,92 ± 0,00	94,76 ± 2,10	0,85 ± 0,00
MPZZ15	99,10 ± 0,01	-0,32 ± 0,00	1,49 ± 0,02	1,52 ± 0,02	102,22 ± 0,41	1,24 ± 0,00
SOZZ15	99,20 ± 0,02	-0,26 ± 0,00	1,33 ± 0,01	1,35 ± 0,01	101,05 ± 0,21	1,13 ± 0,02
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně – zmražené 2016</i>						
LAZZ16	99,58 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,48 ± 0,00	0,48 ± 0,00	89,09 ± 1,13	0,49 ± 0,00
COZZ16	99,32 ± 0,02	-0,23 ± 0,00	1,12 ± 0,01	1,14 ± 0,01	101,54 ± 1,01	0,94 ± 0,00
HPZZ16	99,42 ± 0,02	-0,10 ± 0,00	0,72 ± 0,00	0,73 ± 0,00	98,07 ± 0,40	0,64 ± 0,00
SSZZ16	99,27 ± 0,05	-0,19 ± 0,00	0,74 ± 0,02	0,76 ± 0,02	104,34 ± 0,93	0,60 ± 0,00
MOZZ16	99,30 ± 0,08	0,01 ± 0,00	1,11 ± 0,01	1,11 ± 0,01	89,87 ± 0,43	1,10 ± 0,00
GOZZ16	99,63 ± 0,01	-0,09 ± 0,00	0,55 ± 0,00	0,55 ± 0,00	99,83 ± 0,58	0,47 ± 0,00
HOZZ16	99,49 ± 0,04	-0,08 ± 0,00	0,24 ± 0,00	0,26 ± 0,00	107,09 ± 2,49	0,19 ± 0,00
MPZZ16	99,46 ± 0,01	-0,21 ± 0,00	1,02 ± 0,00	1,05 ± 0,00	101,81 ± 0,57	0,86 ± 0,00
SOZZ16	99,50 ± 0,01	-0,25 ± 0,00	0,72 ± 0,00	0,76 ± 0,00	109,47 ± 0,45	0,53 ± 0,00
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně – sušené 2015</i>						
LAZS15	99,00 ± 0,06	-0,17 ± 0,00	1,00 ± 0,01	1,02 ± 0,00	99,75 ± 2,02	0,87 ± 0,00
COZS15	98,84 ± 0,02	-0,80 ± 0,00	2,53 ± 0,02	2,65 ± 0,02	107,56 ± 0,97	1,94 ± 0,01
HPZS15	97,95 ± 0,09	-0,66 ± 0,00	2,64 ± 0,01	2,72 ± 0,01	104,09 ± 0,51	2,17 ± 0,03
SSZS15	97,97 ± 0,09	-0,82 ± 0,00	4,55 ± 0,02	4,63 ± 0,02	100,19 ± 0,10	4,03 ± 0,05
MOZS15	98,94 ± 0,01	-0,69 ± 0,00	2,97 ± 0,03	3,05 ± 0,03	103,14 ± 0,10	2,47 ± 0,03
GOZS15	98,50 ± 0,03	-1,09 ± 0,00	2,86 ± 0,03	3,06 ± 0,03	110,94 ± 0,19	2,07 ± 0,03
HOZS15	98,94 ± 0,03	-0,36 ± 0,00	1,39 ± 0,01	1,44 ± 0,01	104,43 ± 0,38	1,12 ± 0,00
MPZS15	98,93 ± 0,01	-0,49 ± 0,00	1,98 ± 0,03	2,04 ± 0,03	103,93 ± 0,09	1,62 ± 0,02
SOZS15	98,83 ± 0,02	-0,65 ± 0,00	2,58 ± 0,00	2,66 ± 0,00	104,05 ± 0,09	2,11 ± 0,00
SMZS15	98,97 ± 0,04	0,03 ± 0,00	0,65 ± 0,00	0,65 ± 0,00	87,65 ± 1,15	0,67 ± 0,00
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně – sušené 2016</i>						
LAZS16	99,33 ± 0,04	-0,08 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,02	102,32 ± 2,07	0,30 ± 0,01
COZS16	99,08 ± 0,02	-0,90 ± 0,01	2,81 ± 0,02	2,95 ± 0,02	107,77 ± 0,14	2,14 ± 0,01
HPZS16	97,37 ± 0,30	-0,13 ± 0,08	1,95 ± 0,10	1,96 ± 0,11	91,92 ± 4,43	1,88 ± 0,01
SSZS16	99,21 ± 0,02	-0,62 ± 0,03	2,24 ± 0,09	2,32 ± 0,10	105,38 ± 0,12	1,78 ± 0,01
MOZS16	99,31 ± 0,04	-0,41 ± 0,01	2,02 ± 0,03	2,07 ± 0,03	101,55 ± 0,16	1,71 ± 0,02
GOZS16	99,31 ± 0,01	-0,74 ± 0,02	2,06 ± 0,08	2,19 ± 0,08	109,71 ± 0,12	1,51 ± 0,01
HOZS16	99,03 ± 0,03	-0,11 ± 0,02	1,91 ± 0,04	1,91 ± 0,04	93,21 ± 0,66	1,82 ± 0,05
MPZS16	98,69 ± 0,06	-1,02 ± 0,02	4,24 ± 0,12	4,36 ± 0,12	103,55 ± 0,08	3,53 ± 0,02
SOZS16	98,86 ± 0,02	-0,55 ± 0,03	3,17 ± 0,08	3,21 ± 0,08	99,90 ± 0,24	2,77 ± 0,02
SMZS16	98,93 ± 0,09	0,03 ± 0,00	0,36 ± 0,00	0,34 ± 0,03	87,38 ± 2,96	0,38 ± 0,00

Příloha 11: Naměřené barevné charakteristiky DMSO extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

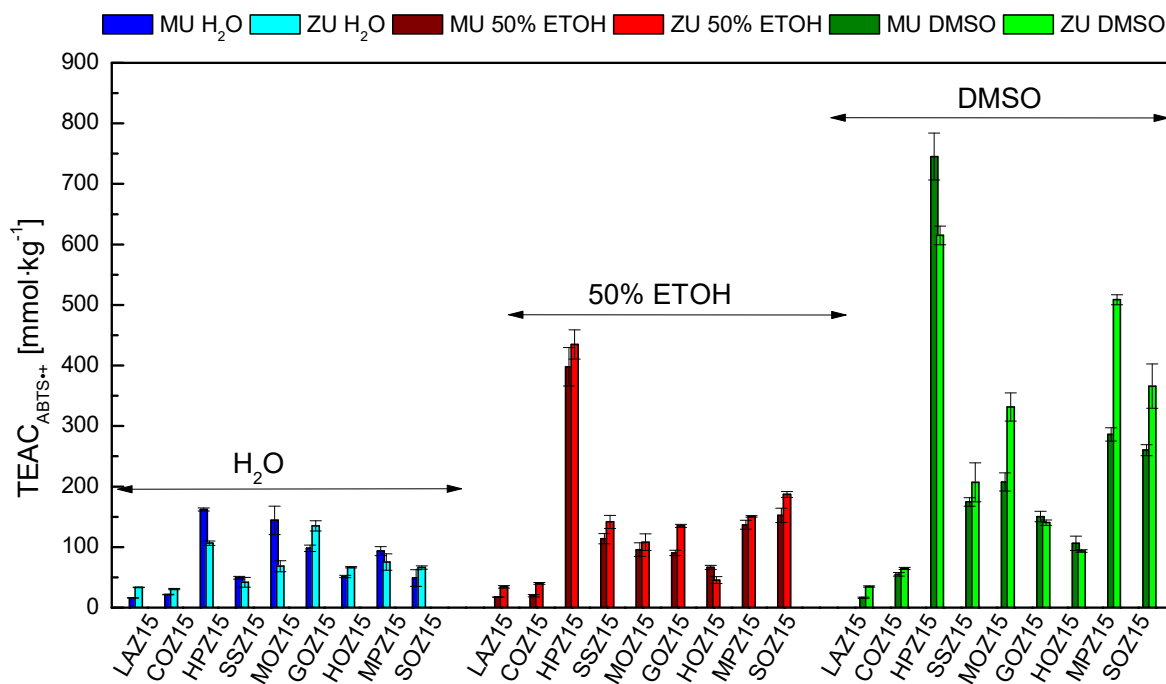
ID	L*	a*	b*	C*	h°	BI
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně – zmražené 2015</i>						
LAMZ15	99,20 ± 0,08	-1,30 ± 0,00	3,36 ± 0,02	3,60 ± 0,02	110,92 ± 0,63	2,41 ± 0,02
COMZ15	97,62 ± 0,32	1,15 ± 0,00	11,17 ± 0,50	11,23 ± 0,55	84,26 ± 1,01	12,76 ± 2,56
HPMZ15	97,06 ± 0,24	-1,62 ± 0,00	5,19 ± 0,12	5,44 ± 0,13	107,35 ± 0,79	4,14 ± 0,19
SSMZ15	98,73 ± 0,03	-1,35 ± 0,00	4,18 ± 0,10	4,39 ± 0,10	107,90 ± 0,06	3,22 ± 0,21
MOMZ15	97,00 ± 0,18	-5,81 ± 0,02	16,96 ± 0,40	17,93 ± 0,40	108,90 ± 0,14	14,19 ± 0,75
GOMZ15	98,93 ± 0,35	-1,63 ± 0,01	4,06 ± 0,06	4,38 ± 0,07	111,05 ± 2,47	2,90 ± 1,18
HOMZ15	99,34 ± 0,09	-1,34 ± 0,01	3,61 ± 0,11	3,85 ± 0,11	110,28 ± 0,42	2,63 ± 0,42
MPMZ15	98,63 ± 0,05	-3,03 ± 0,02	8,46 ± 0,11	3,85 ± 0,11	109,69 ± 0,03	6,48 ± 0,31
SOMZ15	97,89 ± 0,03	-4,29 ± 0,02	11,54 ± 0,04	12,31 ± 0,04	110,40 ± 0,11	8,95 ± 0,04
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně – zmražené 2016</i>						
LAMZ16	99,30 ± 0,01	-0,47 ± 0,00	1,80 ± 0,02	1,86 ± 0,02	104,80 ± 0,40	1,44 ± 0,02
COMZ16	98,17 ± 0,08	0,04 ± 0,00	8,96 ± 0,20	8,96 ± 0,20	89,72 ± 0,22	9,37 ± 0,21
HPMZ16	97,00 ± 0,02	-1,63 ± 0,02	4,31 ± 0,02	4,60 ± 0,02	110,72 ± 0,15	3,20 ± 0,01
SSMZ16	99,02 ± 0,06	-0,18 ± 0,05	1,12 ± 0,01	1,14 ± 0,01	99,01 ± 1,45	0,98 ± 0,00
MOMZ16	98,79 ± 0,05	-0,20 ± 0,02	1,54 ± 0,01	1,50 ± 0,01	97,26 ± 0,68	1,39 ± 0,01
GOMZ16	98,86 ± 0,03	-0,26 ± 0,02	0,88 ± 0,00	0,92 ± 0,00	106,59 ± 0,67	0,68 ± 0,00
HOMZ16	98,71 ± 0,08	-1,06 ± 0,01	4,16 ± 0,05	4,29 ± 0,06	104,26 ± 0,60	3,42 ± 0,06
MPMZ16	97,65 ± 0,05	-3,39 ± 0,06	10,84 ± 0,06	11,36 ± 0,08	107,39 ± 0,22	8,88 ± 0,03
SOMZ16	97,80 ± 0,03	-2,88 ± 0,03	9,01 ± 0,07	9,46 ± 0,07	107,70 ± 0,04	7,25 ± 0,10
LAMZ16	99,30 ± 0,01	-0,47 ± 0,00	1,80 ± 0,06	1,86 ± 0,06	104,80 ± 0,40	1,44 ± 0,00
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně – sušené 2015</i>						
LAMS15	98,72 ± 0,03	-0,09 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,75 ± 0,00	96,85 ± 1,93	0,68 ± 0,00
COMS15	98,60 ± 0,07	-0,71 ± 0,00	3,34 ± 0,08	3,42 ± 0,07	101,90 ± 0,78	2,84 ± 0,06
HPMS15	92,76 ± 0,45	-3,44 ± 0,05	11,08 ± 0,35	11,60 ± 0,35	107,26 ± 0,14	9,64 ± 0,25
SSMS15	98,21 ± 0,02	-1,39 ± 0,03	3,90 ± 0,06	4,19 ± 0,06	109,43 ± 0,13	2,97 ± 0,04
MOMS15	98,08 ± 0,03	-2,28 ± 0,03	5,98 ± 0,15	6,40 ± 0,16	110,90 ± 0,08	4,42 ± 0,11
GOMS15	96,80 ± 0,03	-5,20 ± 0,06	13,42 ± 0,34	14,39 ± 0,36	111,19 ± 0,12	10,51 ± 0,32
HOMS15	97,67 ± 0,17	-1,46 ± 0,01	4,95 ± 0,63	5,16 ± 0,67	106,45 ± 0,25	3,98 ± 0,10
MPMS15	97,65 ± 0,11	-3,80 ± 0,01	11,22 ± 0,58	11,85 ± 0,62	108,70 ± 0,03	9,01 ± 0,21
SOMS15	98,29 ± 0,03	-1,79 ± 0,00	5,56 ± 0,06	5,84 ± 0,07	107,83 ± 0,07	4,34 ± 0,05
SMMS15	99,13 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,58 ± 0,00	0,58 ± 0,00	88,39 ± 1,10	0,60 ± 0,00
<i>Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně – sušené 2016</i>						
LAMS16	99,60 ± 0,02	0,06 ± 0,00	0,32 ± 0,00	0,32 ± 0,00	78,50 ± 2,78	0,36 ± 0,00
COMS16	99,19 ± 0,04	-0,30 ± 0,00	3,85 ± 0,08	3,87 ± 0,11	94,47 ± 0,24	3,65 ± 0,07
HPMS16	96,37 ± 0,08	-1,54 ± 0,01	4,45 ± 0,09	4,71 ± 0,09	109,00 ± 0,95	3,45 ± 0,08
SSMS16	98,13 ± 0,06	-2,14 ± 0,02	6,04 ± 0,15	6,41 ± 0,17	109,56 ± 0,14	4,59 ± 0,11
MOMS16	97,39 ± 0,06	-4,29 ± 0,03	12,07 ± 0,18	12,96 ± 0,02	109,56 ± 0,08	9,61 ± 0,14
GOMS16	95,03 ± 0,04	-8,51 ± 0,07	25,24 ± 0,29	26,64 ± 0,30	108,64 ± 0,06	23,04 ± 0,34
HOMS16	98,75 ± 0,05	-0,82 ± 0,00	2,98 ± 0,09	3,09 ± 0,09	105,46 ± 0,39	2,39 ± 0,05
MPMS16	97,68 ± 0,04	-4,53 ± 0,08	12,36 ± 0,20	13,13 ± 0,22	110,17 ± 0,02	9,68 ± 0,18
SOMS16	98,05 ± 0,16	-2,65 ± 0,05	7,89 ± 0,05	8,32 ± 0,06	108,55 ± 0,22	6,19 ± 0,01
SMMS16	98,92 ± 0,16	-0,07 ± 0,00	0,47 ± 0,00	0,47 ± 0,00	99,03 ± 1,62	0,41 ± 0,00

