

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra botaniky a fyziologie rostlin**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Optimalizace extrakce celkových fenolů a flavonoidů u  
lociky seté**

**Bakalářská práce**

**Martin Káda**

**Kvalita produkce**

**PharmDr. Jan Kubeš, Ph.D.**

© 2021 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Optimalizace extrakce celkových fenolů a flavonoidů u lociky seté" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 3.5.2021 \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval PharmDr. Janu Kubešovi, Ph.D. za jeho trpělivost a ochotu, dále bych chtěl poděkovat své přítelkyni za psychickou podporu.

# Optimalizace extrakce pro stanovení fenolů a flavonoidů u lociky seté

## Souhrn

Bakalářská práce se zabývala optimalizací extrakce rostlinných fenolů a flavonoidů v locice seté. Salát je známá listová zelenina patřící do velice druhově bohaté čeledi hvězdnicovitých. Běžně se pěstuje pro domácí potřebu i ve velkovýrobě. Z výživového hlediska salát obsahuje nenasycené mastné kyseliny, vlákninu, vitamin C, kyselinu listovou a fenolické sloučeniny. Všechny tyto látky jsou nutričně významné a mají pozitivní účinky na lidské zdraví.

Rostlinné fenoly jsou široká skupina sekundárních metabolitů. Zahrnují fenolické kyseliny, flavonoidy, kumariny, stilbeny, trísloviny a ligniny. V rostlině plní několik důležitých funkcí jako je lákání opylovačů, ochrana před patogeny, pohlcování UV záření. Z rostlinných fenolů jsou pro člověka nejdůležitější fenolické kyseliny a flavonoidy. Právě flavonoidům jsou v mnoha studiích přisuzovány významné účinky na lidské zdraví, a to především pro antioxidační a antimikrobiální vlastnosti. Jejich pravidelnou konzumací lze předcházet rakovině či vzniku kardiovaskulárních onemocnění.

Práce poskytuje základní přehled o starších i moderních metodách a rozpouštědlech užívaných pro extrakci flavonoidů a fenolů. Rozebírá různé faktory ovlivňující extrakci jako je například teplota a polarita.

V experimentální části byly zkoumány čtyři metody extrakce, jednalo se o zahřívání pod Liebigovým chladičem při 80 °C, zahřívání bez chladiče při 50 °C, maceraci a ultrazvuk. Extrakce byly provedeny společně se čtyřmi běžně používanými rozpouštědly, kterými byla voda, 85% ethanol, 80% methanol a 70% aceton. V rámci práce byl také sledován vliv poměru mezi množstvím použitého rostlinného materiálu a objemem rozpouštědla. Z výsledků vychází, že pro rostlinné fenoly je nejlepší metoda extrakce zahřívání 80 °C pod Liebigovým chladičem se 70% roztokem acetonu po dobu 30 minut. U flavonoidů se jako nejúčinnější extrakční činidlo ukázal 85% ethanol při zahřívání 80 °C na 1,5 hodiny s navázkou 0,3 g. S navázkou 0,2 g se výsledky po zahřívání na 80 °C a 50 °C nelišily, kdy nejspíše mohla být extrahována jiná spektra látek. Při použití většího množství rozpouštědla byly zaznamenány znatelnější nárůsty u flavonoidů než u fenolů.

**Klíčová slova:** *Lactuca sativa*, sekundární metabolity, extrakční metody, kvantitativní analýza, spektrofotometrie.

# Optimization of methods for total phenolic content and flavonoids content in lettuce

## Summary

Bachelor thesis deals with the optimization of the extraction of plant phenols and flavonoids in the lettuce. Lettuce is a well-known leafy vegetable that belongs to a very species-rich family of *Asteraceae*. It is grown on gardens but also in large-scale production. From a nutritional point of view, lettuce contains unsaturated fatty acids, fibre, vitamin C, folic acid and phenolic compounds. All these substances are nutritionally important and have positive effects on human health.

Plant phenols are a broad group of secondary metabolites. It includes phenolic acids, flavonoids, coumarins, stilbenes, tannins and lignins. In plant, they serve several important functions such as attracting pollinators, protection against pathogens, absorption of UV radiation. Regarding the plant phenols, phenolic acids and flavonoids are the most important ones for humans. In many studies there was proved that flavonoids have significant effects on human health, because of their antioxidant and antimicrobial properties. Their regular consumption can prevent cancer or the development of cardiovascular disease.

Thesis also provides a basic overview of older and modern methods and solvents used for the extraction of flavonoids and phenols. It discusses various factors influencing extraction, such as temperature and polarity.

Four extraction methods were investigated: heating under a Liebig condenser at 80 °C, heating without a condenser at 50 °C, maceration and ultrasound. This was done together with four commonly used solvents, which are water, 85% ethanol, 80% methanol and 70% acetone. The work also monitored the effect of the ratio between the amount of plant material used and the volume of solvent. The results show that for plant phenols, the best method of extraction is heating under a Liebig condenser with a 70% acetone solution. For flavonoids, 85% ethanol proved to be by far the most effective extractant, for the used methods, heating at 80 °C for 1.5 hours with a weight of 0.3 g had the highest value. At 0.2 g, the heating at 80 °C and 50 °C did not differ, when other spectra of substances were most likely extracted. Bigger increases in flavonoids than in phenols content have been reported with larger amounts of solvent.

**Keywords:** *Lactuca sativa*, secondary metabolites, extraction methods, quantitative analysis, spectrophotometry.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Locika setá</b> .....	<b>10</b>
3.1.1	Botanický popis .....	10
3.1.2	Pěstování a původ.....	10
3.1.3	Nutriční přínos.....	10
<b>3.2</b>	<b>Rostlinné fenoly</b> .....	<b>12</b>
3.2.1	Význam rostlinných fenolů v rostlině .....	12
3.2.2	Fenolické kyseliny.....	13
<b>3.3</b>	<b>Flavonoidy</b> .....	<b>13</b>
3.3.1	Význam flavonoidů v rostlině .....	14
3.3.2	Struktura flavonoidů.....	14
3.3.3	Flavonoidy jako nutraceutika .....	15
3.3.4	Flavony.....	16
3.3.5	Flavonoly.....	16
3.3.6	Flavanony .....	17
3.3.7	Isoflavonoidy.....	17
3.3.8	Antokyany .....	17
<b>3.4</b>	<b>Metody extrakce a detekce rostlinných fenolů</b> .....	<b>17</b>
3.4.1	Faktory ovlivňující extrakci .....	17
3.4.2	Rozpouštědla .....	19
3.4.3	Metody extrakce .....	20
3.4.3.1	Macerace .....	20
3.4.3.2	Zahřívání .....	20
3.4.3.3	Soxhletova extrakce .....	20
3.4.3.4	Ultrazvuk.....	21
3.4.3.5	Extrakce podporovaná tlakem .....	21
3.4.3.6	Perkolace .....	21
3.4.4	Folin-Ciocalteuova metoda .....	22
3.4.5	Určení flavonoidů na základě aluminiových komplexů.....	22
<b>3.5</b>	<b>Spektrofotometrie</b> .....	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Rostlinný materiál</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>Příprava vzorků</b> .....	<b>24</b>
<b>4.3</b>	<b>Podmínky extrakce</b> .....	<b>24</b>

4.3.1	Zahřívání 80 °C .....	25
4.3.2	Zahřívání 50 °C .....	25
4.3.3	Kinetická macerace .....	25
4.3.4	Ultrazvuk .....	26
<b>4.4</b>	<b>Skladování vzorků .....</b>	<b>26</b>
<b>4.5</b>	<b>Stanovení celkového fenolického obsahu .....</b>	<b>26</b>
<b>4.6</b>	<b>Stanovení celkových flavonoidů .....</b>	<b>27</b>
<b>4.7</b>	<b>Analýza dat .....</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Celkové fenolické látky (TPC) .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2</b>	<b>Celkový obsah flavonoidů (TFC) .....</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>32</b>
<b>6.1</b>	<b>Optimalizace extrakce TPC .....</b>	<b>32</b>
6.1.1	Optimalizace rozpouštědel .....	32
6.1.2	Optimalizace metod .....	33
6.1.3	Další faktory ovlivňující extrakci .....	33
<b>6.2</b>	<b>Optimalizace extrakce TFC .....</b>	<b>34</b>
6.2.1	Optimalizace rozpouštědel .....	34
6.2.2	Optimalizace metod .....	34
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>36</b>
<b>8</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>37</b>

# 1 Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá optimalizací metodiky extrakce rostlinných fenolů a flavonoidů v locice seté (*Lactuca sativa* L.). Rozebírá určení nejvhodnějších metod extrakce a extrakčních činidel při stanovení těchto sekundárních metabolitů v sušině hydroponicky pěstovaného salátu genotypu „Král Máje“.

Literární rešerše poskytuje základní přehled o tomto rostlinném druhu a jeho přínosu v lidské stravě, dále rozebírá rostlinné polyfenoly a jejich podskupinu fenolické kyseliny. Další významnou podskupinou jsou flavonoidy, které jsou v posledních dekáдах tématem mnoha vědeckých prací pro své účinky podporující zdraví. Především flavonoly jako kvercetin a kaempferol se staly předmětem zájmu pro své antioxidační účinky. Tyto dvě podskupiny sekundárních metabolitů tvoří většinu přijatých rostlinných fenolů ve stravě, a proto zejména na tyto skupiny bude práce zaměřena. Poslední kapitola teoretické části práce je věnována faktorům ovlivňující extrakci a stanovení.

Zkoumány budou známá organická rozpouštědla o daných koncentracích společně se čtyřmi metodami extrakce v sušině salátu. Všechny metody i rozpouštědla jsou do určité míry popsány v odborné literatuře. Protože jsou rostlinné fenoly široká skupina poměrně různorodých přírodních látek, je nemožné určit jednoduchou metodu a rozpouštědlo vhodné pro všechny podskupiny. Výběr správné metodiky při extrakci ztěžuje i fakt, že v rámci rostlinných druhů, jednotlivých genotypů, ale i podle stáří rostliny se obsah jednotlivých skupin může lišit.

Salát slouží v mnoha studiích jako modelová rostlina pro testování vlivů prostředí na obsahové látky v rostlinách. Sledované látky často zahrnují i celkové rostlinné fenoly (TPC) a flavonoidy (TFC). Optimalizace extrakce těchto látek je tedy důležitá do budoucna, kdy kalibrace metodiky může přispět nejen ke správnému výběru genotypů salátu s těmito nutričně hodnotnými látkami, ale může sloužit i do modelových studií.



## 2 Cíl práce

Při výzkumu vlivu stresu na rostliny je často stanovován obsah různých skupin sekundárních metabolitů, kdy se jednotlivé postupy i v rámci jednoho druhu mohou lišit. Cílem práce je optimalizace metodiky extrakce rostlinných fenolů a flavonoidů v sušině listů lociky seté (*Lactuca sativa*). V rámci bakalářské práce bude ověřena hypotéza, že různá extrakční činidla a extrakční postupy mohou mít vliv na získaný výsledek.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Locika setá

Locika setá (*Lactuca sativa* L.), či také salátová, je považována za nejdůležitější listovou zeleninu a běžně je označována pouze jako salát. Vyznačuje se velkou genetickou i morfologickou variabilitou. Existují 4 přední skupiny, které jsou od sebe odlišeny fenotypovým projevem, běžně označovány jako morfotypy (Bělohlávková et al. 2004, Křístková et al. 2008). Známé je přibližně 130 kultivarů (Bělohlávková et al. 2004). Nejčastěji se používá syrová v zeleninových salátech (Křístková et al. 2008).

*L. sativa* je rostlina z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*), která je nejrozsáhlejší čeledí dvouděložných rostlin. Rod locika je pravděpodobně nejznámější a nejsnadněji rozpoznatelný z podčeledi čekankových. Přesné vymezení je ale problematické. Zahrnuje přibližně 100 taxonů, počet se liší podle jednotlivých autorů (Křístková et al. 2008).

#### 3.1.1 Botanický popis

Locika setá je jednoletá až dvouletá lysá rostlina vysoká 30–100 cm s tenkým hlavním kořenem a vzpřímeně rostoucí hustě olistněnou lodyhou. Listy jsou často spirálovitě uspořádány do hlávkovité růžice, jejich tvar je podlouhlý až příčně eliptický s často zubatým a zvlněným okrajem listu (Bělohlávková et al. 2004). Listy mohou být vlivem antokyanů zbarveny červeně až fialově. Úbory s 7–15 (35) květy tvoří hustě zataženou latu. Zákrov, neboli podpůrné listy, je světle zelený s bílými okraji. Kvete žlutě s ligulou dosahující délky až 15 mm. Plodem je bíle ochmýřená nažka o velikosti 6–8 mm s 5–9 žebry (Bělohlávková et al. 2004).

#### 3.1.2 Pěstování a původ

Salátová locika se běžně pěstuje na zahrádkách pro domácí potřebu i ve velkoprodukci na polích. Preferuje hluboké humózní půdy hlinitého i hlinitopísčitého typu, důležitý je pro ni zejména dostatečný obsah draslíku a fosforu. U nás se nejčastěji pěstují hlávkové saláty (*L. sativa* var. *capitata*), které jsou vhodné pro výsev na jaro, či podzim. Vysoké letní teploty u těchto forem způsobují nástup květu. Díky absenci tendence vybíhání do květu při vyšších teplotách jsou pak pro letní období vhodnější genotypy ze skupiny římských salátů (*L. sativa* var. *longifolia*) (Bělohlávková et al. 2004).

Původní divoká forma salátu není známa, jejím nejbližším příbuzným je locika kompasová (*Lactuca serriola*), z které pravděpodobně i vznikla, buď mutací nebo hybridizací, nejspíše ve starověkém Egyptě. Její první vyobrazení pochází právě ze starověkého Egypta a datují se přibližně 2500 let př. n. l. Odtud se rozšířila ve Středomoří a postupně v podstatě do celého světa (Bělohlávková et al. 2004).