Příloha 12: Naměřené barevné charakteristiky DMSO extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10

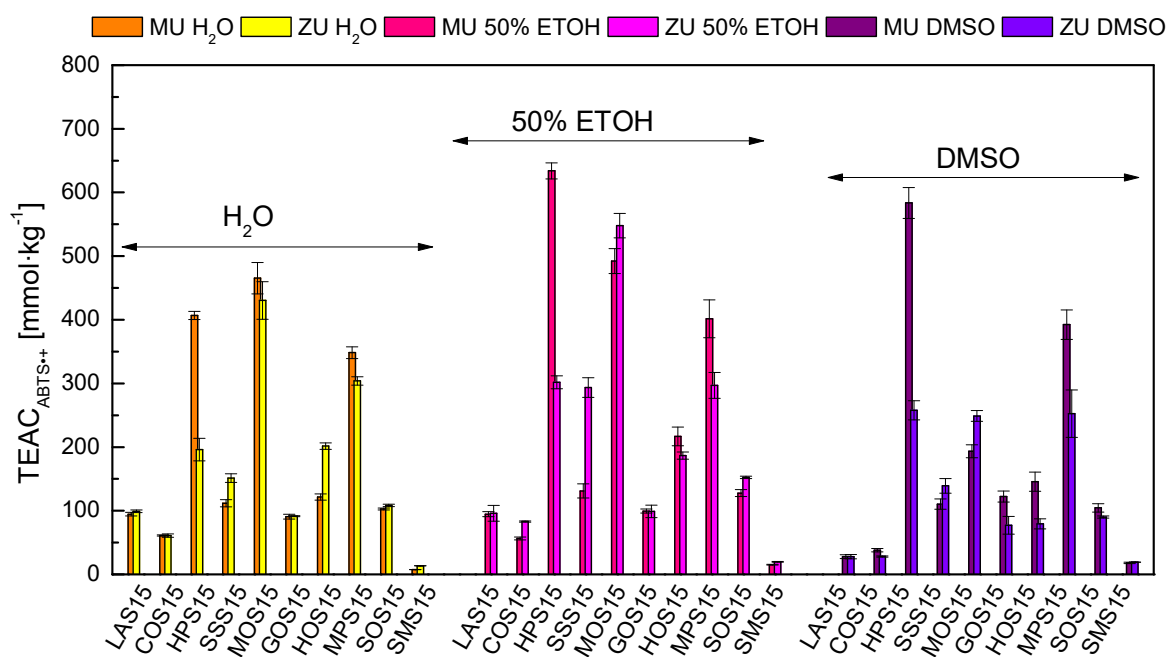
ID	L*	a*	b*	C*	h°	BI
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně – zmražené 2015</i>						
LAZZ15	99,24 ± 0,02	-0,95 ± 0,00	2,47 ± 0,01	2,65 ± 0,01	111,37 ± 0,69	1,76 ± 0,02
COZZ15	96,76 ± 0,14	2,44 ± 0,08	12,98 ± 0,11	13,21 ± 0,14	79,38 ± 0,16	15,95 ± 0,39
HPZZ15	95,72 ± 0,23	-2,37 ± 0,05	8,32 ± 0,09	8,65 ± 0,10	105,90 ± 0,23	7,04 ± 0,06
SSZZ15	98,86 ± 0,05	-1,05 ± 0,02	3,73 ± 0,11	3,88 ± 0,02	105,59 ± 0,55	2,99 ± 0,45
MOZZ15	96,77 ± 0,01	-5,70 ± 0,09	17,70 ± 0,06	18,60 ± 0,28	107,86 ± 0,03	15,21 ± 0,25
GOZZ15	99,00 ± 0,01	-0,93 ± 0,00	2,80 ± 0,01	2,95 ± 0,01	108,34 ± 0,30	2,12 ± 0,01
HOZZ15	99,30 ± 0,07	-1,51 ± 0,02	4,01 ± 0,09	4,28 ± 0,05	110,61 ± 0,30	2,91 ± 0,08
MPZZ15	97,62 ± 0,08	-4,47 ± 0,02	12,57 ± 0,05	13,35 ± 0,05	109,59 ± 0,04	10,01 ± 0,04
SOZZ15	97,76 ± 0,22	-3,90 ± 0,07	10,99 ± 0,35	11,66 ± 0,43	109,56 ± 0,05	8,66 ± 0,16
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně – zmražené 2016</i>						
LAZZ16	99,40 ± 0,06	-0,09 ± 0,00	0,67 ± 0,00	0,68 ± 0,00	97,81 ± 0,53	0,60 ± 0,00
COZZ16	99,36 ± 0,03	-0,38 ± 0,00	1,64 ± 0,09	1,68 ± 0,03	102,87 ± 0,42	1,35 ± 0,03
HPZZ16	98,74 ± 0,06	-0,44 ± 0,00	1,07 ± 0,01	1,16 ± 0,01	112,12 ± 0,21	0,75 ± 0,00
SSZZ16	99,08 ± 0,10	-1,22 ± 0,00	3,66 ± 0,04	3,86 ± 0,09	108,42 ± 0,43	2,77 ± 0,05
MOZZ16	98,21 ± 0,12	-2,91 ± 0,04	8,97 ± 0,07	9,43 ± 0,49	107,99 ± 0,05	7,14 ± 0,01
GOZZ16	99,12 ± 0,05	-1,22 ± 0,05	3,27 ± 0,11	3,49 ± 0,11	110,42 ± 1,10	2,37 ± 0,01
HOZZ16	98,51 ± 0,03	-2,01 ± 0,02	5,55 ± 0,01	5,91 ± 0,08	109,92 ± 0,05	4,16 ± 0,07
MPZZ16	97,63 ± 0,04	-4,08 ± 0,02	11,38 ± 0,06	12,09 ± 0,05	109,71 ± 0,17	8,97 ± 0,08
SOZZ16	98,28 ± 0,03	-2,78 ± 0,05	7,69 ± 0,08	8,18 ± 0,10	109,87 ± 0,05	5,86 ± 0,03
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně – sušené 2015</i>						
LAZS15	98,81 ± 0,03	-0,65 ± 0,00	2,15 ± 0,01	2,24 ± 0,02	106,91 ± 0,48	1,67 ± 0,02
COZS15	98,88 ± 0,03	-0,67 ± 0,00	3,39 ± 0,01	3,45 ± 0,07	101,17 ± 0,08	2,91 ± 0,06
HPZS15	97,41 ± 0,15	-2,07 ± 0,01	5,98 ± 0,04	6,36 ± 0,09	109,77 ± 0,04	4,62 ± 0,10
SSZS15	98,45 ± 0,06	-1,71 ± 0,02	5,03 ± 0,02	5,31 ± 0,11	108,73 ± 0,14	3,85 ± 0,12
MOZS15	97,19 ± 0,02	-4,73 ± 0,03	12,78 ± 0,02	13,63 ± 0,13	110,32 ± 0,06	10,09 ± 0,12
GOZS15	97,82 ± 0,14	-3,87 ± 0,00	10,08 ± 0,03	10,80 ± 0,28	111,01 ± 0,18	7,67 ± 0,23
HOZS15	98,38 ± 0,12	-1,45 ± 0,00	4,88 ± 0,02	5,09 ± 0,03	106,56 ± 0,46	3,88 ± 0,02
MPZS15	98,29 ± 0,10	-3,24 ± 0,01	8,60 ± 0,04	9,19 ± 0,11	110,62 ± 0,10	6,50 ± 0,21
SOZS15	98,75 ± 0,01	-1,88 ± 0,01	6,05 ± 0,01	6,33 ± 0,01	107,26 ± 0,12	4,77 ± 0,02
SMZS15	99,32 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,60 ± 0,00	0,61 ± 0,00	78,22 ± 0,74	0,68 ± 0,00
<i>Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně – sušené 2016</i>						
LAZS16	99,23 ± 0,05	-0,03 ± 0,00	0,76 ± 0,00	0,76 ± 0,00	91,84 ± 1,50	0,74 ± 0,00
COZS16	97,93 ± 0,06	-0,37 ± 0,00	10,09 ± 0,31	10,10 ± 0,31	92,07 ± 0,01	10,34 ± 0,34
HPZS16	95,73 ± 0,09	-2,55 ± 0,01	7,35 ± 0,20	7,78 ± 0,23	109,15 ± 0,51	5,82 ± 0,01
SSZS16	98,36 ± 0,10	-1,94 ± 0,02	5,85 ± 0,16	6,16 ± 0,11	108,32 ± 0,28	4,54 ± 0,20
MOZS16	97,01 ± 0,04	-4,59 ± 0,14	14,02 ± 0,46	14,76 ± 0,48	108,13 ± 0,05	11,67 ± 0,12
GOZS16	98,15 ± 0,12	-2,48 ± 0,05	6,88 ± 0,04	7,31 ± 0,11	109,83 ± 0,09	5,23 ± 0,10
HOZS16	97,98 ± 0,29	-0,91 ± 0,00	3,79 ± 0,10	3,90 ± 0,01	103,41 ± 0,56	3,18 ± 0,09
MPZS16	97,06 ± 0,20	-6,10 ± 0,49	16,47 ± 0,38	17,56 ± 0,47	110,32 ± 0,05	13,36 ± 1,29
SOZS16	98,51 ± 0,04	-2,13 ± 0,01	6,61 ± 0,02	6,94 ± 0,02	107,86 ± 0,05	5,18 ± 0,01
SMZS16	98,56 ± 0,06	-0,05 ± 0,00	0,31 ± 0,00	0,32 ± 0,00	99,81 ± 2,68	0,28 ± 0,00