#### 3.1.3 Nutriční přínos

Nutriční hodnoty u lociky se liší podle genotypu, stáří při sklizni a barvy listů. Celkový obsah kalorií je v salátu nízký (Tab. 1), a proto je vhodný jako součást různých pokrmů.

Nachází se zde ale nenasycené mastné kyseliny, které jsou velice důležité pro správnou funkci organismu. Jedná se například o kyseliny linolovou a  $\alpha$ -linolenovou, které jsou pro lidské tělo esenciální (Kaur et al. 2014). Největší obsah nenasycených mastných kyselin, ale i vlákniny byl zaznamenán v římském salátu (Kim et al. 2016). Ze 100 g salátu lze získat zhruba 10 % doporučené denní dávky vlákniny. V dietách se zvýšeným obsahem vlákniny byl zaznamenán úbytek hmotnosti, snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění, rizika cukrovky a rakoviny tlustého střeva (Lupton et al. 2002). Stejně jako velká část zeleniny, je salát poměrně chudý na bílkoviny (Tab. 1). Locika setá je relativně dobrým zdrojem draslíku, který přispívá k snížení tlaku, ale jeho hodnoty jsou variabilní podle morfotypu, genotypu a sezóny. Bylo zjištěno, že červené listy se výrazně neliší obsahem draslíku od zelených (Koudela & Petříková 2008), ale jsou rozdílné zvýšeným obsahem rostlinných fenolů, které mají mnoho zdravotních benefitů (Kim et al. 2016). Právě rostlinné fenoly jsou hlavním nositelem antioxidační aktivity v salátu, avšak o obsahu těchto látek v jednotlivých genotypech není mnoho dostupných informací, proto je důležité optimalizovat metodu stanovení pro další studie (López et al. 2014). Co se týče obsahu fenolů v předních morfotypech podle studie od Liu et al. (2007) nejlépe vychází listový salát společně s římským, hlávkový a ledový dosahovaly zhruba polovičních hodnot. Locika setá je dále významná díky svému obsahu železa, kyseliny listové a vitamínu C (Kim et al. 2016).

Tab. 1 Výživové hodnoty salátu (převzato Celysvet)

Parametr	na 100g	DDM (100 g)
Voda	94.52 g	
Energetická hodnota	17 kcal	0.9 %
Energetická hodnota	72 kJ	0.0 %
Bílkoviny	0.9 g	2.0 %
Tuk	0.1 g	0.1 %
Minerální soli	0.47 g	7.8 %
Sacharidy	4 g	1.7 %
Vláknina	3.1 g	12.9 %
Vápník	19 mg	1.9 %
Železo	0.24 mg	1.3 %
Hořčík	10 mg	2.5 %
Fosfor	26 mg	2.6 %
Draslík	211 mg	4.5 %
Sodík	2 mg	0.1 %
Zinek	0.16 mg	1.1 %
Měď	0.051 mg	2.6 %
Mangan	0.1 mg	5.0 %
Selen	0.2 µg	0.3 %
Vitamin C	2.8 mg	4.7 %
Vitamin B1 (tiamin)	0.062 mg	4.1 %
Vitamin B2 (riboflavin)	0.027 mg	1.6 %
Vitamin B3 (niacin)	0.16 mg	0.8 %
Vitamin B5 (kyselina pantotenová)	0.145 mg	1.5 %
Vitamin B6 (pyridoxal)	0.042 mg	2.1 %
Vitamin B9 (kyselina listová, folát)	37 µg	9.3 %
Vitamin B9 (potravinářský folát)	37 µg	
Vitamin B9 (stravovací ekvivalent folátu)	37 µg	
Vitamin A	29 MJ	0.6 %
Vitamin A (ekvivalent retinolu)	1 µg	0.4 %
Nasyčené mastné kyseliny	0.024 g	0.1 %
Mononenasyčené mastné kyseliny	0.002 g	
Polynenasycené mastné kyseliny	0.044 g	
Poměrná hmotnost	53 g 1 head	

## 3.2 Rostlinné fenoly

Rostlinné fenoly zahrnují širokou skupinu sekundárních metabolitů rostlin. Celkové rostlinné fenoly můžeme označit jako TPC (total phenolic content). Řadí se sem zhruba 8000 přírodních látek. Všechny tyto látky sdílí stejnou aromatickou strukturu, což je nepolární část molekuly s alespoň jednou hydroxylovou skupinou, která tvoří polární část (Stalikas 2007, Galanakis et al. 2013). Pojem rostlinné fenoly zahrnuje fenolické kyseliny, kumariny, flavonoidy, stilbeny až po trísloviny a ligniny (Stalikas 2007). Nerozpustné rostlinné fenoly se vyskytují v buněčné stěně (Stalikas 2007), kde se podílejí na stavbě ligninu a suberinu (Bernards & Razem 2001). Rozpustné se nachází v buněčných vakuolách (Stalikas 2007). Zároveň platí, že ve vnějších vrstvách rostliny se nachází větší množství rostlinných fenolů než ve vnitřních částech (Naczka & Shadidi 2004).

Díky jejich antioxidační aktivitě a chelačním účinkům je můžeme zařadit mezi důležité přírodní látky (Maňásková 2013). Míra této aktivity závisí na počtu hydroxylových skupin, kdy dvě je minimální počet pro antioxidační účinky. Touto redukující aktivitou chrání před oxidačním stresem, který zapříčiňuje některé nemoci. Rostlinné fenoly se nevstřebávají tak dobře jako například vitaminy, není tedy jisté do jaké míry ovlivňují lidské zdraví i přes jejich běžnou konzumaci. Většina rostlinných fenolů se vstřebává v tlustém střevě, v krvi se nenachází volně, nýbrž vytváří vazby s plazmatickými bílkovinami, převážně s albuminem (Chvátalová 2006).

Nejvýznamější část rostlinných fenolů přijatých ve stravě tvoří flavonoidy, kterých je přibližně dvakrát více než fenolických kyselin, a dohromady tyto dvě skupiny tvoří téměř 100 % přijatých rostlinných fenolů. Tyto látky mají vliv i na senzorické prvky potravy (Maňásková 2013). Z výzkumu Bunning et al. (2010) vyplynulo, že vyšší obsah TPC v rostlinách salátu má negativní vliv na jeho chuť, kdy s vyšším obsahem koresponduje větší hořkost. Za hořkost mohou být zodpovědné především nízkomolekulární látky, naopak vysokomolekulární sloučeniny jsou součástí trpkosti (Maňásková 2013). V senzorických testech vyšel nejlépe genotyp Crispino, který měl TPC nejmenší. Výzkum také zkoumal vlivy počasí na TPC, kdy autoři popsali, že počasí nemá stejný vliv na všechny odrůdy salátu. Nicméně lze usoudit, že vyšší teploty okolo 30 °C mají negativní vliv na TPC. Největší roli tedy hraje genom salátu, který má přímý vliv na množství těchto látek v rostlině (Bunning et al. 2010).

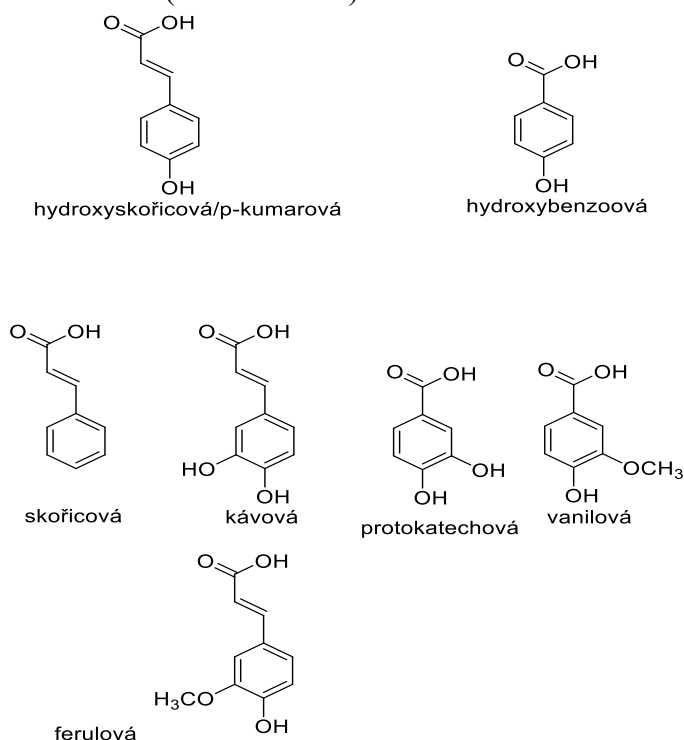
### 3.2.1 Význam rostlinných fenolů v rostlině

V rostlině zastávají několik důležitých funkcí, jsou zcela nezbytné pro růst a rozmnožování, protože se podílejí na tvorbě pigmentů rostliny a zároveň fungují jako lákadlo opylovačů. Zastávají funkci fytoalexinů, tedy chrání rostlinu před patogeny svými antimikrobiálními a antioxidačními účinky. Mimo jiné poskytují ochranu před UV zářením jeho pohlcováním (Blainski et al. 2013, Khatiwora et al. 2010) V neposlední řadě polymery rostlinných fenolů ve formě tríslovin poskytují ochranu proti okusu zvířaty, a lignany se podílejí na zpevnění buněčné stěny (Maňásková 2013).

### 3.2.2 Fenolické kyseliny

Jedná se o metabolity fenolické povahy s funkční karboxylovou skupinou. Tyto v přírodě vyskytující se fenolické kyseliny jsou odvozeny od dvou základních struktur: hydroxyškořicové a hydroxybenzoové (Obr. 1) (Stalikas 2007).

Od těchto dvou struktur můžeme na základě počtu a pozici hydroxylových skupin odvodit další fenolické kyseliny. Příklady fenolických kyselin vyskytujících se téměř v každé rostlině jsou kyselina kávová, p-kumarová, vanilová, ferulová a protokatechová (Obr. 2) (Stalikas 2007). Nejvíce je z hydroxyškořicových kyselin přijímána kávová, přičemž může tvořit až 75 % těchto derivátů přijatých ve stravě (Chvátalová 2006). V různých stádiích růstu rostliny byl zjištěn jiný obsah jednotlivých fenolických kyselin (Ellnain-Wojtaszek et al. 2001). Podle Wang a Zhenga (2001) má vliv na obsah fenolických kyselin i prostředí růstu rostliny. Pouze malá část se vyskytuje ve volné formě, většinu můžeme nalézt vázanou ve formě esterů, nebo jako glykosidy (Ghasemzadeh et al. 2011, Galanakis et al. 2013). Fenolické kyseliny jsou každý den přijímány ve stravě, podle obsahu zeleniny, ovoce, kávy atd. ve stravě konzumujeme denně přibližně 0,25–1 g (Stalikas 2007). Lidský organismus sám o sobě není schopný narušit většinu esterových vazeb. V tomto ohledu je důležitá střevní mikroflóra, která je schopná tyto vazby hydrolyzovat, a tak umožnit příjem těchto kyselin ve formě volných aglykonů (Chvátalová 2006). Díky svým antioxidačním a protizánětlivým účinkům mají příznivý vliv na zdraví člověka (Stalikas 2007).



Obr. 1 Vzorce běžných fenolických kyselin (upraveno dle Pubchem Kim et al. 2019)

### 3.3 Flavonoidy

Flavonoidy jsou skupinou přírodních látek, které mají polyfenolickou strukturu. Běžně se vyskytují ve všech rostlinných orgánech. Řadíme je mezi sekundární metabolity. Jsou známy především pro svoje vlastnosti podporující zdraví. Mají antioxidační, protizánětlivé,

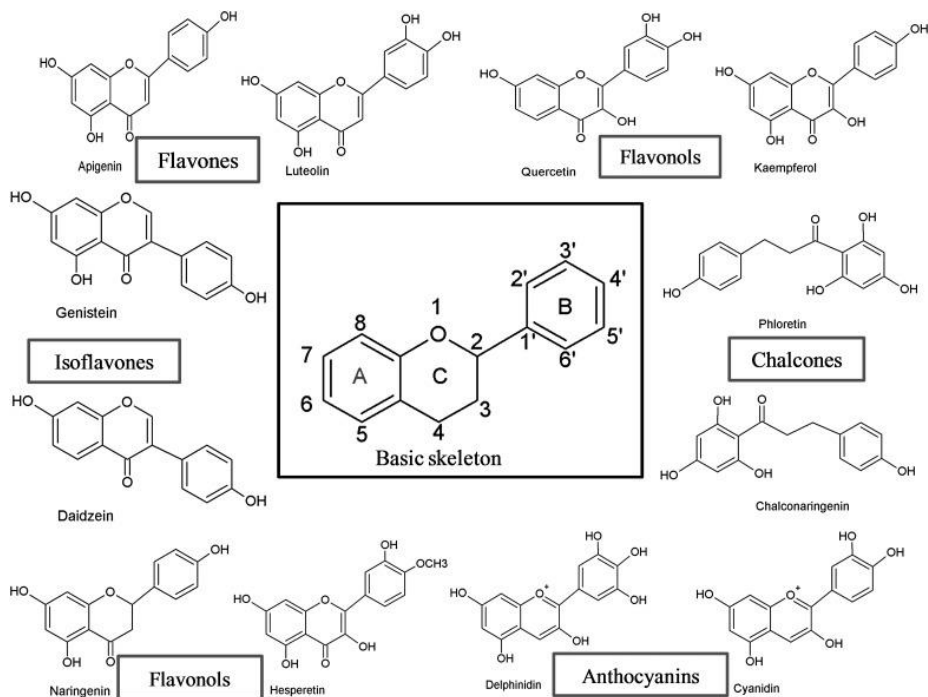
antimutagenní, antikarcinogenní účinky a schopnost modulace klíčové funkce buněčných enzymů. Mechanismy fungování flavonoidů v lidském těle nejsou zatím plně prostudovány, avšak po staletí lidé vědí, že deriváty rostlinného původu mají široké spektrum biologické aktivity. V současné době se trendy výzkumu flavonoidů týkají izolace, identifikace, charakterizace, funkce a na závěr jejich aplikace. Do budoucna mají potenciál jako léky na prevenci chronických onemocnění (Panche et al. 2016).