Příloha 13: Dílčí výsledky $TEAC_{ABTS^{•+}}$ – Průměrné hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ ($\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) stanovené v různých extraktech (H_2O , 50% ETOH, DMSO) připravených a) ze zmražených a b) sušených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit (MU, ZU) a produkovaných v roce 2015. Označení vzorků: LA – levandule lékařská, CO – měsíček lékařský, HP – třezalka tečkovaná, SS – šalvěj muškátová, MO – meduňka lékařská, GO – jeřábina lékařská, HO – yzop lékařský, MP – máta peprná, SO – šalvěj lékařská, SM – ostropestřec mariánský; Z – zmražené, S – sušené, 15 – rok 2015

a)



b)



Příloha 14: Průměrné hodnoty $\cdot\text{OH}$ radikálové aktivity vyjádřené jako RS v % u vodných (H_2O), ethanolových (50% ETOH) a dimethylsulfoxidových (DMSO) extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně (MU) a Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně (ZU) produkovaných během dvou let (2015, 2016). Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10.

ID	H ₂ O	50% ETOH	DMSO	ID	H ₂ O	50% ETOH	DMSO
<i>MU zmražené 2015</i>				<i>ZU zmražené 2015</i>			
LAMZ15	-5,96	21,30	-6,86	LAZZ15	-7,82	-26,17	-18,22
COMZ15	9,37	-2,81	6,79	COZZ15	8,03	-16,64	4,17
HPMZ15	-19,05	44,18	-12,42	HPZZ15	-0,53	-12,29	-19,49
SSMZ15	4,85	-25,55	-10,51	SSZZ15	-11,19	-75,40	-15,52
MOMZ15	-3,66	-53,14	-7,70	MOZZ15	-11,08	-58,27	-9,80
GOMZ15	-35,61	-47,94	-5,29	GOZZ15	-37,63	-30,67	-7,54
HOMZ15	43,86	20,38	-19,52	HOZZ15	41,04	14,41	-19,53
MPMZ15	-17,52	-2,45	-43,53	MPZZ15	-50,98	-11,98	-40,16
SOMZ15	-52,20	-59,60	-23,93	SOZZ15	-56,73	-22,85	-41,08
<i>MU zmražené 2016</i>				<i>ZU zmražené 2016</i>			
LAMZ16	-20,38	-73,31	-30,07	LAZZ16	-37,81	-161,38	-84,51
COMZ16	-5,81	-68,52	-13,59	COZZ16	-19,08	-159,30	-66,81
HPMZ16	-13,02	-35,92	-32,69	HPZZ16	-18,61	-95,69	-102,90
SSMZ16	35,14	-80,37	-148,45	SSZZ16	-38,34	-86,60	-59,56
MOMZ16	-54,33	-104,34	-145,45	MOZZ16	-57,76	-152,71	-89,48
GOMZ16	-34,51	-64,93	12,94	GOZZ16	-38,16	-98,95	-44,24
HOMZ16	-13,51	-74,59	-61,63	HOZZ16	-15,71	-114,26	-65,24
MPMZ16	-54,95	-79,33	-112,23	MPZZ16	-46,28	-119,73	-102,34
SOMZ16	-37,68	-185,04	-191,74	SOZZ16	-33,34	-272,52	-116,45
<i>MU sušené 2015</i>				<i>ZU sušené 2015</i>			
LAMS15	3,80	8,69	-37,77	LAZS15	-19,00	5,02	-30,79
COMS15	52,98	27,20	-37,69	COZS15	19,79	11,35	-37,06
HPMS15	17,28	38,34	-35,34	HPZS15	-69,17	20,31	-40,95
SSMS15	-61,94	22,30	-55,89	SSZS15	-14,63	12,12	-64,80
MOMS15	48,88	25,16	-50,57	MOZS15	-5,88	15,32	-46,98
GOMS15	19,52	31,86	-22,82	GOZS15	-30,91	42,05	-18,98
HOMS15	-15,34	27,27	-50,31	HOZS15	-41,11	11,50	-50,88
MPMS15	48,51	38,36	-84,44	MPZS15	13,68	38,12	-57,36
SOMS15	-20,23	3,83	-53,76	SOZS15	-28,00	-25,03	-63,03
SMMS15	-56,75	-3,28	-14,60	SMZS15	-48,25	-15,54	-11,91
<i>MU sušené 2016</i>				<i>ZU sušené 2016</i>			
LAMS16	-77,88	-48,78	-37,23	LAZS16	-48,67	-101,60	-36,94
COMS16	-51,33	-48,31	-21,25	COZS16	-23,27	-107,37	-43,18
HPMS16	-21,55	2,49	-61,39	HPZS16	-1,44	8,64	-59,59
SSMS16	-47,91	-39,05	-78,44	SSZS16	-12,04	1,34	-65,94
MOMS16	32,32	-45,78	-72,38	MOZS16	47,69	6,12	-67,34
GOMS16	-14,49	-15,24	-32,02	GOZS16	17,49	27,44	-28,71
HOMS16	19,51	-91,83	-88,11	HOZS16	-32,46	-26,46	-59,25
MPMS16	43,96	23,53	-131,74	MPZS16	11,35	20,53	-91,72
SOMS16	10,09	-128,21	-190,04	SOZS16	23,12	-28,10	-118,30
SMMS16	-42,47	-88,68	-37,35	SMZS16	-40,57	-90,31	-46,91

Směrodatná odchylka měření byla u všech výsledků v rozmezí 2–5 %

Příloha 15: Pearsonovy korelace celkových fenolických sloučenin (TPC), flavonoidů (TFC), radikál-zhášecí aktivity ($TEAC_{ABTS^{++}}$), $\cdot OH$ radikálové aktivity (RS%) a stanovených kovů u DMSO extraktů ze zmražených léčivých rostlin

	TPC	TFC	TEAC	RS%	Al	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Zn
TPC	1													
TFC	0,8334	1												
TEAC	0,9490	0,7509	1											
RS%	0,0196	0,0265	-0,0146	1										
Al	0,0590	0,0977	-0,0112	0,3019	1									
Ca	0,2694	0,2851	0,2281	-0,0742	-0,0600	1								
Cu	0,2221	0,3476	0,1101	0,5605	0,5664	0,0565	1							
Fe	0,6538	0,4725	0,5995	0,1341	-0,0862	0,1240	0,0934	1						
K	0,0964	0,2250	0,0965	-0,0298	0,0613	0,1424	0,1316	0,1780	1					
Mg	0,6920	0,7128	0,5661	-0,0931	0,0171	0,6390	0,2304	0,2871	0,1429	1				
Mn	0,6191	0,4053	0,5299	0,1653	0,0822	0,4286	0,0700	0,6586	0,1226	0,6007	1			
Na	0,0229	0,0333	-0,0146	0,2793	0,1521	0,0278	0,4684	0,1353	0,4209	0,0306	0,0276	1		
P	0,3216	0,1548	0,2952	0,4828	0,4446	-0,1958	0,3366	0,5521	0,3380	-0,1013	0,4111	0,3575	1	
Zn	0,2299	0,2382	0,1797	0,3248	0,4426	0,0823	0,5828	0,3255	0,5381	0,1418	0,3473	0,5882	0,6342	1

Příloha 16: Pearsonovy korelace celkových fenolických sloučenin (TPC), flavonoidů (TFC), radikál-zhášecí aktivity ($TEAC_{ABTS^{•+}}$), $^{\bullet}OH$ radikálové aktivity (RS%) a stanovených kovů u DMSO extraktů ze sušených léčivých rostlin