### **3.3.1 Význam flavonoidů v rostlině**

Tyto sekundární metabolity hrají roli v mnoha aspektech fyziologie rostlin. Jednou z nejdůležitějších rolí je transport růstového hormonu auxinu (Buer et al. 2010). Dále působí jako ochrana před stresem, jsou schopny pohlcovat UV záření, a tak chránit rostlinné orgány (Treutter 2005). Některé flavonoidy mohou být vylučovány jako kořenové exudáty do rhizosféry, kde mohou mít pozitivní i negativní interakce s okolním prostředím. Tyto exudáty ve většině případů zaujímají funkci fytoalexinů, tedy slouží k ochraně rostliny před patogeny, avšak mohou mít i signalizační funkci, což znamená, že „lákají“ symbiotické organismy do své rhizosféry. Mezi signalizační flavonoidy řadíme genistein a například daidzein (Sugiyama et al. 2008). Zároveň působí antioxidantně, kdy vychytávají volné radikály, které by poškozovaly buňku (Bais et al. 2006). Hojně jsou zastoupeny i v semenech rostlin, kde stejně jako u dospělců plní roli fytoalexinů, podílejí se na jejich dozrání a napomáhají i při klíčení (Samanta et al. 2011).

### **3.3.2 Struktura flavonoidů**

Flavonoidy jsou řazeny do široké skupiny rostlinných fenolů. Základní chemickou strukturou je flavan (Obr. 2), někdy také označován jako 2-fenylchroman. Tvoří ho 2 benzenová jádra (označována jako A, B), která jsou spojena pyranem (C). Podle hydroxylových a ketonických skupin, navázaných na základní strukturu, můžeme rozdělit flavonoidy do jednotlivých podskupin (Obr. 2). Stejně tak hraje roli místo navázání fenylu na pyran, běžně se váže na C2. U isoflavonoidů je fenyl vázán na C3. U neoflavonoidů se fenyl nachází na čtvrtém uhlíku pyranu (Panche et al. 2016).



Obr. 2 Základní struktury flavonoidů (převzato Panche et al. 2016)

### 3.3.3 Flavonoidy jako nutraceutika

Nutraceutika jsou látky vyskytující se v jídle, které mají vědecky prokázány pozitivní účinek na zdraví, včetně prevence a léčby onemocnění. Pojem zavedl Stephen DeFelice roku 1979 (Tapas et al. 2008, Dillard & German 2000). Významnou skupinou nutraceutik vyskytujících se v rostlině jsou právě flavonoidy. Jejich vlastnosti a účinky na jednotlivé onemocnění ukazuje Obr. 3.

Jak již bylo zmíněno, jejich základní a nejlépe popsanou funkcí jsou antioxidační účinky. Antioxidanty fungují na základě reakce s reaktivními formami kyslíku a volnými radikály, které by jinak mohli reagovat s tělními buňkami, což by vedlo k jejich poškození. Právě reaktivní formy kyslíku a volné radikály jsou spojovány s mnoha onemocněními (Tapas et al. 2008, Dai & Mumper 2010)

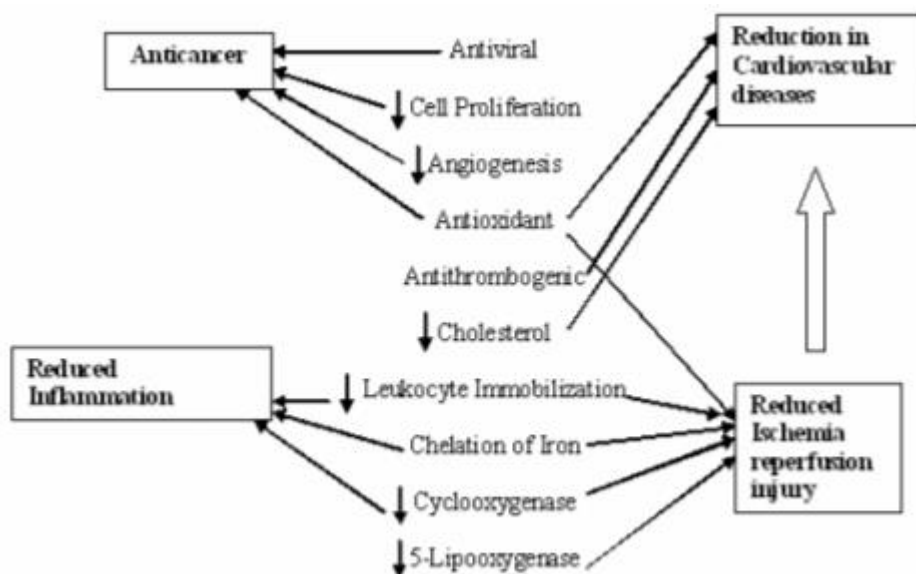
U kaempferolu, kvercetinu, morinu, myricetinu a rutinu bylo na základě jejich antioxidačních vlastností, prokázáno několik pozitivních účinků na tělo, jako je zmírnění alergické reakce, prevence rakoviny, či protizánětlivé působení. U většiny flavonolů neobsahujících cukr byly pozorovány antimikrobiální účinky. Jedním z nich je kvercetin, u kterého se prokázala kompletní inhibice růstu *Staphylococcus aureus* (Tapas et al. 2008).

Ve studiích provedených na laboratorních potkanech byly prokázány pozitivní účinky kvercetinu, kaempferolu, a rutinu na tvorbu žaludečních vředů. Právě tyto látky se aplikovali intraperitoneálně (do pobřišnice) potkanů, kde zabraňovali poškození žaludků (Tapas et al. 2008).

Studie zaměřená na roli flavonoidů v oblasti jater, prokázala, že několik derivátů mělo pozitivní vliv na ochranu a regeneraci jater. Jako nejúčinnější ochrana proti microcystinu-LR, toxinu produkovaném modrozelenými řasami, se ukázal silymarin z ostropestřce mariánského

(Tapas et al. 2008, Tůmová & Gallová 2006). Dále rutin a venoruton podporovaly regeneraci jater zasažených cirhózou (Tapas et al. 2008).

Dalšími potencionálním přínosem flavonoidů je možná podpůrná léčba diabetu a aterosklerózy. Především u kvercetin byly vyzkoumány regenerativní účinky na Langerhansovy ostrůvky slinivky poškozené streptozocinem u laboratorních potkanů. Dále bylo zjištěno, že kvercetin díky svým antioxidačním účinkům zabraňuje nežádoucím oxidacím LDL (nízkodenzitní lipoprotein), čímž funguje jako prevence aterosklerózy. Byla také prokázána záporná korelace mezi příjmem flavonoidů a obsahem LDL v plazmě (Tapas et al. 2008).



Obr. 3 Vlastnosti flavonoidů a účinky na některé choroby (převzato Tapas 2008)

### 3.3.4 Flavony

Flavony jsou považovány za jednu z nejdůležitějších skupin flavonoidů. Jsou široce rozšířeny v listech, květech a plodech. Za významné zdroje se uvádějí například celer, petržel, červená paprika, máta a *Ginko biloba*. Do této sekce lze zařadit například luteolin, apigenin, a tangeritin (Manach et al. 2004). Na základním skeletu je mezi 2. a 3. uhlíkem dvojná vazba a většina flavonů obsažených v ovoci a zelenině má hydroxylovou skupinu na kruhu A v pozici 7 a na kruhu B v pozici 3' a 4' (Panche et al. 2016).

### 3.3.5 Flavonoly

Flavonoly se vyznačují svou hydroxylovou skupinou umístěnou na třetím uhlíku kruhu C. Hojně se vyskytují v ovoci a zelenině jako například v cibuli, salátu, rajčatech, jablkách a vinné révě (Manach et al. 2004). Kromě toho jsou obsaženy i v červeném víně, kde interagují s antokyany a zodpovídají za typickou barvu červeného vína (González et al. 2004). Jedná se pravděpodobně o nejběžnější a největší skupinu flavonoidů. K nejvíce prozkoumaným patří kaempferol, kvercetin, myricetin a fysetin (Manach et al. 2004).



### 3.3.6 Flavanony

Flavanony, občas označovány jako dihydroflavony, mají kruh C nasycený. Během posledních desetiletí množství objevených flavanonů prudce stoupl. Obecně je můžeme najít ve všech citrusech, kde jsou zodpovědné za jejich hořkost. Zástupci jsou například hesperetin typický pro citróny a naringin způsobující hořkou chuť grapefruitu. Vychytávají volné radikály a jsou spojovány se snížením cholesterolu (Manach et al. 2004).

### 3.3.7 Isoflavonoidy

Isoflavonoidy jsou velkou skupinou flavonoidů. Na rozdíl od přechodných mají pouze limitovaný výskyt v rostlinách. Obsahují je především luštěniny jako například sója. Některé isoflavonoidy byly také nalezeny v mikroorganismech (Matthies et al. 2008). Od ostatních skupin se odlišují navázáním fenylu na pyran v pozici 3. Bylo zjištěno, že hrají důležitou roli jako prekurzory pro syntézu fytoalexinů, které slouží k ochraně rostliny před mikroorganismy (Aoki et al. 2000), Panche et al. 2016). Isoflavonoidy mají obrovský potenciál v boji proti řadě nemocí. Genistein a daidzein jsou fytoestrogeny, které mají estrogenní vliv i na zvířata. Do budoucna by mohli přispět k léčbě různých hormonálních i metabolických onemocnění (Szkudelska & Nogowski 2007).

### 3.3.8 Antokyany

Antokyany jsou pigmenty zodpovědné za červené až fialové zbarvení rostlin. Kyanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin a peonidin jsou nejvíce prozkoumanými aglykony antokyanů. Vyskytují se především ve vnějších buněčných vrstvách v různých druzích ovoce jako například v brusinkách, rybízu, malinách, jahodách a borůvkách. Díky svým zdravotním benefitům a zbarvení mohou být využívány v potravinářském průmyslu (Giusti & Wrolstand 2003). Jejich barva závisí na pH prostředí, ale i na navázaných methylových a acylových skupinách a může se pohybovat od oranžové přes červenou až po fialovou (Iwashina 2013, Dai & Mumper 2010).

## 3.4 Metody extrakce a detekce rostlinných fenolů

Existuje mnoho způsobů, jak extrahovat rostlinné fenoly, mezi které patří například Soxhletova, extrakce, macerace nebo ultrazvuk. Hraje zde roli několik faktorů jako chemická povaha metabolitů, provedení a délka extrakce, pH, teplota, poměr vzorek/rozpouštědlo, nebo velikost částic použitého materiálu (Stalikas 2007, Naczka & Shadidi 2004).

### 3.4.1 Faktory ovlivňující extrakci

Chemická povaha je dána chemickou strukturou, zásadní je polarita dané látky, která je ovlivněna velikostí molekuly a typem navázaných skupin. Protože je skupina rostlinných fenolů velice rozsáhlá, extrahuje se vždy více skupin, které jsou rozpustné v použitém rozpouštědle (Naczka & Shadidi 2004). Ovšem nikdy nelze vyextrahovat všechny rostlinné fenoly jedním rozpouštědlem (Sun & Ho 2005). Do výsledného roztoku se mohou také extrahovat nechtěně příměsi jako vosky, tuky, proteiny, sacharidy, terpeny a chlorofyly, což má za následek

navyšování výsledků měření (Naczka & Shadidi 2004, Sun & Ho 2005). Zásadní roli v rozpustnosti hraje stupeň polymerizace a tvorba nerozpustných komplexů s dalšími složkami vyskytujícími se v rostlině jako jsou proteiny, či sacharidy. (Dai & Mumper 2010). Tvorba komplexů s bílkovinami může mít za určitých podmínek za následek tvorbu koloidních zákalů (Čepička & Karabín 2002). Časté jsou opakované extrakce, kdy je po určitém čase vzorek přefiltrován, k rostlinnému materiálu je přidáno nové činidlo, a nakonec jsou vzorky zhomogenizovány (Stalikas 2007).

Jedním ze zmíněných faktorů, který ovlivňuje extrakci, je poměr vzorku k objemu rozpouštědla. Je nutné zvážit, jestli zvětšování objemu extrakčního činidla je správná cesta k dosažení většího výnosu vzhledem k finanční náročnosti (Dai & Mumper 2010). Podle Zhu et al. (2009), kteří zkoumali poměr rostlinný materiál/rozpouštědlo, se do poměru 1:40 (g/ml) zvyšovalo množství extrahovaných flavonoidů. Při dalším navyšování rozpouštědla již byla hodnota flavonoidů konstantní.

Dalším nezanedbatelným faktorem je velikost částic rostlinného materiálu. Meyer (2005) zkoumal vliv tohoto faktoru při extrakcích podporovaných enzymy. Velikost částic byla zcela zásadní pro správné fungování enzymů, které rozkládají buněčné struktury.

Forino et al. (2020) provedl výzkum zaměřený na změny obsahu antokyanů, taninů a TPC při různém pH ve víně. Rozsah pH činil 3,2–3,7, kdy antokyaniny vykazovaly negativní reakci se zvyšováním pH. Naopak obsah celkových fenolů a tríslovin se při vyšších hodnotách pH zvyšoval.

Podle Asami et al. (2003) hraje svou roli i proces sušení v přípravě samotného vzorku. Výzkum hodnotil TPC ve vzorcích sušených dvěma metodami – teplým vzduchem a mrazem. Z jeho závěrů vyplývá, že při sušení mrazem se látky lépe zachovaly. TPC tedy vykazoval větší hodnoty než u sušení vzduchem. Toto potvrzují i Soto et al. (2014) kdy v rostlinném materiálu sušeným mrazem bylo naměřeno vždy více TPC než v listech sušených teplým vzduchem ve všech použitých rozpouštědlech. Toto je zapříčiněno denaturací méně termostabilních látek.

Extrakční časy se běžně liší od jedné minuty po hodiny až dny (Naczka & Shadidi 2004). Teplota, při které probíhá extrakce je zcela zásadní faktor. Při vyšších teplotách se mění vlastnosti rozpouštědel, narůstá jejich schopnost rozpouštět látky, zároveň se zrychluje difúze. Zvýšená teplota látek také snižuje povrchové napětí a viskozitu, což má za následek lepší kontakt vzorku s rozpouštědlem. Z tohoto vyplývá, že zvýšení teploty zcela jednoznačně přispívá k rychlosti extrakce (Dai & Mumper 2010). Zhu et al. (2009) provedli sérii pokusů na extrakci flavonoidů při teplotách od 30 °C do 55 °C, zjistili, že největší účinnost byla při 45 °C. Další navyšování teploty snižovalo celkový obsah flavonoidů v rozpouštědle nejspíše vlivem degradace termolabilních látek.

Nevýhodou delších extrakčních dob a vysokých teplot je možnost oxidace a hydrolyzace některých termolabilních rostlinných fenolů jako například antokyanů. Tyto pro nás negativní procesy snižují celkový obsah fenolů. Proto je zcela zásadní zvolit čas a teplotu tak, aby nedošlo k degradaci látek, které se mají stanovit. Problém s oxidací může být vyřešen přidáním redukčních činidel (Naczka & Shadidi 2004, Dai & Mumper 2010).

### 3.4.2 Rozpouštědla

Volba extrakčního činidla je pravděpodobně nejdůležitějším faktorem při optimalizaci stanovení rostlinných fenolů a flavonoidů (Zhao et al. 2006). Nejpoužívanějšími rozpouštědly, co se týče extrakce rostlinných fenolů, jsou methanol, ethanol, aceton, voda a ethyl-acetát. Méně se pak vyskytují propanol a dimethylformamid. Případně se užívají jejich kombinace, což umožňuje extrakci většího spektra látek (Naczka & Shadidi 2004, Dai & Mumper 2010). Rozhodujícím faktorem je polarita rozpouštědla i extrahované látky. Nejpolarnějším rozpouštědlem je voda, ethanol a methanol mají polaritou podobnou a jsou o něco méně polární než voda (Tab. 2). Vysoká polarita alkoholů je zapříčiněna vlastní asociací, která vede k tvorbě cyklických a polymerních lineárních struktur, kdy právě tyto polymerní lineární struktury jsou vysoce polární (Henkel et al. 2018). Dle poučky „*similia similibus solvuntur*“, aby se látka do extrakčního činidla uvolnila, je pak nutné, aby tyto komponenty měly podobnou polaritu.

Například fenolické terpeny se rozpouští spíše v nepolárních rozpouštědlech jako například v hexanu. Diethylether a ethylacetát dobře rozpouští fenolické kyseliny a aglykony, které jsou méně polární než glykosidy, protože obsahují méně vodíkových můstků. Na druhou stranu rostlinné fenoly s větší molekulární hmotností a polaritou jako glykosidy flavonoidů jsou lépe extrahovány do vodných roztoků alkoholů, které jsou známy svojí vysokou polaritou (Galanakis et al. 2013, Chuang et al. 2017, Stalikas 2007). Tyto roztoky se prokázaly také jako neúčinnější, co se týče TPC (Soto et al. 2014). Tento fakt odpovídá logice věci, protože právě flavonoidy jsou nejrozšířenějšími rostlinnými fenoly v rostlinné říši (Maňásková 2013). Ve výzkumu Soto et al. (2014) zkoumali extrakční schopnosti čistých alkoholů a roztoků alkohol /voda v poměru 1:1. Zde potvrdili teorii, že přidáním vody do alkoholů se zásadně zlepší jejich schopnost rozpouštět rostlinné fenoly, díky navýšení jejich polarity. Methanol se ukázal jako vhodnější pro rostlinné fenoly s nižší molekulární hmotností, zatímco roztok acetonu s vodou zvládne rozpustit i molekuly o vysoké molekulární hmotnosti (Dai & Mumper 2010). Podle Sun & Ho (2005) v případě pohanky byl největší TPC v čistém acetonu. Účinnost čistého ethanolu a methanolu byla v jejich výzkumu srovnatelná, což odpovídá jejich podobné polaritě (Tab. 2).

Ve výzkumu Zarina & Tan (2013) zjistili, že vodný roztok methanolu je účinnější extrakční činidlo flavonoidů především v extrakcích s nižšími teplotami (50 °C), naopak vodný roztok ethanolu se ukázal jako lepší v extrakcích s teplotami od 65 °C. V tomto nejspíše hraje roli bod varu rozpouštědel, kdy methanol má menší bod varu než ethanol, což naznačuje, že var rozpouštědla nepřispívá pozitivně k jeho extrakčním vlastnostem (Zarina & Tan 2013).

Tab. 2 Polarita vybraných rozpouštědel (upraveno dle Reichardt & Welton 2010)

	Voda	Ethanol	Methanol	Aceton
Polarita	1	0,654	0,762	0,355

Při extrakci ze vzorků bohatých na antokyany se jako zvlášť účinné ukázaly alkoholy (ethanol, methanol) s přidavkem kyselin. Běžně se doporučují silné kyseliny o nízké koncentraci (1% chlorovodíková, 0,5–3% trifluoroctová). Tento systém je schopný antokyany

stabilizovat a zároveň rozpouštět cytoplazmatickou membránu, a tím napomoci extrakci z rostlinných buněk (Dai & Mumper 2010).

### 3.4.3 Metody extrakce

V poslední dekádách se kromě klasických konvenčních metod jako macerace a zahřívání začaly prozkoumávat nové způsoby, jak extrahovat požadované látky z rostlinného materiálu. Jednou z nevýhod starších metod je vysoká spotřeba rozpouštědel, což má jak finanční, tak ekologické důsledky. Mezi novější metody lze zařadit ultrazvuk nebo extrakci podporovanou tlakem (Dai & Mumper 2010).

#### 3.4.3.1 Macerace

Jedná se o metodu za laboratorní teploty neboli extrakci za studena. Před rozvojem modernějších metod v 19. století byla užívána k vyluhování účinných látek z léčivých rostlin. Existuje několik variant, přičemž za základní lze považovat maceraci v klidu bez mísení. Mezi její přednosti patří především jednoduchost na provedení a je vhodná pro látky, které snadno degradují (Mandal et al. 2015). Její zásadní nevýhodou je časová náročnost a relativně velká spotřeba rozpouštědel. Obvykle probíhá delší dobu, v případě rostlinného materiálu s pevnějším povrchem (semena) byla jako nejúčinnější zaznamenána macerace trvajících nejdelší čas (tři týdny) (González et al. 2004).

Macerace, kdy je roztok neustále mísen, se nazývá kinetická. Předností tohoto způsobu je zlepšení difúze a nehromadění koncentrovaného rozpouštědla kolem částic. Tato technika s vylepšením pomocí stlačeného oxidu uhličitého se může využívat při výrobě vína. Buňky změnou tlaku mění svou strukturu, což vede ke zlepšení extrakce senzoryckých významných látek (Mandal et al. 2015).

#### 3.4.3.2 Zahřívání

Zahřívání obecně přispívá ke zrychlení extrakcí látek z rostlinného materiálu několika způsoby. Při zvýšení teploty se zrychluje samovolného rozptylování částic (difúze). Dále klesá povrchové napětí kapalin společně s jejich viskozitou, což umožňuje lepší smáčení a pronikání rozpouštědla do rostlinného materiálu. V neposlední řadě se se zvyšující teplotou u kapalin zvyšuje bod nasycení. Rozpouštědlo je tedy schopno pojmout více extrahovatelných látek (Mandal et al. 2015).

#### 3.4.3.3 Soxhletova extrakce

Tento typ extrakce je jednou z klasických konvenčních metod. Dodnes se používá jako srovnání k dalším typům extrakce rozpouštědly. Rostlinný materiál je umístěn do patrony a do Soxhletova extraktoru, zatímco v destilační baňce se odpařuje zahřáté rozpouštědlo. To se v zpětném chladiči ochladí zpět do kapalné fáze a stéká do patrony se vzorkem, kde probíhá samotná extrakce. Když rozpouštědlo dosáhne přepadu v přepadové trubici, vrátí se opět do destilační baňky z prostoru extraktoru. Tento proces se opakuje až do ukončení extrakce. Jejimi nevýhodami jsou relativně velká spotřeba rozpouštědla, delší extrakční časy či degradace termolabilních látek. Její výhodou je přivádění čistého extrakčního činidla, tedy

lepší podmínky pro extrakci látek, s čímž souvisí, že není potřeba vzorek po ukončení filtrovat. Pro zlepšení účinku se dá kombinovat s ultrazvukem (Mandal et al. 2015).

#### 3.4.3.4 Ultrazvuk

V poslední dekádách se ultrazvuk, jako nová metoda extrakce, stal předmětem zájmu mnoha studií. Tradiční metody, které obvykle vyžadují delší extrakční časy kvůli své malé efektivitě mohou být vylepšeny či nahrazeny právě ultrazvukem. Při jeho použití se prokázalo urychlení extrakce. Další výhodou je snížení teploty oproti klasickému zahřívání, tudíž nedochází k degradaci termolabilních látek.

Ultrazvuk stojí na principu akustické energie, kterou látky nutně neabsorbují, nýbrž jimi prochází. Zvukové vlny při průchodu médii způsobují vibraci molekul, což má za následek cykly vysokého a nízkého tlaku. Během těchto cyklů se molekulární struktury stahují a roztahují. Rychlost cyklů je ovlivněna frekvencí ultrazvuku. Změny tlaku mají za následek proces „kavitace“, což znamená, že se na molekulární úrovni tvoří bubliny a dutiny, které následně implodují. Při implozi je dosaženo obrovských lokálních teplot (5000 °K) i tlaku (2000 atm). Tímto se naruší buněčné struktury, což umožní lepší průnik rozpouštědla do buněk, a tak mohou být požadované látky lépe extrahovány (Mandal et al. 2015, Dai & Mumper 2010). Bylo zjištěno, že proces kavitace za normálního tlaku nejlépe probíhá za nižších frekvencí (20 kHz) (Mandal et al. 2015).

Svoji účinnost prokázal při extrakci některých přírodních látek jako polysacharidy, esenciální oleje, bílkoviny, peptidy, barviva a pigmenty. Oproti některým metodám je levnější a snadno použitelný. Redukuje spotřebu rozpouštědel i energie (Tiwari 2015).

#### 3.4.3.5 Extrakce podporovaná tlakem

Jedná se o jednu z relativně novějších metod, běžně je označována jako PSE, nicméně existuje několik druhů této metody, které mají vlastní názvy. Princip metody stojí na zvýšeném tlaku a teplotách od laboratorních až po 200 °C. Vysoký tlak (100–140 atm) v uzavřeném systému udržuje rozpouštědlo v tekutém stavu. Systém musí být navržen tak, aby byl schopný odolat těmto podmínkám. U PSE jsou využívány stejná rozpouštědla jako u konvenčních metod, ale v porovnání s například Soxhletovou extrakcí je spotřeba rozpouštědel nízká. Vysoké teploty podporují rychlost extrakce snížením povrchového napětí, viskozity a navýšením koeficientu difúze (Mandal et al. 2015). Podle Ibañez et al. (2003) se při extrakci podporované tlakem, za užití vody jako rozpouštědla (subkritická extrakce vodou) a při zvyšující se teplotě dochází ke snížení polaritě vody. Mendiola et al. (2007) potvrdil tuto hypotézu, kdy popsal, že relativní permitivita vody při 200 °C je zhruba na úrovni methanolu a tím umožňuje extrakci látek, které by voda normálně nerozpouštěla, nebo jen v malé míře.

#### 3.4.3.6 Perkolace

Metoda perkolace využívá zařízení ve tvaru nálevky se spodním uzávěrem, perkolátoru, ve kterém je umístěn filtr. Zcela zásadním faktorem je zde opět příprava rostlinného materiálu. Prvním krokem je homogenizovat materiál na ideální velikost částic. Při příliš jemném pomletí může dojít k ucpání perkolátoru. Naopak u příliš velkých částic by extrakce nemusela být úplná. Ještě před naplněním perkolátoru je nutné rostlinný materiál smočit, aby při perkolaci nevznikala suchá místa. Při plnění by měl být materiál stlačován rovnoměrně, tak aby

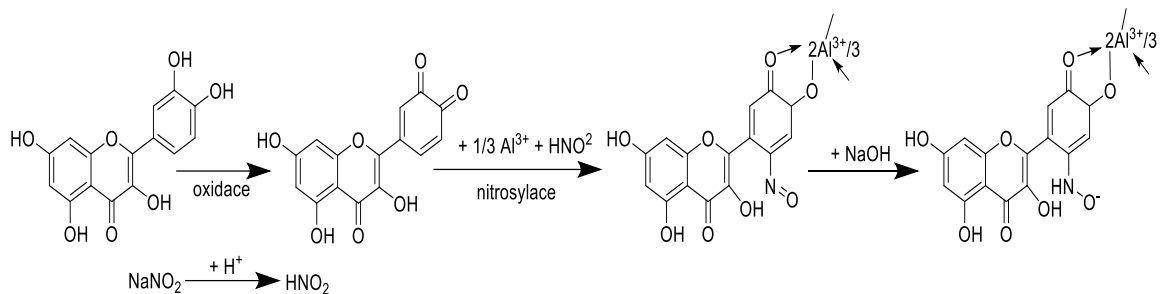
rozpouštědlo protékalo každou částí stejně. Nakonec se perkolátor doplní rozpouštědlem a spodním otvorem se nechá odkapávat extrakt. Po odkapání může být přidáno nové rozpouštědlo a jednotlivé extrakty mohou být nakonec spojeny. Perkolace může být modifikována například zvýšením teploty. Jejimi nevýhodami jsou především časová náročnost a větší spotřeba rozpouštědel (Seidel 2005).