	TPC	TFC	TEAC	RS%	Al	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Zn
TPC	1													
TFC	0,8582	1												
TEAC	0,9756	0,8229	1											
RS%	-0,2743	-0,3398	-0,3053	1										
Al	0,2770	0,3032	0,2809	-0,1281	1									
Ca	0,4960	0,6356	0,4758	-0,4553	0,4130	1								
Cu	0,0539	0,0358	-0,0328	0,1969	0,1313	0,1222	1							
Fe	0,3419	0,3929	0,2817	0,0171	0,1964	0,3232	-0,1050	1						
K	0,5033	0,6959	0,4558	-0,2649	0,1819	0,4784	-0,0139	0,5104	1					
Mg	0,5329	0,6693	0,5112	-0,4884	0,4470	0,8878	0,0987	0,4717	0,5053	1				
Mn	0,2642	0,3697	0,1921	-0,0578	0,0430	0,2988	-0,0226	0,8439	0,3796	0,4577	1			
Na	0,0196	-0,1407	-0,0222	0,3030	-0,1263	-0,1784	0,4809	-0,1245	-0,1845	-0,2208	-0,1779	1		
P	0,6554	0,5217	0,6515	0,0116	0,0728	0,1820	-0,0730	0,6163	0,4942	0,3192	0,4852	-0,1226	1	
Zn	0,2560	0,1720	0,2186	0,2897	0,0413	-0,2026	0,0242	0,6034	0,3770	-0,0568	0,5108	0,2077	0,5987	1

Příloha 17: Pearsonovy korelace celkových fenolických sloučenin (TPC), flavonoidů (TFC), radikál-zhášecí aktivity ($TEAC_{ABTS^{•+}}$), $^{\bullet}OH$ radikálové aktivity (RS%) a stanovených kovů u vodných extraktů ze zmražených léčivých rostlin

	TPC	TFC	TEAC	RS%	Al	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Zn
TPC	1													
TFC	0,7282	1												
TEAC	0,9183	0,5217	1											
RS%	-0,1384	-0,2533	-0,1872	1										
Al	0,0304	0,0082	-0,0965	0,1534	1									
Ca	0,0116	-0,1218	-0,0193	0,0664	0,6382	1								
Cu	0,0273	0,1789	-0,1675	0,1514	0,2877	0,0893	1							
Fe	0,0820	0,4438	-0,0422	-0,0298	0,1697	0,0390	0,0612	1						
K	-0,0011	0,2004	-0,1130	-0,1149	0,3937	0,2621	0,2201	0,5343	1					
Mg	0,0274	-0,1282	0,0747	-0,3447	0,5423	0,8209	-0,0133	-0,0509	0,2903	1				
Mn	0,3744	0,3988	0,2303	-0,0599	0,6054	0,4582	0,3556	0,0577	0,1774	0,4377	1			
Na	0,0265	0,1569	-0,1373	0,0910	0,4437	0,2098	0,5736	0,3911	0,5962	0,2094	0,1649	1		
P	0,4524	0,4204	0,3545	-0,0205	0,2460	0,1272	0,3925	0,2419	0,5972	0,2227	0,4966	0,5344	1	
Zn	0,0224	0,2910	-0,0289	0,0881	0,0557	-0,3541	0,3723	0,2578	0,2152	-0,3242	0,1566	0,2619	0,3371	1

Příloha 18: Pearsonovy korelace celkových fenolických sloučenin (TPC), flavonoidů (TFC), radikál-zhášecí aktivity ($TEAC_{ABTS^{•+}}$), $^{\bullet}OH$ radikálové aktivity (RS%) a stanovených kovů u vodných extraktů ze sušených léčivých rostlin

	TPC	TFC	TEAC	RS%	Al	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Zn
TPC	1													
TFC	0,8005	1												
TEAC	0,9733	0,7100	1											
RS%	0,6301	0,6668	0,5647	1										
Al	0,3046	0,2441	0,2221	0,3096	1									
Ca	0,3528	0,2833	0,2811	0,2708	0,9324	1								
Cu	-0,2029	-0,0417	-0,2214	0,1383	-0,1850	-0,1578	1							
Fe	-0,2213	0,0193	-0,2728	0,0513	-0,1091	-0,1978	0,6769	1						
K	0,2079	0,2598	0,1385	0,2977	0,2352	0,1735	0,1365	0,0141	1					
Mg	0,4301	0,3031	0,3756	0,2606	0,8007	0,7821	-0,2102	-0,1962	0,3463	1				
Mn	0,1322	0,2508	0,0513	0,1084	0,7159	0,6571	-0,1695	0,0608	0,0842	0,5614	1			
Na	-0,1595	0,0571	-0,1873	0,1728	-0,1458	-0,1114	0,5084	0,1211	0,3299	-0,1482	-0,2025	1		
P	0,2749	0,4471	0,1990	0,3906	0,0324	-0,0135	0,6257	0,4235	0,5464	0,0356	0,0448	0,3494	1	
Zn	0,1377	0,2636	0,1090	0,3113	-0,0109	-0,0642	0,5087	0,3068	0,4164	-0,0708	0,1447	0,5551	0,6955	1

Příloha 19: Pearsonovy korelace celkových fenolických sloučenin (TPC), flavonoidů (TFC), radikál-zhášecí aktivity ($TEAC_{ABTS^{++}}$), $\cdot OH$ radikálové aktivity (RS%) a stanovených kovů u ethanolových extraktů ze zmražených léčivých rostlin

	TPC	TFC	TEAC	RS%	Al	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Zn
TPC	1													
TFC	0,7994	1												
TEAC	0,9381	0,5889	1											
RS%	0,3021	0,0981	0,2237	1										
Al	0,1629	0,1789	0,0036	0,5909	1									
Ca	-0,0337	0,0977	-0,0352	-0,1553	-0,2807	1								
Cu	0,1170	0,2831	-0,0843	0,2408	0,7656	-0,2511	1							
Fe	0,1739	0,1813	0,0124	0,6157	0,9900	-0,3258	0,7778	1						
K	-0,0357	0,2630	-0,1243	-0,3920	-0,0762	0,2253	0,2549	-0,0640	1					
Mg	0,1156	0,1888	0,0958	-0,1267	-0,1346	0,7552	-0,0978	-0,1809	0,2939	1				
Mn	0,4418	0,5210	0,3352	0,1608	0,0303	0,6585	0,1096	-0,0058	0,0825	0,6385	1			
Na	0,0188	0,1389	-0,0774	-0,0646	0,0259	0,0973	0,3030	0,0674	0,5114	0,2582	0,0013	1		
P	0,0907	0,2498	0,0892	-0,4553	-0,4888	0,0288	-0,0231	-0,4778	0,3881	-0,1184	0,0867	0,1954	1	
Zn	-0,0576	0,0648	-0,0417	-0,1403	-0,2921	0,3494	-0,0680	-0,2736	-0,0057	0,1564	0,3221	-0,1147	0,1904	1

Příloha 20: Pearsonovy korelace celkových fenolických sloučenin (TPC), flavonoidů (TFC), radikál-zhášecí aktivity ($TEAC_{ABTS^{++}}$), $\cdot OH$ radikálové aktivity (RS%) a stanovených kovů u ethanolových extraktů ze sušených léčivých rostlin

	TPC	TFC	TEAC	RS%	Al	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Zn
TPC	1													
TFC	0,8516	1												
TEAC	0,9753	0,7649	1											
RS%	0,4189	0,4416	0,3822	1										
Al	0,1524	0,1142	0,1290	0,5970	1									
Ca	0,2469	0,2353	0,1556	0,0596	0,2101	1								
Cu	0,0567	0,1954	0,0039	0,2385	0,1735	-0,0781	1							
Fe	-0,0882	0,1175	-0,1741	0,3625	0,3359	-0,0970	0,4908	1						
K	0,3769	0,6289	0,2797	0,1521	0,0698	0,1412	0,5070	0,2569	1					
Mg	0,3838	0,4447	0,3011	0,1170	0,2695	0,6823	0,0204	-0,0483	0,4664	1				
Mn	0,1064	0,2514	0,0049	0,1952	0,2055	0,6442	-0,0492	0,2604	0,0709	0,5680	1			
Na	-0,2418	-0,0635	-0,2681	-0,0698	-0,0137	-0,1496	0,5953	0,2316	0,4556	-0,0454	-0,1807	1		
P	0,1971	0,3096	0,1829	0,3042	0,0369	-0,3306	0,4857	0,4737	0,4295	-0,1973	0,0360	0,4629	1	
Zn	-0,0239	0,2231	-0,0901	0,1329	-0,1249	-0,1150	0,5722	0,6303	0,4961	0,0006	0,2720	0,5633	0,8160	1

Příloha 21: Průměrné hodnoty obsahu konkrétních fenolických sloučenin v mg·kg⁻¹ u všech extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně (MU) a Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně (ZU) produkovaných během dvou let (2015, 2016). Směrodatná odchylka měření byla u všech výsledků do 5%. Zkratka: nd – nedekováno