#### **3.4.4 Folin-Ciocalteuova metoda**

Folin-Ciocalteuova metoda je nejznámější a nejčastěji používaný způsob pro zjištění celkového obsahu rostlinných fenolů (TPC) v ovoci a zelenině. Vznikla jako vylepšení Folin-Denisovy metody (Sánchez-Rangel et al. 2013). Jedná se o spektrofotometrickou metodu, kdy se využívá redukující schopnosti rostlinných fenolů, které reagují s Folin-Ciocalteuovým (FCR) činidlem, což je směs fosfomolybdenanu ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) a fosfowolframu ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ), za vzniku modře zbarvených sloučenin, které mohou být následně kvantitativně změřeny spektrofotometrem. Měření se provádí při vlnové délce okolo 760 nm. Tato reakce probíhá pouze v zásaditém prostředí, aby byla umožněna reakce všech rostlinných fenolů látek s Folinovým činidlem. Folinovo činidlo se v zásaditém prostředí rychle rozkládá, což by mělo za následek spotřebu velkého množství činidla a zároveň by vznikalo zakalení, proto Folin a Ciocalteu přidali do činidla lithiové soli, které tyto problémy eliminují (Blainski et al. 2013). Kalibrační křivka je běžně sestavena z roztoků kyseliny gallové. Její přednostmi jsou především její jednoduchost, rychlost a možnost opakovatelnosti s velice podobnými výsledky. (Khoddami et al. 2013).

#### **3.4.5 Určení flavonoidů na základě aluminiových komplexů**

Tato metoda se používá pro stanovení celkového obsahu flavonoidů (total flavonoid content, TFC) v potravinách i léčivých rostlinách. Jedná se o spektrofotometrickou analýzu, kterou popsali Christ a Müller v roce 1960 a během následujících let se metoda optimalizovala pro zlepšení její funkce. Stojí na principu tvorby komplexů skládajících se z flavonoidu a hliníku (Obr. 4), které mají červenou barvu. Na základě tvorby těchto komplexů lze určit množství flavonoidů podle množství vytvořených komplexů. (Pekal & Pyrzynska 2014, Zhu et al. 2009). Metoda má více podob, přičemž existují dva základní postupy. První metoda probíhá v kyselém prostředí za použití kyseliny chlorovodíkové a octanu sodného či, amonného. Druhá probíhá v zásaditém prostředí, využívá roztok dusitanu amonného k nitraci aromatických kruhů nesoucí katecholovou skupinu, kdy se po jeho přidání roztok zbarví do žluta, a po inkubaci je vzorek neutralizován hydroxidem sodným, což způsobí oranžové zbarvení. Pekal & Pyrzynska (2014) prováděli srovnání těchto dvou metod. Z jejich měření vyplývá, že metoda využívající alkalické prostředí zachytává zejména rutin, luteolin a katechiny, ale i některé další sloučeniny. Zatímco druhá metoda je vhodná pouze pro stanovení flavonolů a luteolinu (Pekal & Pyrzynska 2014). Kalibrační křivka je nejčastěji založena na koncentrační řadě roztoků kvercetinů či rutinu.



Obr. 4 Tvorba opticky aktivních komplexů flavonoidů (upraveno dle Pubchem, Kim et al. 2019)

### 3.5 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je univerzální metoda vhodná jak pro kvantitativní, tak i kvalitativní analýzu. Je založená na interakci hmoty se světlem. Světlo může být odráženo, lámáno, absorbováno, či vyzařováno při průchodu hmotou. Rozdílné látky ovlivňují světlo o různých vlnových délkách, a proto lze určit jak typ látky, tak její množství podle stupně změny světla procházejícího kyvetou. Jedná se o metodu srovnávací, hodnotí se množství světla prošlého srovnávací kyvetou s čistou vodou nebo slepým vzorkem a kyvetou s měřeným vzorkem (Morris 2015). Pro výpočet hodnot se používá Lambert-Beerův zákon ( $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ ). Říká, že absorbance je přímo úměrná molárnímu absorpčnímu koeficientu stanovované látky, její molární koncentraci a tloušťce vrstvy roztoku (Werner&Erhan 2017).

## 4 Metodika

### 4.1 Rostlinný materiál

Pro extrakci rostlinných fenolů a flavonoidů byly vybrány rostliny lociky seté, genotyp „Král Máje“ který se řadí mezi hlávkové saláty. Jednalo se o salát pěstovaný hydroponicky ve skleníku. Výsev probíhal do sadbovacích kostek o velikosti 25×25×40 mm ze sterilního materiálu „rockwool“. Při klíčení se pH pohybovalo mezi 5,6–6,9, vodivost (EC) během klíčení odpovídala hodnotě 1,2 mS/cm. Ve vegetačním stádiu byla EC naměřena v hodnotách kolem 1,5 mS/cm. Světelný režim byl přírodní v cca půlce vegetační sezóny, což odpovídá optimu. Teplota přes den měla rozsah 24–26 °C, v noci pak 19–21 °C. Salátu byly dodávány živiny formou živného roztoku podle Hoaglanda. Sklizeň se uskutečnila po šesti týdnech růstu. Sušení probíhalo v sušárně při teplotě 60 °C do konstantní hmotnosti. Získaná sušina pak byla v mlýnu (Obr. 5) homogenizována na prášek procházející sítím o velikosti oka 100 μm.

### 4.2 Příprava vzorků

Pro každou metodu byly vyzkoušeny 2 navážky s rozdílným objemem rozpouštědla. V prvním případě se jednalo o přibližně 0,3000 g homogenizovaného rostlinného materiálu, který byl extrahován dvakrát 15 ml rozpouštědla a následně doplněn do 25 ml v odměrné baňce. U druhého typu byla zvolena navážka s 0,2000 g rostlinného materiálu a 10 ml rozpouštědel z důvodu jejich menší spotřeby. Oba zvolené poměry byly vyzkoušeny se všemi metodami. Menší velikost zkumavek oproti varným baňkám umožnila extrakci většího počtu vzorků, což vedlo k výraznému ušetření času.

### 4.3 Podmínky extrakce

Na základě literární rešerše byly k extrakci zvoleny 4 rozpouštědla. Jednalo se o destilovanou vodu a vodné roztoky polárních rozpouštědel o následujících koncentracích: 85% ethanol, 80% methanol a 70% aceton. Roztoky byly ředěny ze zásobních roztoků před vlastní extrakcí, pro tu byly zvoleny 4 metody, které byly provedeny v laboratoři katedry botaniky a fyziologie rostlin.



### 4.3.1 Zahřívání 80 °C

Navážený rostlinný materiál byl smíšen s uvedenými rozpouštědly ve varné baňce a vložen do vodní lázně přehřáté na teplotu 80 °C pod zpětným (Liebigovým) chladičem. Do baněk byly přidány varné kamínky, aby se zabránilo skrytému varu. Protože se během práce jevílo zahřívání jako nejlepší metoda pro extrakci rostlinných fenolů, byly poté testovány 2 různé extrakční časy i navážky (viz Příprava vzorků). Délky extrakcí byly na základě literatury určeny na 30 minut a 1,5 hodiny. U každé délky byla vyzkoušena i dvoustupňová extrakce, kdy vzorek byl po polovině uplynutého času zfiltrován, a k rostlinnému materiálu byl přidán čerstvý roztok rozpouštědla. Dále proběhlo stanovení celkového objemu rozpouštědla na 25 ml a 10 ml podle navážek. Takto bylo testováno, zdali již extrahované látky mají vliv na extrakci zbylých látek.



Obr. 6 Mlýn (foto: autor, 2020)



Obr. 5 Extrakce pod Liebigovým chladičem (foto: autor, 2020)

### 4.3.2 Zahřívání 50 °C

Odvážený rostlinný vzorek byl umístěn do uzavíratelných plastových zkumavek a vložen do vodní lázně o teplotě 50 °C, přičemž zatížení způsobilo úplné ponoření. Tato metoda byla aplikována jako srovnání s ultrazvukem. Celkový čas zahřívání činil 1,5 hodiny.

### 4.3.3 Kinetická macerace

Macerace neboli extrakce za studena byla provedena mícháním na třepačce. Rostlinný materiál byl smíšen s extrakčními činidly ve zkumavkách, které se uchytily do stojanu ve skoro vodorovné poloze, protože tak nedocházelo k rychlému usazení vzorku. Extrakce probíhala 1,5 hodiny při nastavení 200 kmitů za minutu, v polovině procesu byly vzorky vyjmuty a ručně protřepány.

#### 4.3.4 Ultrazvuk

Pokus byl navržen tak, že rostlinný materiál byl smíchán s extrakčním činidlem a umístěn do zkumavek, které byly kruhově uspořádány do vodní lázně. Hrot ultrazvuku (Obr. 7) se nacházel uprostřed kruhu zkumavek pár centimetrů pod hladinou tak, aby byl od všech zkumavek umístěn stejně daleko. Výkon ultrazvuku byl 200 W o frekvenci 20 kHz s intervalem 0,9 s. Extrakce probíhala 1,5 hodiny. Zvukové vlny produkovaly teplo, kdy konečná teplota v lázni byla naměřena přibližně 50 °C.



Obr. 7 Ultrazvuk (foto: autor, 2020)



Obr. 8 Filtrace (foto: autor, 2020)

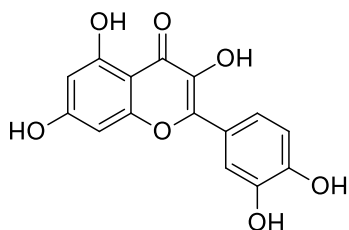
#### 4.4 Skladování vzorků

Po provedení extrakcí následovalo oddělení činidla od rostlinného materiálu odstředěním centrifugou na 10 minut při 6000 ot./min, dále proběhlo přefiltrování odstředěných vzorků přes vatou (Obr. 8). U jednotlivých druhů rozpouštědel jsme mohli pozorovat různou barvu vzorku. Nejmarkantnější rozdíl byl pozorován u vody, byla zbarvena spíše do oranžova, zatímco ostatní vzorky měly sytě zelenou barvu. Takto upravené vzorky byly uchovány v mrazicím zařízení při teplotě -20 °C do doby měření fenolů a flavonoidů.

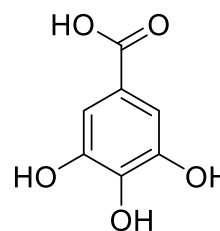
#### 4.5 Stanovení celkového fenolického obsahu

Pro stanovení celkového fenolického obsahu (TPC) byla použita Folin-Ciocalteu metoda podle Marina et al. 2005. Do čirého extraktu o objemu 0,25 ml se přidalo 0,75 ml 10x zředěného FCR a nechalo se po promíchání 6 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby inkubace bylo do vzorku napipetováno 0,8 ml 7% roztoku uhličitanu sodného, kdy vzorky získaly sytě modrou barvu. Nakonec se doplnil destilovanou vodou na konečný objem 2,5 ml. Vzorky se nechaly stát při pokojové teplotě bez přístupu světla dvě hodiny, a poté se proměřily spektrometrem při vlnové délce 760 nm. Obsah celkových fenolů byl vypočítán

pomocí kalibrační křivky připravené ze standardu kyseliny gallové (Obr. 9) (Marinova et al. 2005).



Obr. 10 Kvercetin upraveno dle Pubchem Kim et al. 2019)



Obr. 9 Kyselina gallová (upraveno dle Pubchem Kim et al. 2019)

## 4.6 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení celkových flavonoidů (TFC – total flavonoid content) proběhlo na základě spektrofotometrické metody využívající vzniku komplexu mezi flavonoidy a hliníkem podle Ying & Wan (2012). Do zkumavek se napipetovalo 0,4 ml extraktu společně s 0,16 ml destilované vody. Do této směsi se přidalo 0,12 ml 5% dusitanu sodného a nechal se 5 minut inkubovat. Po uplynutí doby inkubace byl dodán 10% roztok chloridu hlinitého a směs se ponechala stát šest minut. Vzorek se během tohoto času zbarvil do žluta. Posléze bylo napipetováno do vzorku 0,8 ml hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/l. Po přidání hydroxidu se barva vlivem změny pH na zásadité změnila na oranžovou. Vzorek byl doplněn destilovanou vodou na 2 ml. V této fázi byly pozorovatelné oranžové sraženiny, které při promíchání ředěním vymizely. Měření probíhalo téměř bez časové prodlevy od přípravy při vlnové délce 415 nm. Obsah celkových flavonoidů byl vypočítán pomocí kalibrační křivky připravené ze standardu kvercetinu (Obr. 10) (Ying & Wan 2012).

## 4.7 Analýza dat

One-way ANOVA byla použita ke stanovení rozdílu mezi kombinacemi 4 rozpouštědel, 6 metod a 2 navážek. Průkazné rozdíly mezi průměry na hladině významnosti  $\alpha=0,05$  byly dále testovány pomocí Tukey HSD post-hoc metody. Post-hoc testy se provádějí až po zamítnutí nulové hypotézy, kdy je zpravidla  $p < 0,05$  a pomáhají nalézt homogenní skupiny v testovaných datech (Lepš & Šmilauer 2016) Všechny výpočty byly provedeny pomocí softwaru STATISTICA 13.5 (Statsoft, Tulsa, USA).

### Nomenklatura

Nomenklatura byla sjednocena podle Klíče ke květeně ČR (Kaplan 2019).