		voda				50% ethanol				dimethylsulfoxid			
		MU		ZU		MU		ZU		MU		ZU	
sloučenina	úprava	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016
levandule lékařská													
ferulová	zmr	1 321	996	1 201	965	1 286	1 091	1 539	648	1 138	783	1 957	740
	suš	958	930	997	899	1 146	988	1 147	483	254	175	362	111
sinapová	zmr	682	179	614	257	547	191	538	242	336	171	325	195
	suš	294	167	292	172	525	173	518	188	125	43	78	62
měsíček lékařský													
catechin	zmr	nd	nd	nd	nd	263	nd	242	nd	305	nd	261	nd
	suš	nd	nd	nd	nd	265	nd	243	nd	99	nd	61	nd
chlorog.	zmr	38	nd	44	nd	89	nd	64	nd	34	nd	111	nd
	suš	1 082	598	1061	651	838	676	988	1 146	635	197	599	387
kávová	zmr	24	nd	25	nd	18	nd	46	nd	24	nd	34	nd
	suš	115	58	138	62	62	33	69	59	46	29	37	34
rutin	zmr	3 364	2 991	6 308	5 063	3 662	1 632	5 199	3 133	5 725	4 053	8 703	3 904
	suš	4 904	3 789	10 358	9 104	3 719	3 242	6 596	6 169	1 233	159	2 834	427
myricetin	zmr	3 830	3 089	12 174	9 216	5 438	1 906	11 202	4 762	8 920	1 386	13 335	6 595
	suš	4 926	2 420	14 883	9 404	4 296	714	8 840	3 680	1 595	643	4 355	1 739
třezalka tečkovaná													
chlorog.	zmr	673	113	328	127	1 056	273	921	115	1 140	320	248	102
	suš	1 343	418	521	132	1 369	413	1 270	129	1 468	621	379	330
kávová	zmr	30	nd	30	nd	27	nd	24	nd	32	nd	19	nd
	suš	67	54	82	39	72	63	71	43	41	71	46	35
rutin	zmr	2 750	974	3 118	1 723	6 019	2 826	3 563	2 542	12 637	9 252	9 283	8 514
	suš	4 545	3 290	4 358	3 357	8 780	8 562	6 103	4 772	8 872	6 614	9 160	5 041
kvercetin	zmr	nd	nd	nd	nd	1 116	841	790	750	1 738	1 038	3 705	898
	suš	1627	722	1 226	787	2 818	1 529	1 725	1 005	1 100	404	1 558	388
šalvěj muškátová													
gallová	zmr	758	663	675	475	475	337	461	332	248	115	646	269
	suš	466	72	285	30	272	202	257	150	35	33	22	33
chlorog.	zmr	nd	nd	nd	nd	75	nd	69	nd	nd	nd	nd	nd
	suš	nd	41	nd	69	397	119	137	55	143	20	136	13
kávová	zmr	42	nd	35	nd	154	74	409	119	303	100	506	315
	suš	571	531	720	200	416	213	534	518	76	50	158	75
luteolin	zmr	32	nd	103	nd	1 548	628	1 170	703	1 183	689	1 805	1 498
	suš	107	69	125	77	718	495	373	316	726	377	378	351
meduňka lékařská													
kávová	zmr	214	51	429	112	188	115	323	169	327	193	394	162
	suš	1 325	558	1057	745	396	227	399	252	88	184	71	210
p-kumar.	zmr	39	nd	34	nd	15	nd	12	nd	18	nd	21	nd
	suš	60	nd	42	nd	19	nd	20	nd	56	nd	52	nd
hesperidin	zmr	2 140	823	2 265	742	2 250	1 933	2 216	1 767	7 662	5 509	7 288	4 111
	suš	3 472	2 235	6 436	2 318	43 973	25 394	42 160	23 020	22 924	8 788	24 626	7 910

Příloha 22: Průměrné hodnoty obsahu konkrétních fenolických sloučenin v mg·kg⁻¹ u všech extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně (MU) a Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně (ZU) produkovaných během dvou let (2015, 2016) pokračování. Směrodatná odchylka měření byla u všech výsledků do 5%. Zkratka: nd – nedeckováno

		voda				50% ethanol				dimethylsulfoxid			
		MU		ZU		MU		ZU		MU		ZU	
sloučenina	úprava	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016	2015	2016
jestřábina lékařská													
gallová	zmr	457	nd	301	nd	422	228	362	278	628	163	628	165
	suš	123	nd	104	nd	388	91	202	93	161	137	161	150
chlorog.	zmr	236	211	526	188	205	23	124	25	346	140	459	209
	suš	322	270	690	222	209	92	272	80	74	25	124	20
kávová	zmr	46	nd	68	nd	41	nd	42	nd	23	nd	33	nd
	suš	95	91	210	86	63	42	92	36	40	26	42	37
rutin	zmr	1 338	1 008	2 366	1 361	3 107	2 484	4 465	3 815	3 066	2 370	5 410	4 908
	suš	6 123	2 393	4 369	4 379	8 994	3 924	7 156	4 773	2 672	1 662	2 911	2 572
myricetin	zmr	2 524	1 331	4 524	4 494	4 377	3 031	11 606	6 570	2 950	2 615	10 696	6 238
	suš	2 092	1 124	2 483	2 237	2 922	1 700	8 883	3 651	2 421	1 533	3 462	2 789
yzop lékařský													
katechin	zmr	225	223	273	271	573	194	630	610	1 118	563	624	269
	suš	961	555	906	468	1516	1 031	956	808	488	183	321	184
chlorog.	zmr	287	167	233	171	304	20	153	38	86	35	149	45
	suš	374	216	388	223	329	252	348	189	409	142	181	59
kávová	zmr	43	36	72	40	38	20	38	33	223	19	243	25
	suš	49	43	112	53	190	42	185	53	35	16	36	11
ferulová	zmr	140	89	155	91	92	67	100	76	691	291	724	164
	suš	655	370	958	665	369	364	860	400	55	29	85	43
máta peprná													
chlorog.	zmr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	suš	148	78	261	141	313	126	264	138	133	33	143	61
kávová	zmr	37	16	61	28	134	15	182	27	205	60	201	126
	suš	135	67	313	193	187	97	290	228	47	36	87	41
hesperidin	zmr	1029	173	1 370	283	3747	1 895	4 243	1 798	121 453	59 435	124 109	53 730
	suš	8 163	3 224	8 077	6 078	24 563	8 868	14 485	8 901	103 196	47 743	107 626	47 808
kvercetin	zmr	nd	nd	nd	nd	38	nd	85	nd	724	nd	1 178	nd
	suš	1 126	nd	1 244	nd	423	155	511	89	1 865	176	1 101	270
šalvěj lékařská													
kávová	zmr	341	175	328	195	207	67	400	115	418	101	253	215
	suš	430	414	381	415	287	231	524	417	53	47	118	57
ferulová	zmr	114	78	117	76	108	50	160	67	158	21	146	51
	suš	64	51	112	108	75	46	93	45	48	11	65	19
luteolin	zmr	29	nd	27	nd	103	89	116	78	56	53	70	57
	suš	81	48	145	37	72	nd	73	nd	21	nd	18	nd
ostropestřec mariánský													
chlorog.	suš	37	146	27	105	101	386	91	241	76	158	61	118

Příloha 23: Průměrné hodnoty obsahu Ca, Na, K, Mg a P v mg·kg⁻¹ u všech extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016); označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10. Směrodatná odchylka měření byla u všech výsledků do 5%

vzorek	Ca [mg·kg ⁻¹]			Na [mg·kg ⁻¹]			K [mg·kg ⁻¹]			Mg [mg·kg ⁻¹]			P [mg·kg ⁻¹]		
	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO
mražené															
LAMZ15	2 208,9	404,3	410,8	520,4	87,6	30,0	11 098,4	5 670,2	6 299,1	717,9	389,4	197,1	665,9	294,9	253,7
COMZ15	3 595,8	1 180,3	484,7	2 267,3	1 104,2	511,1	15 093,6	10 610,9	10 920,0	736,3	711,4	378,4	1 544,2	1 598,4	612,9
HPMZ15	3 364,0	909,3	1 820,0	541,4	129,1	245,9	8 901,2	5 130,4	11 524,8	1 114,5	614,0	794,6	1 922,3	1 041,6	900,4
SSMZ15	9 355,2	2 985,3	2 555,1	776,7	225,0	577,1	15 224,6	11 400,2	12 765,6	2 586,7	1 718,8	1 043,6	1 573,1	572,8	598,0
MOMZ15	4 147,6	664,4	833,5	679,2	146,4	426,4	16 384,6	7 637,8	7 497,8	1 691,9	611,9	609,7	2 227,2	335,1	414,1
GOMZ15	5 797,6	1 640,0	887,1	584,4	111,6	472,0	10 607,3	7 365,5	10 893,3	1 416,5	1 021,2	493,0	1 844,7	866,7	695,5
HOMZ15	11 718,4	1 157,0	2 135,4	583,4	85,9	554,5	14 156,5	5 852,6	3 240,4	1 843,0	498,9	436,7	1 441,9	287,0	326,4
MPMZ15	7 063,9	1 140,4	3 915,2	2 393,2	734,3	284,3	11 417,0	5 795,5	7 241,4	2 878,5	1 516,4	1 647,9	1 725,6	245,9	301,5
SOMZ15	9 165,1	2 028,8	2 143,9	493,8	81,9	631,0	10 415,3	6 321,8	9 752,6	4 674,0	2 842,3	1 020,6	764,5	236,9	327,0
LAMZ16	1 441,1	634,3	313,5	356,2	227,6	67,7	12 740,4	9 724,1	4 425,9	867,0	644,4	188,0	435,2	958,2	337,3
COMZ16	936,0	362,8	258,5	635,8	296,5	377,3	7 586,1	4 788,8	6 822,7	332,8	189,1	147,1	654,2	1 461,2	299,0
HPMZ16	1 932,6	962,1	709,5	366,9	94,1	1,1	6 986,5	3 757,9	4 191,5	910,7	420,3	277,9	1 565,0	3 387,7	556,1
SSMZ16	15 017,0	5 843,1	1 446,1	1 107,1	635,4	171,8	20 559,4	14 855,9	10 407,1	4 133,4	2 466,9	665,3	1 360,3	1 461,9	413,7
MOMZ16	3 910,2	710,0	620,2	357,0	95,4	44,1	11 525,7	6 113,5	5 783,8	2 325,0	509,5	403,5	569,9	642,0	194,0
GOMZ16	3 177,1	2 288,5	805,4	374,6	135,9	52,3	11 970,1	7 092,1	7 674,1	1 235,3	1 040,3	350,8	1 427,6	2 686,7	452,2
HOMZ16	9 970,6	3 644,5	2 533,9	421,8	216,2	12,0	15 074,4	8 850,0	7 547,0	2 450,3	1 441,4	560,0	792,0	844,6	291,9
MPMZ16	9 582,0	3 941,3	2 548,5	461,8	263,5	6,6	10 252,0	5 750,3	6 807,2	3 874,4	3 063,1	1 383,5	1 685,2	580,3	321,6
SOMZ16	2 997,5	1 242,4	1 424,1	386,6	120,8	71,8	15 736,1	12 021,4	12 151,6	1 607,0	1 067,4	620,7	1 125,0	1 716,3	242,2
sušené															
LAMS15	2 299,4	855,8	330,6	207,1	94,2	179,7	10 960,0	10 697,3	1 683,1	1 273,6	1 176,1	145,4	856,0	577,9	120,4
COMS15	6 535,7	1 664,0	218,4	3 274,4	2 315,7	53,1	17 192,5	20 554,0	3 054,0	1 678,6	1 676,5	94,4	3 313,2	1 712,6	140,8
HPMS15	4 012,3	1 566,6	361,9	201,3	81,6	204,4	8 860,7	12 525,8	3 349,6	1 229,5	1 397,2	171,1	2 731,4	3 476,5	291,2
SSMS15	16 428,3	4 118,8	683,1	271,3	93,0	230,3	14 443,6	18 062,1	2 776,5	4 101,1	3 148,0	386,8	1 790,1	926,0	189,6
MOMS15	11 315,5	2 483,2	1 756,6	1 006,5	73,4	245,8	14 525,7	17 030,3	2 675,9	3 344,5	2 260,6	285,6	2 631,2	934,6	135,9
GOMS15	5 802,4	1 906,3	720,9	228,1	97,1	239,9	13 859,8	15 145,2	4 343,6	1 360,9	1 499,2	287,1	2 823,8	1 904,3	269,8
HOMS15	12 157,2	2 962,4	1 903,4	261,7	271,4	230,9	15 590,2	14 761,0	4 623,3	2 358,0	1 343,4	353,6	1 897,8	479,3	129,6
MPMS15	11 558,3	2 950,1	2 140,5	275,2	103,7	252,5	15 893,8	20 314,0	4 606,4	2 611,0	2 069,1	525,0	2 653,8	971,6	188,6
SOMS15	7 099,5	2 450,5	500,7	228,3	92,3	257,1	11 897,1	13 148,7	1 169,9	3 013,3	3 062,9	159,5	968,3	302,9	79,2
SMMS15	193,1	91,2	170,6	113,1	64,6	209,5	889,5	387,9	68,5	74,4	46,2	83,5	378,8	256,8	126,5
LAMS16	1 449,6	1 376,0	408,9	48,6	311,7	12,7	13 840,5	12 312,9	2 662,2	1 612,0	1 418,7	232,2	1 139,7	591,9	103,3
COMS16	3 265,4	1 026,1	185,6	1 491,8	1 109,5	183,8	21 112,4	13 147,0	3 124,9	1 266,3	594,8	73,3	2 440,4	703,4	106,6
HPMS16	2 283,9	939,9	742,1	64,5	102,7	1,3	12 012,8	9 564,7	5 558,8	937,0	756,0	264,9	2 702,8	1 948,4	432,6
SSMS16	13 212,9	4 134,4	648,1	473,1	597,1	31,8	17 628,7	16 169,3	2 554,2	3 695,2	2 796,2	332,5	1 957,5	344,6	129,9
MOMS16	6 839,0	2 527,9	2 463,4	47,7	129,5	1,7	24 012,1	23 154,4	7 060,6	2 986,0	1 942,7	525,5	2 851,6	751,3	195,4
GOMS16	19 503,4	7 589,3	2 156,3	33,3	154,5	7,0	9 138,6	8 941,2	2 989,9	3 499,2	3 311,0	653,1	1 430,9	296,6	208,9
HOMS16	12 302,6	4 336,5	1 896,4	59,4	244,9	10,6	17 659,5	14 057,7	3 605,4	2 266,1	1 457,5	282,8	2 141,2	462,6	90,5
MPMS16	14 027,4	2 325,9	3 692,6	106,1	981,9	2,5	14 027,5	15 583,4	6 754,8	4 446,0	2 640,5	1 152,7	3 142,2	531,3	275,8
SOMS16	8 459,9	2 551,3	782,2	60,5	90,1	24,6	18 047,2	15 624,3	2 751,6	4 737,3	3 284,7	286,8	1 240,5	249,0	79,5
SMMS16	659,1	107,6	170,0	55,7	71,4	26,4	4 311,1	2 610,8	815,3	1 044,7	121,5	71,0	3 530,4	446,8	159,7