## 5 Výsledky

### 5.1 Celkové fenolické látky (TPC)

Graf 1 ukazuje obsah fenolických látek s navázkou 0,2 g/10 ml v mg GAE (gallic acid equivalent) na gram sušeného rostlinného materiálu za použití různých metod a rozpouštědel. Graf 2 představuje výsledky při navážce 0,3 g/25 ml. Hodnoty se v závislosti na kombinaci variant pohybovaly od 117 mg/g (macerace s methanolem) do 230 mg/g (extrakce acetonem 80 °C 30minut).

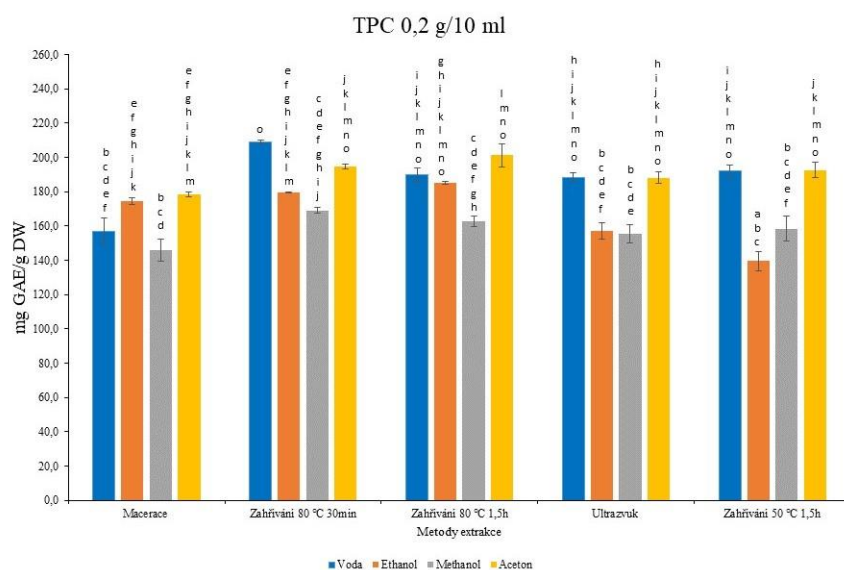
Nejvyšší hodnota TPC (230 mg/g) byla mezi jednotlivými kombinacemi rozpouštědlo-metoda-poměr navážka/rozpuštědlo nalezena u vodného roztoku 70% acetonu (Grafy 1, 2; Tab. 3). Z hlediska jeho účinnosti se vyšší koncentrace stanovovaných látek prokázala u většiny s ním zkoušených metod. Nicméně dle provedené statistiky nebyl prokázán významný rozdíl mezi jím a 85% ethanolem při zahřívání na půl hodiny při 80 °C (Graf 2), které mělo nejvyšší hodnoty TPC, rozdíl se však projevil při použití odlišné navážky (Tab. 3), kdy ale došlo k poklesu naměřených hodnot u obou rozpouštědel (Graf 1).

Kromě této metody, a macerace s navázkou 0,2 g, se ukázala voda jako účinnější než ethanol ve všech ostatních metodách, kde byly vzorky zahřívány. U půlhodinového zahřívání při 80 °C s navázkou 0,2 g dokonce byla účinnější než aceton (Graf 1). Průkazný rozdíl byl však zjištěn pouze u ultrazvuku a zahřívání při 50 °C (Graf 1). Z Grafů 1 a 2 lze vyčíst, že pro extrakci vodou je zásadní její zvýšená teplota. U macerace, která byla prováděna při laboratorní teplotě, byly pozorovány průkazně nižší hodnoty TPC v porovnání s ostatními metodami, a i v rámci obou navážek.

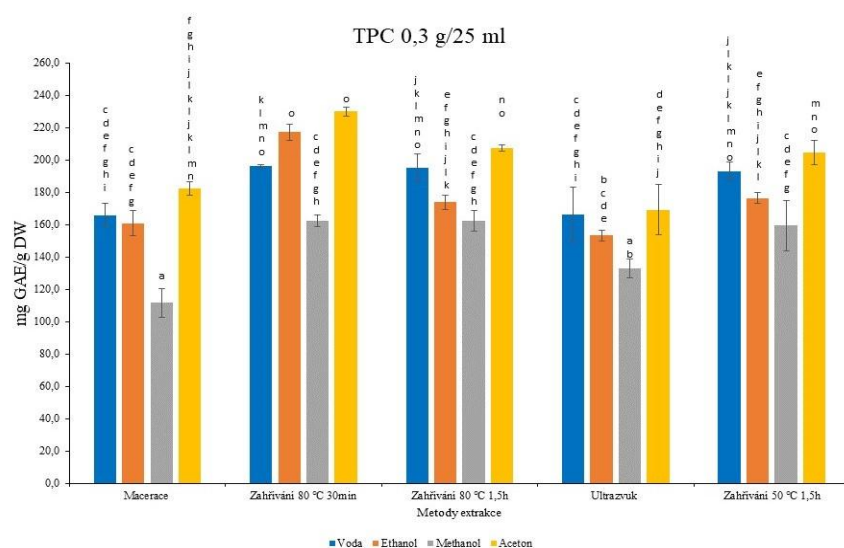
Třetí průměrně nejvyšší hodnoty byly naměřeny u 85% ethanolu. Jak bylo uvedeno výše, ethanol v jedné kombinaci dosahoval účinnosti acetonu (Graf 2), ale většinou byly hodnoty TPC při jeho použití menší nebo srovnatelné s vodou. Oproti vodě nebyl, s výjimkou jedné extrakce, pozorován pozitivní nebo významný nárůst obsahu sledované skupiny metabolitů při použití vyšších teplot. Různé navážky také neměly na extrakci signifikantní vliv (Tab. 3), pouze u dvou bylo v případě použití 0,3 gramu sušiny potvrzen výrazný nárůst TPC.

Nejméně celkových fenolů pak bylo zjištěno v 80% methanolu. Stejně tak se u navážky 0,3 projeví málo účinné metody bez přímého zahřívání, tedy macerace a ultrazvuk (Graf 2). S výjimkou macerace rovněž opět nebylo u TPC prokázáno mnoho statisticky významných rozdílů (Tab. 3) v závislosti na množství vzorku.

Z uvedených výstupů tak lze říci, že extrakce při vyšší teplotě s kratším časovým úsekem za použití acetonu jako rozpouštědla měla nejvyšší hodnoty TPC.



Graf 1. TPC s navázkou 0,2 g. V grafu jsou zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ( $F(27,80) = 9,2835$ ;  $p < 0,001$ ) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Stejná písmena označují homogenní skupiny.



Graf 2. TPC s navázkou 0,3 g. V grafu jsou zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ( $F(27,80) = 9,2835$ ;  $p < 0,001$ ) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Stejná písmena označují homogenní

Tab. 3 Srovnání rozdílů v TPC mezi odlišnými poměry navážka/rozpuštědlo. V tabulce jsou zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ( $F(27,80) = 9,2835$ ;  $p < 0,001$ ) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Hvězdičky označují průkazné rozdíly mezi dvěma sledovanými variantami navážek, n.p. – není průkazný.

Macerace				Zahřívání 80 °C 30 min				Zahřívání 80 °C 1,5h			
H2O	EtOH	MeOH	AcON	H2O	EtOH	MeOH	AcON	H2O	EtOH	MeOH	AcON
n.p.	n.p.	*	n.p.	n.p.	*	n.p.	*	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
Zahřívání 50 °C 1,5h				Ultrazvuk							
H2O	EtOH	MeOH	AcON	H2O	EtOH	MeOH	AcON				
n.p.	*	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.				

## 5.2 Celkový obsah flavonoidů (TFC)

Graf 3 obsahuje srovnání metod a rozpouštědel při navážce 0,2 g/10 ml pro extrakci celkových flavonoidů, které jsou vyjádřeny v miligramech QE (quercetin equivalents) na gram sušeného rostlinného materiálu. Graf 4 srovnává výsledky při navážce 0,3 g/25 ml. Hodnoty byly v rozmezí 150,25 mg/g (extrakce vodou 30 minut při 80 °C) až 566,344 mg/g (extrakce 85% ethanolem 1,5 hod při 80 °C).

U flavonoidů se jako nejúčinnější extrakční činidlo ukázal vodný roztok ethanolu, poté následovaly roztoky 70% acetonu, 80% methanolu a voda (Graf 3 a 4). Hodnoty ethanolu byly průkazně vyšší oproti jiným rozpouštědlům u více typů extrakcí. Významný rozdíl se projevil u ethanolu také v délce extrakce, kdy zahřívání při 80 °C na 1,5 hodiny se statisticky odlišovalo vyššími hodnotami oproti půlhodinové extrakci nezávisle na navážce. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo při zahřívání 80 °C na 1,5 hodiny s navážkou 0,3 g, které se statisticky významně lišilo od všech ostatních metod a rozpouštědel (Graf 4, Tab 4.). Zahřívání při nižší teplotě (50 °C) bylo pro TFC vhodnější než pro fenoly, při navážce 0,2 g dokonce přesáhlo hodnoty zahřívání 80 °C, avšak nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl. Roli zde pak patrně hrála i délka extrakce, která byla delší ve srovnání s půlhodinovou variantou, a měla pozitivní vliv u většiny rozpouštědel,

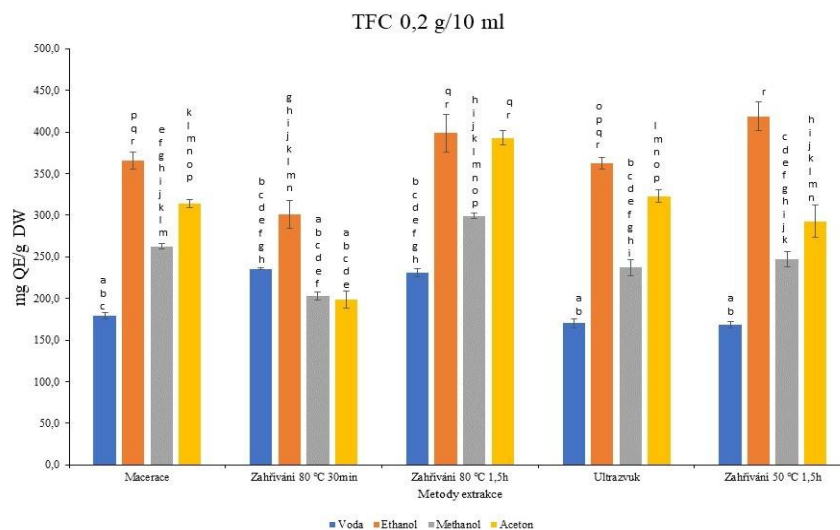
Aceton byl v tomto případě druhým nejúčinnějším rozpouštědlem pro TFC, včetně vyšších hodnot při delší extrakci. V Grafu 4 lze pozorovat, že aceton může být účinný i při nižší teplotě s větším množstvím rozpouštědla, kdy při maceraci s navážkou 0,3 g překonal hodnoty ethanolu, rozdíl byl ale neprůkazný.

Methanol extrahoval výrazně méně flavonoidů oproti ethanolu u většiny použitých metod, avšak statisticky se příliš nelišil od acetonu. S výjimkou ultrazvuku se u tohoto rozpouštědla neprojevil vliv navážky (Graf 3).

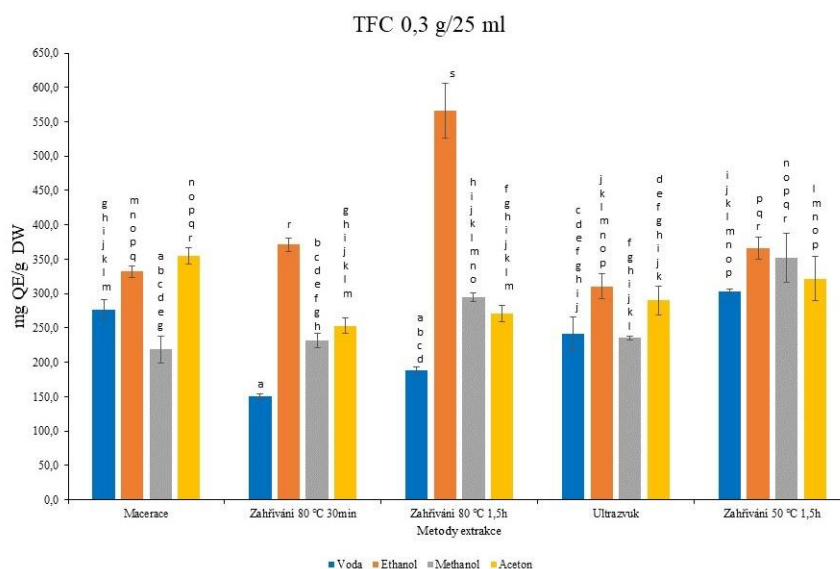
Jako nejhorší rozpouštědlo pro stanovení TFC se projevila voda, kdy její malá účinnost byla pozorována především u extrakcí s poměrem 0,2 g/10 ml rozpouštědla a teplotou menší nebo rovnou 50 °C – u macerace, zahřívání na 50 °C a ultrazvuku. U těchto metod se ale navýšením množství vody v poměru rostlinný materiál/rozpouštědlo na 0,3 g/25 ml z 0,2 g/10 ml zvýšil obsah flavonoidů.

U TFC se objevily statisticky významné rozdíly v navážkách více než u TPC, a to především u metod s vyšší teplotou extrakce (Tab. 4). Pro flavonoidy byl jako velice účinný stanoven ethanol, na rozdíl od TPC se zde delší extrakce ukázala jako vhodnější. Zároveň se ukázaly jako poměrně účinné i extrakce s nižšími teplotami než 80 °C.





Graf 3. TFC s navážkou 0,2 g. V grafu jsou zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ( $F(27,80)=19,729$ ;  $p<0,001$ ) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Stejná písmena označují homogenní skupiny



Graf 4. TFC s navážkou 0,3 g. V grafu jsou zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ( $F(27,80)=19,729$ ;  $p<0,001$ ) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Stejná písmena označují homogenní skupiny

Tab. 4 Srovnání rozdílů v TFC mezi odlišnými poměry navážka/rozpuštědlo. V tabulce jsou zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ( $F(27,80)=19,729$ ;  $p<0,001$ ) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Hvězdičky označují průkazné rozdíly mezi dvěma sledovanými variantami navážek, n.p. – není průkazný.

Macerace				Zahřívání 80 °C 30 min				Zahřívání 80 °C 1,5h			
H2	EtO	MeO	AcO	H2	EtO	MeO	AcO	H2	EtO	MeO	AcO
O	H	H	N	O	H	H	N	O	H	H	N
*	n.s.	n.s.	n.s.	*	*	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	*
Zahřívání 50 °C 1,5h				Ultrazvuk							
H2	EtO	MeO	AcO	H2	EtO	MeO	AcO				
O	H	H	N	O	H	H	N				
*	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	n.s.	*				

## 6 Diskuze

Především v posledních letech se rostlinné fenoly a flavonoidy staly předmětem mnoha studií pro své účinky podporující zdraví. Optimalizace jejich stanovení je tedy důležitá vzhledem k jejich variabilitě i mezi jednotlivými genotypy rostlin stejného druhu.

### 6.1 Optimalizace extrakce TPC

#### 6.1.1 Optimalizace rozpouštědel

Protože metabolity fenolického charakteru tvoří velice rozsáhlou skupinu přírodních látek, není jednoduché určit univerzální metodu pro jejich extrakci. Volbou rozpouštědla jsou voleny i skupiny látek, které mají být extrahovány. Jako nejuniverzálnější rozpouštědlo pro jejich extrakci se v provedeném výzkumu projevil 70% aceton. Ke stejnému závěru došli i Zhao et al. (2006), kde prováděli optimalizaci rozpouštědel pro stanovení fenolů v ječmenu setém (*Hordeum vulgare*) za použití ultrazvuku, avšak v pořadí dalších rozpouštědel se výsledky liší. V jejich výzkumu se voda projevila jako horší rozpouštědlo než vodné roztoky alkoholů, což se v provedeném výzkumu nepotvrdilo, protože voda dosahovala téměř 95 % účinnosti acetonu a u navážky 0,2 g byla dokonce vyšší (Graf 1). K podobným výsledkům došli ve své studii zaměřené na celkový obsah fenolů v čaji (*Camelia sinensis*) Bhebhe et al. (2016), kde se voda ukázala jako neúčinnější hned po roztoku acetonu. Dále prokázali, že vodné roztoky organických rozpouštědel mají lepší schopnost extrahovat fenolické látky než čistá rozpouštědla. Protože se voda a aceton značně liší ve své polaritě (Tab. 2), dá se usuzovat, že obě rozpouštědla extrahovala jiná spektra fenolických látek. Z výsledků je možné vyčíst, že pro vodu je zásadní její zvýšená teplota. U macerace, tedy při laboratorní teplotě, voda nebyla tak účinná jako u ostatních metod, které pracovaly se zvýšenou teplotou (Grafy 1 a 2). Výsledky od Bhebhe et al. (2016) korelují s naměřenými hodnotami, i co se týče ethanolu a methanolu. Vodný roztok ethanolu se ukázal jako účinnější než vodný roztok methanolu ve většině extrakcí. Tato zjištění ovšem nemusí platit pro všechny rostliny, různé druhy mohou obsahovat jiné složení fenolických látek a vzhledem k variabilitě jejich polarity může být účinnější jiné extrakční činidlo. Toto potvrdili Bhebhe et al. (2016) kdy u *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr se jako nejúčinnější rozpouštědlo ukázal vodný roztok ethanolu.

Hodnoty TPC v salátu při použití vodného roztoku acetonu byly v mém výzkumu v průměru 194 mg/g, zatímco ve výzkumu od Park et al. (2018) nedosahovaly zdaleka takových hodnot na zeleném typu salátu sušeném mrazem (průměrně 50 mg/g). K extrakci použili methanol, který byl vyhodnocen podle naměřených výsledků jako nejhorší pro extrakci fenolů (Graf 2). Přestože užití methanolu mělo zřejmě vliv na snížení jejich hodnot, nezdá se toto být hlavním důvodem odlišnosti, protože v mnou provedeném výzkumu vodný roztok methanolu dosahoval v průměru 152 mg/g. Příčina může tedy být v metodě extrakce, kdy ve výzkumu Park et al. (2018) užívali teplotu pouze 37 °C.



### 6.1.2 Optimalizace metod

V metodách extrakce, nebyly rozdíly tolik zřetelné, což potvrzuje tvrzení ze studie Zhao et al. 2006, které říká, že nejdůležitějším faktorem pro stanovení fenolů je volba rozpouštědla. Nicméně i metoda extrakce je nezanedbatelnou proměnou. Jako nejúčinnější se ukázalo zahřívání pod Liebigovým chladičem ve vodní lázni zahřáté na 80 °C. Ve studii Muhamad et al. (2014) zjistili, že optimální teplota pro stanovení fenolů je 70–80 °C. Naměřené výsledky tedy potvrzují tento závěr (Graf 2). Možných důvodů pro to je několik, přispívá k tomu především zlepšení difúze, snížení povrchového napětí, viskozity a schopnost rozpouštědla pojmout více látek. Tato studie zároveň říká, že optimální čas pro extrakci fenolů jsou 3 hodiny. Tak dlouhé extrakční časy byly na začátku vyloučeny z důvodu možné degradace fenolických látek při zvýšené teplotě a časové náročnosti. Nicméně v dalších výzkumech by se tento faktor mohl prozkoumat lépe.

Jak již bylo uvedeno, zahřívání na 50 °C, které se provádělo za účelem srovnání s ultrazvukem, se ukázalo jako druhá nejúčinnější metoda extrakce pro stanovení TPC. Ultrazvukové vlny způsobují zahřátí vodní lázně, na konci byla teplota média 48 °C, tedy jen o 2 °C méně než u zahřívání 50 °C. Hodnoty vzorků z ultrazvuku byly o něco menší než ze zahřívání 50 °C. Lze tedy usoudit, že ultrazvukové vlny neměly zásadní vliv na extrakci. Toto by mohlo být dáno způsobem uspořádání ultrazvukové lázně, kdy hrot nebyl přímo v extraktu ale ve vodní lázni, do které se umístily zkumavky. Ultrazvukové vlny tedy pravděpodobně nepenetrovaly do rostlinného materiálu a zvýšené hodnoty oproti kinetické maceraci způsobilo zahřátí (Mandal et al. 2015). Kinetická macerace vyšla jako nejméně efektivní způsob extrakce. Vzhledem k tomu, že macerace obvykle probíhá delší čas, byly nejspíše malé hodnoty způsobeny nedostatečnou délkou. Další faktor kinetické macerace je pohyb rostlinného materiálu v rozpouštědle, bohužel z hlediska uspořádání pokusu nebylo možné zajistit, aby se rostlinný materiál neusazoval, což nejspíše také mělo negativní vliv na extrakci.

### 6.1.3 Další faktory ovlivňující extrakci

Odchytky ve stanovení TPC mohou být způsobeny více faktory. Jedním z nich je, že Folin-Ciocalteuovo činidlo reaguje i s jinými než fenolickými látkami, což má za následek navyšování hodnot. Tyto sloučeniny jsou nejčastěji vitamin C a redukující cukry, které se vyskytují i v salátu (Sánchez-Rangel et al. 2013, Ahmed et al. 2019). Mohammedi & Atik (2011) provedli studii na přítomnost fytochemikálií v *Tamarix aphylla* (L.) Karst za použití vody, vodných roztoků ethanolu, methanolu a acetonu jako extrakčních činidel. Zjistili, že redukující cukry se extrahovaly pouze do vody. Největší problém při stanovení často představuje vitamin C, a to především u druhů s jeho vysokým obsahem. Známkou vysokého obsahu vitamínu C, či jiných redukujících látek je modré zbarvení vzorku ještě před přidáním zásadité látky (Sánchez-Rangel et al. 2013). Ve výzkumu Sánchez-Rangel et al. (2013) se zabývali eliminováním nežádoucích redukujících sloučenin v extraktech z jahod. Při použití peroxidu vodíku se celkové množství naměřených fenolů snížilo o 54 %. Avšak jahody oproti salátu mají mnohonásobně vyšší obsah vitamínu C, proto by u lociky neměly být výsledky zásadně zkresleny. To potvrdilo i zjištění, že u extraktů nevzniká modré zbarvení před přidáním

uhličitanu sodného. Dalším zkoumaným faktorem byl poměr rostlinný materiál/rozpouštědlo. Naczka & Shadidi (2004) uvádí, že při změně poměru ze 1:5 na 1:10 se u extrakce z komerčně vyráběných řepkových mouk zvýšil TPC ze 773,5 mg/100 g na 805,8 mg/100 g za použití acetonu. Zaznamenal tedy nárůst o 4,18 % při dvojnásobném množství rozpouštědla. V provedeném výzkumu, kde byly poměry 0,2 g/10ml a 0,3 g/25ml, nebyly zaznamenány výrazné rozdíly v extrahovaných rostlinných fenolech (Grafy 1, 2, Tab. 3). Navyšování rozpouštědla tak má pravděpodobně účinek jen do určitého poměru.

Bylo také zjištěno, že sytost barvy výsledného vzorku určenému k měření nutně neodpovídá hodnotě fenolů. U některých tmavších vzorků bylo totiž naměřeno méně než u světlejších.

## 6.2 Optimalizace extrakce TFC

### 6.2.1 Optimalizace rozpouštědel

Ve výsledcích se ukázalo, že zdaleka nejúčinnějším rozpouštědlem pro extrakci flavonoidů se projevil vodný roztok ethanolu o koncentraci 85 % (Graf 3, 4). Do et al. (2014) ve svém článku zaměřeném na optimalizaci stanovení TPC a TFC v *Limnophila aromatica* Merrill potvrzují, že ethanol je nejvhodnější rozpouštědlo pro extrakci flavonoidů, kdy u nich čistý ethanol měl větší celkový výnos flavonoidů než jeho 75% roztok. Naopak ve výzkumu Muhamad et al. (2014) na karambole tupé (*Averrhoa bilimbi* L.) prokázali, že vodné roztoky alkoholů mnohem lépe extrahují rostlinné fenoly i flavonoidy než jejich čisté formy. Toto potvrzují Fernandes et al. (2012) kdy se v jejich studii jako nejúčinnější ukázal 80% ethanol. Stejně jako ve studii Do et al. (2014) byl druhým nejúčinnějším rozpouštědlem aceton ve většině extrakcí.

Navýšení množství rozpouštědla mělo velký vliv především u vody. Podobně se chovala i ostatní rozpouštědla, kdy s větším množstvím rozpouštědla hodnoty flavonoidů rostly. Zároveň podle provedené statistiky bylo nalezeno více signifikantních rozdílů než u TPC (Tab. 3, 4), proto lze usoudit, že navýšení množství rozpouštědla při extrakci flavonoidů má pozitivní vliv na TFC.

Na rozdíl od fenolů se u flavonoidů liší mé hodnoty od výzkumu Park et al. (2018) relativně málo. Jejich celkový obsah flavonoidů v zeleném salátu při použití methanolu se lišil v pár desítkách i přes rozdílnost metod.

### 6.2.2 Optimalizace metod

V případě použitých metod extrakce nebyly výsledky TFC tolik zřejmé jako u TPC. Zahřívání 80 °C na 1,5 hodiny při navážce 0,3 g/25ml se ukázalo jako nejúčinnější metoda, avšak zahřívání při 50 °C dosahovalo také vysokých hodnot zvláště při navážce 0,2 g s ethanolem. Zahřívání na 30 min při 80 °C se v průměru ukázalo jako vůbec nejhorší metoda, toto může být způsobeno výše zmíněnou kratší dobou extrakce. Muhamad et al. (2014) zjistili, že nejlepší teplota pro extrakci flavonoidů je kolem 38 °C s délkou 60 minut, delší extrakce měly negativní vliv na hodnoty celkových flavonoidů. To rozporují Bimakr et al. (2011) kdy ve výzkumu na máté klasnaté (*Mentha spicata*) zjistili, že v rozmezí teplot 40–60 °C byla nejúčinnější teplota nejvyšší, tedy 60 °C.

Z dosavadních poznatků může být usouzeno, že stanovení délky zahřívání 80 °C na jednu hodinu by mohlo být správným krokem optimalizace, kdy by mohla vzniknout účinnější metoda vhodná pro extrakci jak TFC, tak i TPC.

Kinetická macerace se u flavonoidů podle předpokladů ukázala účinnější než u TPC. Důvodem je vyšší optimální teplota pro extrakci rostlinných fenolů a termolabilnost flavonoidů. Jako nejméně účinný se prokázal ultrazvuk. To podporuje předpoklad uvedený u TPC, že ultrazvukové vlny nepronikly až k rostlinnému materiálu a jejich účinnost byla tedy velmi malá.

## 7 Závěr

Tato práce se zaměřovala na optimalizaci extrakce pro stanovení celkových fenolických látek a flavonoidů v locice seté, zároveň dává základní přehled o tomto rostlinném druhu a jeho přínosu pro lidské zdraví. Dále poskytuje informace o rostlinných fenolech a podrobněji rozebírá jejich podskupinu flavonoidy. Právě tyto sekundární metabolity jsou předmětem mnoha studií pro své pozitivní účinky na lidské zdraví. Tyto vlastnosti spočívají v antioxidačních a chelatačních schopnostech. V řadě studií bylo prokázáno, že fungují při možné prevenci chorob způsobených oxidačním stresem jako jsou například rakovina a kardiovaskulární onemocnění.