Příloha 24: Průměrné hodnoty obsahu Cu, Fe, Mn, Zn a Al v mg·kg⁻¹ u všech extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících z Centra léčivých rostlin Masarykovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016). Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10. Směrodatná odchylka měření byla u všech výsledků do 5%

vzorek	Cu [mg·kg ⁻¹]			Fe [mg·kg ⁻¹]			Mn [mg·kg ⁻¹]			Zn [mg·kg ⁻¹]			Al [mg·kg ⁻¹]		
	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO
mražené															
LAMZ15	5,6	4,1	6,7	6,1	5,0	2,1	3,3	0,9	0,8	8,7	1,6	8,4	5,1	12,8	0,4
COMZ15	10,7	12,0	18,3	13,6	11,4	2,0	3,8	1,8	1,0	22,3	14,1	25,4	6,6	30,3	15,8
HPMZ15	4,4	5,6	10,6	5,2	6,6	13,9	11,5	3,6	5,0	15,0	3,8	30,4	7,1	19,8	3,0
SSMZ15	5,8	8,9	14,3	8,8	10,8	4,0	16,5	7,3	6,0	10,5	5,2	41,7	10,5	35,7	6,9
MOMZ15	5,5	5,6	10,8	4,6	6,4	2,5	3,6	1,1	0,6	17,8	0,0	19,6	4,4	20,2	3,1
GOMZ15	9,7	8,0	9,0	9,7	6,8	7,2	21,9	7,7	3,6	19,5	10,8	33,4	6,0	20,6	4,8
HOMZ15	4,9	4,8	11,0	6,5	6,2	1,7	14,0	1,9	2,3	5,4	0,0	18,9	11,5	20,4	8,3
MPMZ15	7,6	4,9	12,7	4,1	4,2	7,5	10,3	3,7	6,2	8,7	0,4	16,0	6,9	13,6	1,2
SOMZ15	4,6	5,3	10,3	6,3	6,4	4,7	15,8	5,7	2,9	8,8	1,9	26,6	10,9	21,3	5,9
LAMZ16	4,0	3,6	2,0	4,0	1,2	1,5	2,0	1,2	0,5	18,6	2,7	4,9	3,2	0,0	0,5
COMZ16	4,3	3,0	1,7	2,7	0,4	0,9	1,1	0,5	0,4	29,2	5,8	8,0	1,5	0,0	0,0
HPMZ16	5,0	3,0	2,2	6,8	0,4	3,9	8,5	3,9	2,2	33,4	21,1	19,6	3,5	0,0	1,7
SSMZ16	4,7	3,0	1,6	9,5	0,0	2,4	19,0	7,2	2,4	19,9	20,9	16,7	14,9	0,0	4,8
MOMZ16	3,1	1,3	0,4	4,7	0,0	1,8	3,1	0,6	0,4	9,8	15,1	8,7	4,6	0,0	3,6
GOMZ16	6,2	5,6	4,4	6,5	0,6	5,6	7,9	5,9	4,1	0,0	34,4	22,6	3,4	0,0	4,1
HOMZ16	0,0	2,4	0,6	10,4	0,0	2,5	0,3	6,0	2,8	0,0	23,9	17,1	0,0	0,0	3,8
MPMZ16	0,0	2,3	1,2	7,9	0,0	4,2	0,3	6,9	3,3	0,0	20,0	11,7	0,0	0,0	4,8
SOMZ16	5,2	5,5	1,2	8,6	0,0	5,2	3,4	1,7	1,8	20,8	41,7	24,5	5,2	0,0	4,2
sušené															
LAMS15	5,0	6,3	5,4	5,5	5,1	1,0	4,8	3,2	0,8	8,8	8,6	10,5	5,3	12,1	2,1
COMS15	18,2	16,6	4,4	8,1	6,0	1,4	12,5	4,2	0,6	38,0	28,9	10,1	5,1	13,3	2,7
HPMS15	4,7	7,5	3,4	2,5	4,9	3,4	16,3	9,8	2,4	22,5	23,5	13,3	3,9	13,0	1,8
SSMS15	4,1	6,7	6,0	1,9	4,4	1,7	43,5	16,0	5,1	10,2	11,3	10,3	13,0	17,0	0,2
MOMS15	5,6	7,6	6,1	6,3	4,3	1,3	11,5	3,2	1,0	39,7	6,2	10,4	10,3	14,9	1,0
GOMS15	7,0	8,1	1,8	7,5	7,9	11,2	21,8	12,0	6,7	27,2	28,7	16,7	4,5	13,7	1,3
HOMS15	8,4	10,0	5,3	4,0	5,0	1,8	13,6	4,3	1,8	11,9	5,2	8,1	9,4	15,8	1,2
MPMS15	4,9	8,0	5,2	6,1	5,5	4,9	19,0	5,2	1,8	8,1	5,6	6,3	9,4	15,8	1,8
SOMS15	2,4	5,1	7,8	1,8	4,2	0,4	10,5	6,7	0,7	9,5	7,5	6,9	5,6	14,5	2,0
SMMS15	1,7	3,1	1,6	2,1	3,8	0,3	0,5	0,3	0,2	3,6	0,0	5,9	0,6	11,2	2,0
LAMS16	3,5	7,5	1,3	8,0	5,4	1,9	4,3	2,6	0,7	10,1	16,1	9,0	3,1	1,9	0,5
COMS16	9,4	7,3	0,8	9,2	4,1	1,2	9,8	1,8	0,6	28,1	15,7	9,1	3,9	0,0	0,5
HPMS16	5,1	6,1	3,0	4,1	3,2	4,6	14,4	5,9	3,5	27,3	19,5	12,6	2,3	0,0	0,2
SSMS16	3,4	5,4	1,1	4,7	3,0	1,8	24,6	9,3	2,9	10,9	10,7	7,2	14,8	3,5	0,6
MOMS16	4,1	6,4	2,7	6,1	2,8	2,1	7,3	1,7	1,7	21,6	11,3	9,1	8,1	1,4	2,0
GOMS16	3,2	5,6	4,2	10,2	4,1	8,8	77,9	26,0	9,3	27,1	18,8	10,9	20,0	7,1	2,2
HOMS16	4,0	5,9	0,7	4,8	2,8	1,0	10,8	3,1	1,0	10,0	9,1	6,9	12,8	4,7	2,0
MPMS16	4,9	9,6	3,6	5,2	2,9	7,0	32,5	6,1	3,3	10,2	12,2	7,7	16,8	1,0	3,4
SOMS16	2,7	4,4	0,7	6,3	3,2	1,7	44,2	14,2	3,3	14,6	13,2	7,1	12,2	2,4	0,5
SMMS16	19,7	8,7	4,6	26,5	2,7	0,5	4,1	0,3	0,3	13,2	5,0	5,6	0,3	0,0	0,3

Příloha 25: Průměrné hodnoty obsahu Ca, Na, K, Mg a P v mg·kg⁻¹ u všech extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně (ZU) produkovaných během dvou let (2015, 2016). Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10. Směrodatná odchylka měření byla u všech výsledků do 5%

vzorek	Ca [mg·kg ⁻¹]			Na [mg·kg ⁻¹]			K [mg·kg ⁻¹]			Mg [mg·kg ⁻¹]			P [mg·kg ⁻¹]		
	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO
mražené															
LAMZ15	2 179,9	766,3	644,9	1 024,4	384,1	1 256,3	12 200,0	11 636,2	7 834,8	916,1	1 151,6	388,2	665,4	569,1	430,2
COMZ15	4 570,9	395,6	441,2	4 094,2	884,8	83,5	21 067,6	9 446,9	15 722,6	993,0	269,6	356,1	2 831,3	953,9	630,8
HPMZ15	3 853,2	664,9	1 245,5	479,9	51,1	790,6	14 029,3	9 019,9	11 566,7	1 938,6	561,8	733,5	3 271,1	1 302,3	617,2
SSMZ15	7 121,7	1 640,2	991,7	3 932,2	1 780,8	867,0	21 966,5	16 845,9	5 476,8	2 675,6	1 707,7	603,5	3 292,5	1 291,5	635,0
MOMZ15	6 143,8	514,1	1 598,9	1 430,8	416,4	732,1	19 487,8	10 858,5	11 268,0	2 773,2	600,1	1 091,2	2 760,6	660,6	331,6
GOMZ15	4 762,9	705,4	529,7	1 220,2	236,7	1 154,6	17 103,5	9 542,5	7 571,0	1 189,0	431,4	311,7	2 581,2	1 030,8	646,7
HOMZ15	12 309,0	1 739,4	2 694,2	810,0	163,0	777,8	9 495,1	2 661,8	4 225,8	2 972,8	605,4	537,8	1 092,0	108,7	257,9
MPMZ15	13 470,9	2 353,9	145,2	3 930,6	1 605,8	105,9	18 259,5	10 376,8	4 363,5	4 928,5	2 516,3	1 509,9	2 486,3	364,1	327,7
SOMZ15	8 199,6	2 185,3	4 340,0	993,2	363,6	613,8	18 043,4	12 405,8	20 265,6	2 824,2	1 883,3	1 253,2	1 457,2	297,9	281,9
LAMZ16	1 165,4	741,8	316,3	633,5	398,7	17,2	12 401,1	10 363,2	4 891,4	676,5	660,5	220,4	950,8	1 883,1	211,7
COMZ16	2 053,0	1 157,5	756,9	2 235,8	1 395,0	1 950,5	19 080,7	13 704,4	24 169,0	1 007,5	640,2	469,5	1 137,2	3 045,2	598,5
HPMZ16	2 576,9	1 869,1	1 261,4	1 022,3	715,3	640,4	10 418,1	6 971,9	7 331,6	1 492,0	1 184,2	544,3	1 736,8	3 549,5	455,9
SSMZ16	5 961,0	2 381,8	1 309,8	1 908,3	746,7	197,8	26 823,9	21 738,4	13 036,0	2 996,4	1 857,4	565,0	3 257,3	3 749,9	409,7
MOMZ16	3 234,2	1 674,2	615,6	588,4	307,1	34,0	16 182,6	12 410,9	8 703,7	2 021,7	1 274,8	418,7	1 993,0	1 758,5	252,6
GOMZ16	3 509,7	1 685,0	595,7	822,8	518,0	76,5	14 419,6	13 015,0	12 045,7	1 575,5	1 052,6	299,8	1 964,3	3 911,2	553,5
HOMZ16	5 933,5	3 094,5	3 084,9	662,2	305,8	36,5	11 669,6	5 523,8	4 778,5	2 004,7	1 169,1	589,8	708,7	900,1	273,8
MPMZ16	6 815,6	2 211,4	1 662,2	1 198,7	673,5	433,8	16 088,5	9 692,9	9 869,6	3 414,8	1 974,1	1 066,8	2 329,0	1 194,4	304,4
SOMZ16	4 475,9	1 717,9	759,8	589,1	306,3	69,7	13 502,7	12 693,8	9 883,6	1 917,4	1 166,7	355,0	1 697,8	2 178,9	231,9
sušené															
LAMS15	3 282,7	1 119,8	523,9	835,5	470,9	197,0	11 202,2	13 527,4	1 678,7	2 659,0	2 753,0	244,7	1 226,6	736,5	89,4
COMS15	5 112,0	829,0	238,8	4 228,0	2 919,7	181,6	18 131,2	25 045,3	4 131,5	1 373,6	1 369,5	123,7	3 486,4	3 195,0	160,8
HPMS15	3 728,9	1 003,5	491,6	318,2	110,7	273,7	13 145,4	14 996,3	4 083,5	2 310,7	1 866,8	336,0	3 105,1	1 963,5	204,3
SSMS15	6 082,7	1 345,5	306,4	1 257,1	539,4	211,4	20 961,4	27 386,0	4 782,4	1 940,9	1 804,6	177,1	3 212,1	1 601,2	173,8
MOMS15	6 419,4	58,6	1 449,0	1 135,0	532,3	199,4	15 966,2	22 508,5	4 909,4	3 023,4	2 931,3	450,1	1 492,8	650,5	164,4
GOMS15	3 823,6	1 621,3	467,1	1 364,8	957,4	4,7	12 443,5	16 425,5	5 449,5	1 257,7	1 463,2	206,4	1 902,0	1 466,5	194,8
HOMS15	14 207,4	6 595,6	1 479,1	780,4	486,3	240,4	11 949,5	13 071,5	2 678,9	3 702,1	3 007,2	413,1	1 483,9	278,5	100,3
MPMS15	9 527,0	3 742,2	2 611,3	234,9	329,4	206,1	12 840,0	16 617,4	4 655,4	1 895,7	1 756,0	427,3	594,0	373,2	182,2
SOMS15	10 894,3	2 827,4	823,8	1 069,3	470,3	238,5	16 584,5	20 185,1	3 319,0	4 027,7	3 324,8	272,4	1 352,5	356,2	95,9
SMMS15	257,8	86,7	139,7	142,5	45,9	216,9	1 630,2	1 048,9	291,0	75,3	44,6	73,4	611,6	277,9	129,4
LAMS16	770,7	540,8	106,8	495,5	459,8	7,4	14 650,6	10 882,2	1 201,0	624,1	522,2	53,3	951,1	451,0	78,9
COMS16	4 522,5	1 656,0	190,2	2 793,0	2 692,5	380,7	26 474,6	25 795,3	4 756,6	1 619,8	1 742,0	90,6	2 966,8	2 387,1	134,9
HPMS16	2 369,3	883,3	620,3	589,3	520,9	196,9	11 370,4	8 399,5	3 145,7	1 338,8	833,6	280,8	2 827,9	1 716,9	268,7
SSMS16	5 395,0	1 542,9	271,1	629,2	662,0	24,3	34 654,3	30 957,9	5 458,2	2 508,4	1 887,7	163,0	4 291,5	2 111,0	168,8
MOMS16	8 972,7	3 469,6	1 918,8	356,4	379,4	27,4	23 392,9	23 167,6	5 411,2	4 277,0	3 304,8	519,8	2 936,3	835,0	141,9
GOMS16	4 380,1	1 618,8	514,5	652,9	604,9	123,3	21 763,6	24 444,5	7 154,7	1 781,4	1 681,4	244,3	3 067,2	2 606,1	197,4
HOMS16	8 054,9	2 377,6	1 081,3	407,3	299,1	12,8	12 020,4	8 558,0	2 054,5	2 096,3	1 222,1	231,2	1 220,4	194,9	78,5
MPMS16	10 745,0	2 056,4	1 722,1	1 129,4	1 020,1	256,1	19 790,4	16 104,8	5 382,9	4 480,1	2 309,4	765,2	3 193,2	574,9	221,3
SOMS16	6 393,7	3 245,4	546,5	291,5	419,9	4,9	23 608,2	19 940,1	2 730,4	2 611,1	3 047,3	174,0	3 090,7	630,5	96,1
SMMS16	636,7	104,1	205,9	96,2	72,4	54,2	3 287,9	2 379,5	638,3	380,7	72,6	53,3	1 989,1	496,4	130,4

Příloha 26: Průměrné hodnoty obsahu Cu, Fe, Mn, Zn a Al v mg·kg⁻¹ u všech extraktů ze zmražených a sušených léčivých rostlin pocházejících ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně produkovaných během dvou let (2015, 2016). Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9 a 10. Směrodatná odchylka měření byla u všech výsledků do 5%

vzorek	Cu [mg·kg ⁻¹]			Fe [mg·kg ⁻¹]			Mn [mg·kg ⁻¹]			Zn [mg·kg ⁻¹]			Al [mg·kg ⁻¹]		
	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO	H ₂ O	ETOH	DMSO
mražené															
LAMZ15	3,8	7,6	15,7	6,8	8,9	3,9	5,3	2,8	1,6	9,3	1,7	30,6	5,0	26,5	3,1
COMZ15	14,0	9,4	17,5	11,2	11,5	2,1	4,2	1,0	1,1	31,8	7,5	37,0	8,3	32,5	13,7
HPMZ15	7,2	3,8	10,9	4,9	3,3	7,5	23,1	5,1	5,2	28,2	7,5	26,6	5,6	5,9	7,8
SSMZ15	5,9	4,6	12,7	9,0	4,9	1,9	11,1	3,1	1,9	10,8	8,8	29,7	11,2	10,9	13,0
MOMZ15	7,8	6,7	11,2	5,3	7,9	4,7	7,7	1,3	2,0	17,1	0	25,8	6,2	22,4	4,7
GOMZ15	8,3	7,4	15,1	11,8	9,2	11,3	19,0	3,8	2,3	21,7	5,1	30,8	6,3	25,7	4,7
HOMZ15	4,0	1,6	19,4	5,9	2,9	1,8	11,7	1,6	1,2	10,3	3,7	32,4	13,5	7,9	5,7
MPMZ15	13,1	6,8	11,5	7,2	3,8	4,3	23,9	5,8	3,6	17,4	9,0	29,0	14,8	10,0	5,0
SOMZ15	5,4	3,8	11,0	4,6	3,4	3,8	7,4	2,8	1,9	13,3	8,2	28,2	8,4	9,3	1,3
LAMZ16	4,0	4,1	1,1	6,7	0,0	1,6	1,7	1,1	0,5	8,2	1,1	16,1	3,7	0,0	0,0
COMZ16	3,8	5,5	5,5	16,7	0,0	2,7	2,6	1,4	1,4	28,3	1,4	40,9	7,7	0,0	1,4
HPMZ16	0,0	3,5	3,9	8,2	0,0	4,5	10,1	4,5	2,6	16,0	4,5	31,4	5,9	0,0	4,5
SSMZ16	0,7	4,7	1,9	13,3	0,0	3,8	13,7	4,0	2,8	23,1	4,0	24,1	9,6	0,0	3,8
MOMZ16	1,8	3,0	0,6	8,4	0,0	2,4	4,2	1,4	0,6	14,9	1,4	15,7	4,5	0,0	2,4
GOMZ16	3,4	6,1	4,7	8,6	0,0	6,2	18,9	5,7	3,1	20,3	5,7	30,1	6,1	0,0	3,5
HOMZ16	0,0	1,8	0,7	8,0	0,0	2,0	6,2	1,7	1,3	10,2	1,7	18,9	11,5	0,0	3,3
MPMZ16	6,3	5,1	3,6	7,5	0,0	6,0	16,9	4,3	3,0	12,8	4,3	14,9	10,4	0,0	1,8
SOMZ16	5,8	5,0	1,7	8,1	0,0	4,0	6,9	1,7	1,1	19,9	1,7	16,4	7,7	0,0	1,1
sušené															
LAMS15	2,6	5,1	8,7	3,2	4,3	0,5	11,5	7,8	1,1	7,4	7,1	8,0	3,4	13,1	1,0
COMS15	11,4	10,0	6,9	9,4	5,7	2,1	5,3	2,5	0,5	38,5	33,9	9,4	5,6	12,8	1,3
HPMS15	7,2	7,0	6,7	2,1	2,8	3,1	17,9	7,0	2,2	32,0	28,0	12,1	3,1	5,1	1,8
SSMS15	6,1	7,9	6,6	3,4	2,9	1,5	13,7	5,0	1,4	18,0	16,2	12,2	5,3	6,3	1,8
MOMS15	3,1	6,2	8,0	3,2	4,3	1,8	19,9	4,2	2,1	12,8	8,6	8,6	4,8	13,6	1,4
GOMS15	5,0	9,6	6,6	7,0	8,1	5,1	19,8	10,8	4,2	15,8	23,9	11,0	3,5	13,6	2,0
HOMS15	3,7	5,1	8,8	2,8	3,3	1,4	16,7	8,4	1,7	9,0	7,3	7,8	11,3	12,3	0,3
MPMS15	1,8	3,8	8,8	1,2	2,1	3,1	10,3	9,8	3,5	0,0	7,1	6,9	5,4	8,3	0,4
SOMS15	3,5	5,0	8,3	1,9	2,1	1,4	12,8	5,9	1,4	8,2	9,2	8,8	7,8	7,5	1,7
SMMS15	1,2	1,1	4,7	3,1	1,9	0,7	0,6	0,3	0,2	2,4	1,6	8,4	0,6	3,3	0,2
LAMS16	2,4	4,0	0,2	5,8	3,0	0,6	1,8	1,4	0,4	12,4	7,3	4,9	0,9	0,3	0,2
COMS16	9,0	9,7	2,4	7,9	4,6	1,5	7,8	3,4	0,5	31,8	34,0	10,3	5,4	2,5	0,2
HPMS16	2,7	4,5	2,4	4,5	2,9	3,1	13,2	4,4	2,6	20,6	14,3	10,8	2,9	0,8	0,5
SSMS16	7,2	9,2	2,6	6,2	3,6	1,5	19,4	5,4	1,4	25,4	21,1	8,7	6,4	1,8	0,2
MOMS16	4,7	7,9	1,7	6,2	3,1	1,8	15,4	4,4	1,9	20,2	14,8	7,3	9,6	3,1	1,9
GOMS16	4,5	8,8	3,5	13,7	11,2	8,2	35,8	11,9	6,4	29,6	44,0	13,1	5,3	1,7	0,2
HOMS16	2,3	3,6	0,5	5,2	2,8	1,7	10,0	3,6	1,3	7,1	8,6	6,7	9,3	1,9	0,2
MPMS16	8,5	8,3	4,3	5,2	3,1	5,2	28,4	6,3	2,6	15,9	10,4	9,0	11,2	2,8	0,5
SOMS16	4,9	6,8	1,8	4,3	3,1	1,8	11,3	5,0	1,1	18,0	13,8	15,5	6,8	3,1	0,8
SMMS16	6,9	6,0	3,4	10,5	2,6	0,5	1,2	0,2	0,2	7,9	6,2	15,3	0,7	0,0	1,3

Příloha 27:Publikační činnost autorky

Publikace v impaktovaných časopisech

1. **BUTOROVÁ, L.**; POLOVKA, M.; POŘÍZKA, J.; VÍTOVÁ, E. Multi-experimental characterization of selected medical plants growing in the Czech Republic. *Chemical Papers*, 2017, roč. 12, č. 103, s. 1-17. ISSN: 1336-9075.
2. VÍTOVÁ, E.; SŮKALOVÁ, K.; MAHDALOVÁ, M.; **BUTOROVÁ, L.**; MATĚJÍČEK, A.; KAPLAN, J. Influence of volatile compounds on flavour of selected cultivars of gooseberry. *Chemical Papers*, 2017, roč. 71, č. 10, s. 1895-1908. ISSN: 0366-6352.
3. **BUTOROVÁ, L.**; VÍTOVÁ, E.; POLOVKA, M. Comparison of volatiles identified in *Aronia melanocarpa* and *Amelanchier alnifolia* using solid-phase microextraction, coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2016, roč. 55, č. 1, s. 57-68. ISSN: 1336-8672.
4. VÍTOVÁ, E.; SŮKALOVÁ, K.; MAHDALOVÁ, M.; **BUTOROVÁ, L.**; MELIKANTOVÁ, M. Comparison of selected aroma compounds in cultivars of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Chemical Papers*, 2015, roč. 69, č. 6, s. 881-888. ISSN: 0366-6352.

Publikace v recenzovaných časopisech

1. **BUTOROVÁ, L.**; POLOVKA, M.; TOBOLKOVÁ, B.; VÍTOVÁ, E. Assessment of antioxidant properties of different types of herbs by EPR and UV-VIS spectroscopy. *Czech Chemical Society Symposium Series*, 2015, roč. 13, č. 2, s. 56-58. ISSN: 2336-7210.
2. VÍTOVÁ, E.; SŮKALOVÁ, K.; MAHDALOVÁ, M.; **BUTOROVÁ, L.**; BABÁK, L.; MATĚJÍČEK, A. Comparison of flavour and volatile flavour compounds of mixed elderberry juices. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2015, roč. 63, č. 1, s. 147-152. ISSN: 1211-8516.
3. VÍTOVÁ, E.; SŮKALOVÁ, K.; MAHDALOVÁ, M.; **BUTOROVÁ, L.**; MUSILOVÁ, L.; PECINOVÁ, E. Comparison of sensory quality of model Swiss cheese with commercially obtained corresponding product. *Czech Chemical Society Symposium Series*, 2015, roč. 13, č. 2, s. 152-154. ISSN: 2336-7210.

Plné texty příspěvků a abstraktů z konferencí

1. **BURDĚJOVÁ, L.**; POLOVKA, M. Effect of extraction solvents on phenolic compounds concentration, antioxidant activity and colour parameters of selected medical plants. In *MendelNet 2017 Proceedings of 24th International PhD Students Conference*. Brno: Mendel University in Brno, 2017. p. 520-525. ISBN: 978-80-7509-529-9.
2. **BURDĚJOVÁ, L.**; RAMIRÉZ-ACOSTA, A., ARIAS-BORREGO, A., GARCÍA-BARRERA, T., POLOVKA, M., GOMÉZ-ARIZA, J. L. *Impact of geographical locality on metabolic profiles of selected medicinal plants from Lamiaceae family*. Abstract Book PBA 2017. Madrid: 2017. s. 109-109.
3. **BUTOROVÁ, L.**; POLOVKA, M.; POŘÍZKA, J.; VÍTOVÁ, E. *Multi-experimental characterization of selected medical plants growing in the Czech Republic*. Book of Abstracts 8th Central European Conference Chemistry towards Biology. Brno, Czech

- Republic: University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic, 2016. s. 87-87. ISBN: 978-80-7305-777- 0.
4. **BUTOROVÁ, L.**; POLOVKA, M.; TOBOLKOVÁ, B.; VÍTOVÁ, E. Comparison of antioxidant and colour characteristics of different types of medical plants assessed by modern spectroscopic techniques. In *12th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*. Brno: Institute of Analytical Chemistry of the CAS, 2015. s. 91-94. ISBN: 9788090495937.
 5. **BUTOROVÁ, L.**; POLOVKA, M.; TOBOLKOVÁ, B.; VÍTOVÁ, E. *Assessment of antioxidant properties of different types of herbs by EPR and UV- VIS spectroscopy*. Chemistry & Life 2015 - Book of Abstracts. 1. Brno: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 2015. s. 96-96. ISBN: 978-80-214-5228- 2.
 6. VÍTOVÁ, E.; SŮKALOVÁ, K.; MAHDALOVÁ, M.; **BUTOROVÁ, L.**; MUSILOVÁ, L.; PECINOVÁ, E. *Comparison of sensory quality of model Swiss cheese with commercially obtained corresponding product*. Chemistry and Life 2015 - Book of abstracts. 1. Brno: Brno University of Technology, 2015. s. 95-96. ISBN: 978-80-214-5228- 2.
 7. **BUTOROVÁ, L.**; VÍTOVÁ, E.; POLOVKA, M. Monitoring of selected parameters in Amelanchier alnifolia extracts by UV-VIS- NIR and EPR spectroscopy. In *CECE 2014 11th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*. Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i.: 2014. s. 137-140. ISBN: 978-80-904959-2- 0.
 8. **BUTOROVÁ, L.**; TOBOLKOVÁ, B.; POLOVKA, M. Využití moderních analytických technik pro charakterizaci plodů aronie a muchovníku. In *Aplikované přírodní vědy*. Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnavě: 2014. s. 79-84. ISBN: 978-80-8105-565- 2.
 9. VÍTOVÁ, E.; SŮKALOVÁ, K.; MAHDALOVÁ, M.; **BUTOROVÁ, L.** Identification and quantification of aroma compounds of Sea buckthorn berries. In *CECE 2014, 11th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*. Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i.: 2014. s. 450-453. ISBN: 978-80-904959-2- 0.

Příloha 28: Životopis autorky

Osobní údaje

Jméno a příjmení: Lenka Burdějová
Adresa: Školní 564, Slavičín, 763 21
Datum a místo narození: 10. říjen 1988, Zlín

Vzdělání

2014 – současnost Fakulta chemická VUT v Brně
obor Potravinářská chemie a biotechnologie
doktorské studium

2012 – 2014 Fakulta chemická VUT v Brně
obor Potravinářská chemie a biotechnologie
magisterské studium ukončeno státní zkouškou

2009 – 2012 Fakulta chemická VUT v Brně
obor Potravinářská chemie a biotechnologie
bakalářské studium ukončeno státní zkouškou

2004 – 2008 Gymnázium Jana Pivečky, Školní 822, Slavičín
ukončeno maturitní zkouškou

Odborné stáže

02/2015 – 12/2017 Národní polnohospodářské centrum, Výzkumný ústav potravinářský
Bratislava, Biocentrum Modra, Slovensko
Charakterizace různých extraktů z léčivých rostlin pomocí EPR,
HPLC, UV-VIS-NIR, statistické zhodnocení výsledků, optimalizace
receptury pro výrobu jednodruhových a dvoudruhových sirupů
z léčivých rostlin

01/2017 – 05/2017 Univerzita v Huelvě, Fakulta experimentálních věd
Huelva, Španělsko
Sledování vlivu geografie na metabolický profil léčivých rostlin
s využitím GC-MS a Q-TOF-MS/MS, optimalizace extrakce pro Q-
TOF-MS/MS analýzu

Výuka

2014/2015, 2015/2016, 2016/2017 zimní semestr výuka Praktika z instrumentální analýzy

Ocenění

3. místo v sekci Food Technology na mezinárodní Ph.D. konferenci MendelNet 2017 Mendelovy
Univerzity v Brně, 4. místo v sekci Aplikovaná biologie a technologie na mezinárodní konferenci
Aplikované přírodní vědy 2014 Univerzity sv. Cyrila a Metoděje v Trnavě