Praktická část porovnávala několik rozpouštědel a metod extrakce, které se více či méně používají pro stanovení těchto sekundárních metabolitů. Hypotéza, že metoda a druh rozpouštědla mají vliv na TPC a TFC na jejich extrakci v sušině lociky seté, byla potvrzena.

Z naměřených výsledků bylo zjištěno, že především druh extrakčního činidla je zásadním faktorem při extrakci, kdy vodný roztok acetonu o koncentraci 70 % byl nejvhodnější pro rostlinné fenoly společně s destilovanou vodou. Tento fakt naznačuje rozmanitost fenolických látek ve vzorku salátu. Jako nejvhodnější metoda pro extrakci rostlinných fenolů bylo zjištěno zahřívání 30 minut pod Liebigovým chladičem ve vodní lázni o teplotě 80 °C.

V případě flavonoidů se jako zdaleka nejúčinnější rozpouštědlo projevil vodný roztok ethanolu o koncentraci 85 %, jedná se o poměrně polární roztok, lze tedy usoudit, že extrahovány byly látky především vyšší polaritou, jako jsou například flavonoidní glykosidy. V případě metod extrakce u flavonoidů se zahřívání na 1,5 hodiny při 80 °C a navážce 0,3 g ukázalo jako nejvhodnější, avšak zahřívání při 50 °C se, při stejné navážce 0,2 g, podobalo zahřívání 80 °C. Optimalizace teploty a také doby extrakce flavonoidů by tedy mohla být do budoucna více prozkoumána. Pro toto zkoumání by bylo vhodné použít stejný genotyp salátu, protože se v jednotlivých genotypech mohou obsahové látky lišit. Avšak bylo zjištěno, že nejdůležitějším faktorem při extrakci flavonoidů je stejně jako u rostlinných fenolů volba rozpouštědla.

Výsledky rovněž ukázaly malou účinnost vodného roztoku methanolu, který je jedním z nejpoužívanějších rozpouštědel pro extrakci rostlinných fenolů a flavonoidů. Na tyto výsledky by tak mohl následně navázat výzkum týkající se optimalizace vlastního stanovení TPC a TFC v extraktech pro ověřenou metodu analýzy těchto sekundárních metabolitů v sušině lociky seté, genotyp 'Král Máje'.

## 8 Literatura

- Ahmed S, Ahmed S, Roy SK, Woo SH, Sonawane KD, Shohael AM. 2019. Effect of salinity on the morphological, physiological and biochemical properties of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in Bangladesh. *Open Agriculture* **4**:361–373.
- Aoki T, Akashi T, Ayabe S. 2000. Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. *Journal of Plant Research* **113**:475
- Asami DK, Hong YJ, Barret DM, Mitchell AE. 2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**:1237–1241.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual reviews of Plant Biology* **57**:233–266.
- Bělohlávková R, et al. 2004. Květena České republiky. Academia, Praha.
- Bernards MA, Razem FA. 2001. The poly (phenolic) domain of potato suberin: a non-lignin cell wall bio-polymer. *Phytochemistry* **57**:1115–1122.
- Bhebbe M, Füller TN, Chipurura B. 2016. Effect of solvent type on total phenolic content and free radical scavenging activity of black tea and herbal infusions. *Food Analytical Methods* **9**:1060–1067.
- Bimakr M, Rahman RA, Taip FS, Ganjloo A, Salleh LM, Seleamat J, Hamid A, Zaidul ISM. 2011. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and bioproducts processing* **89**:67–72.
- Blainski A, Lopes GC, De Mello JCP. 2013. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* **18**:6852–6865.
- Buer CS, Imin N, Djordjevic MA. 2010. Flavonoids: new roles for old molecules. *Journal of integrative plant biology* **52**:98–111.
- Bunning ML, Kendall PA, Stone MB, Stonaker FH, Stushnoff C. 2010. Effects of seasonal variation on sensory properties and total phenolic content of 5 lettuce cultivars. *Journal of food science* **75**:156–161.
- Čepička J, Karabín M. 2002. Polyfenolové látky piva – přirozené antioxidanty. *Chemické listy* **96**:90–95.
- Dai J, Mumper RJ. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**:7313–7352.
- Dillard CJ, German JB. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**:1744–1756.

- Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju YH. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis* **22**:296–302.
- Ellnain-Wojtaszek M, Kruczynski Z, Kasprzak J. 2001. Analysis of the content of flavonoids, phenolic acids as well as free radicals from *Ginkgo biloba L.* leaves during the vegetative cycle. *Acta poloniae pharmaceutica* **58**:205–210.
- Fernandes AJD, Ferreira MRA, Randau KP, de Souza TP, Soares LAL. 2012. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). *The Scientific World Journal* **2012**:923462.
- Forino M, Picariello L, Rinaldi A, Moio L, Gambuti A. 2020. How must pH affects the level of red wine phenols. *LWT – Food Science and Technology* **129**:109546.
- Galanakis CM, Goulas V, Tsakona S, Manganaris GA, Gekas V. 2013. A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *International Journal of Food Properties* **16**:382–396.
- Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Rahmat A. 2011. Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* **5**:1147–1154.
- Giusti MM, Wrolstand RE. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical engineering journal* **14**:217–225.
- González-Manzano S, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. 2004. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta* **513**:283–289.
- Henkel S, Misuraca MC, Troselj P, Davidson J, Hunter CA. 2018. Polarisation effects on solvation properties of alcohols. *Chemical science* **9**:88–99.
- Chvátalová K. 2006. Studium antiradikálové aktivity fenolových kyselin a jejich vlivu na redoxní stav železa a mědi. [PhD. Thesis]. Masarykova univerzita. Brno.
- Chuang SY, Lin YK, Lin CF, Wang PW, Chen EL, Fang JY. 2017. Elucidating the skin delivery of aglycone and glycoside flavonoids: How the structures affect cutaneous absorption. *Nutrients* **9**:1304.
- Ibañez E, Kubátová A, Señoráns FJ, Cavero S, Reglero G, Hawthorne SB. 2003. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**:375–382.
- Iwashina T. 2013. Flavonoid properties of five families newly incorporated into the order *Caryophyllales*. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science* **39**:25–51.
- Kaplan Z. 2019. Klíč ke květeně české republiky. Academia.
- Kaur N, Chugh V, Gupta AK. 2012. Essential fatty acids as functional components of foods. *Journal of Food Science and Technology* **51**:2289-2303.

- Khatiwora E, Adsul VB, Kulkarni MM, Deshpande NR, Kashalkar RV. 2010. Spectroscopic determination of total phenol and flavonoid contents of *Ipomoea carnea*. International Journal of ChemTech Research **2**:1698–1701.
- Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. Molecules **18**:2328-2375.
- Kim JM, Moon Y, Tou JC, Mou B, Waterland NL. 2016. Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Journal of Food Composition and Analysis **49**:19–34.
- Kim S, et al. 2019. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. Pubchem, Bethesda. Available from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed March 2021).
- Koudela M, Petříková K. 2008. Nutrients content and yield in selected cultivars of leaf lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*). Horticultural Science **35**:99–106.
- Křístková E, Doležalová I, Lebeda A, Vinter V, Novotná A. 2008. Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. Horticultural Science **35**:113–129.
- Lepš J, Šmilauer P. 2016. Biostatistika. Nakladatelství Jihočeské univerzity, České Budějovice.
- Liu X, Ardo S, Bunning M, Parry J, Zhou K, Stushnoff C, Stoniker F, Yu L, Kendall P. 2007. Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. LWT – Food Science and Technology **40**:552–557.
- Lupton JR, Brooks JA, Butte NF, Caballero B, Flatt J, Fried SK. 2002. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. National Academy Press **5**:589–768.
- López A, Javier GA, Fenoll J, Hellín P, Flores P. 2014. Chemical composition and antioxidant capacity of lettuce: Comparative study of regular-sized (Romaine) and baby-sized (Little Gem and Mini Romaine) types. Journal of Food Composition and Analysis **33**:39–48.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. The American journal of clinical nutrition **79**:727–747.
- Maňásková V. 2013. Extrakce fenolových kyselin z rostlinných potravin pevného charakteru. [MSc. Thesis]. Univerzita Tomáše Bati, Zlín.
- Mandal SC, Mandal V, DAS AK. 2015. Classification of Extraction Methods. Pages 83–136 in Mandal SC, Mandal V, DAS AK, editors. Essentials of botanical extraction: Principles and applications. Academic Press, USA.
- Matthies A, Clavel T, Gütschow M, Engst W, Haller D, Blaut M, Braune A. 2008. Conversion of daidzein and genistein by an anaerobic bacterium newly isolated from the mouse intestine. Applied and Environmental Microbiology **74**:4847–4852.
- Marinova D, Ribarova F, Atanassova Maria. 2005. Total phenolics and flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy **40**:255–260.

- Mendiola JA, Herrero M, Cifuentes A, Ibañez E. 2007. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *Journal of Chromatography* **1152**:234–246.
- Meyer ABS. 2005. Enzymatic upgrading of antioxidant phenolics in berry juice and in press residues. *Fruit Processing* **6**:382–387.
- Mohammedi Z, Atik F. 2011. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **2**:609–615.
- Muhamad N, Muhmed SA, Yusoff MM, Gimbun J. 2014. Influence of solvent polarity and conditions on extraction of antioxidant, flavonoids and phenolic content from *Averrhoa bilimbi*. *Journal of Food Science and Engineering* **4**:255–260.
- Morris R. 2015. Spectrophotometry. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* **11**:2.1.1–2.1.30.
- Nacz M, Shadidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A* **1054**:95–111.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science* **5**:e47
- Park CH, Yeo HJ, Baskar TB, Kim JK, Park SU. 2018. Metabolic Profiling and Chemical-Based Antioxidant Assays of Green and Red Lettuce (*Lactuca sativa*). *Natural product communications* **13**:315–322.
- Pekal A, Pyrzynska K. 2014. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods* **7**:176–1782.
- Reichardt C, Welton T. 2010. Appendix A. Properties, Purification, and Use of Organic Solvents. Pages 549–586 in Reichardt C, Welton T, editors. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, USA.
- Samanta A, Das G, Das SK. 2011. Roles of flavonoids in plants. *Carbon* **100**:12–35.
- Sánchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. 2013. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods* **21**:5990–5999.
- Seidel V. 2005. Initial and Bulk Extraction. Pages 27–46 in Sarker SD, Latif Z, Gray AI, editors. *Natural Products Isolation*. Humana Press. USA.
- Soto C, Caballero E, Pérez E, Zúñiga ME. 2014. Effect of extraction conditions on total phenolic content and antioxidant capacity of pretreated wild *Peumus boldus* leaves from Chile. *Food and Bioproducts Processing* **92**:328–333.
- Stalikas CD. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science* **30**:3268–3295.
- Sugiyama A, Shitan N, Yazaki K. 2008. Signaling from soybean roots to rhizobium: an ATP-binding cassette-type transporter mediates genistein secretion. *Plant Signaling & Behavior* **3**:38–40.



- Sun T, Ho CT. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food chemistry* **90**:743-749.
- Szkudelska K, Nogowski L. 2007. Genistein—a dietary compound inducing hormonal and metabolic changes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **105**:37–45.
- Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. 2008. Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical journal of Pharmaceutical research* **7**:1089–1099.
- Tiwari BK. 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **71**:100–109.
- Treutter D. 2005. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant biology* **7**:581–591.
- Tůmová L, Gallová K. 2006. Terapeutické účinky *Silybum marianum*. *Praktické lékařství* **2**:182–183.
- Wang SY, Zheng W. 2001. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of agricultural and food chemistry* **49**:4977–4982.
- Werner M, Erhan D. 2017. UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **173**:965–968.x
- Ying C, Wan D. 2012. Quantitative determination of total and individual flavonoids in stems and leaves of *Buddleja davidii* and *Buddleja albiflora*. *Pharmacognosy magazine* **8**:273–279.
- Zarina Z, Tan SY. 2013. Determination of flavonoids in *Citrus grandis* (Pomelo) peels and their inhibition activity on lipid peroxidation in fish tissue. *International Food Research Journal* **20**:313–317.
- Zhao H, Dong J, Lu J, Chen J, Li Y, Shan L, Lin Y, Fan W, Gu G. 2006. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* **54**:7277–7286.
- Zhu H, Wang Y, Liu Y, Xia Y, Tang T. 2009. Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. *Food Anal. Methods* **3**:90–97.

### Citace obrázků

- Kalorická tabulka hlávkového salátu. In Celysvet [online]. [Cit. 12.3.2021]. Dostupné z: <http://www.celysvet.cz/recepty-potraviny-salat-hlavkovy-kalorie-slozeni-nutricni-hodnoty>
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Chemické struktury flavonoidů. 2016. In *Flavonoids: an overview*. *Journal of nutritional science* **5**:e47 [Online]. [Cit. 12.3.2021]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5465813/>
- Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Vlastnosti flavonoidů a účinky na některé choroby. 2008. In *Flavonoids as nutraceuticals: a review*. *Tropical journal of Pharmaceutical research* **7**:

## Seznam tabulek

Tab. 1 Výživové hodnoty salátu (převzato Celysvet) .....	11
Tab. 2 Polarita vybraných rozpouštědel (upraveno dle Reichardt & Welton 2010) .....	19
Tab. 3 Srovnání rozdílu v TPC mezi odlišnými poměry navážka/rozpouštědlo. V tabulce jsou zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ( $F(27,80) = 9,2835$ ; $p < 0,001$ ) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Hvězdičky označují průkazné rozdíly mezi dvěma sledovanými variantami navážek, n.p. – není průkazný. ....	29
Tab. 4 Srovnání rozdílu v TFC mezi odlišnými poměry navážka/rozpouštědlo. V tabulce jsou zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ( $F(27,80) = 19,729$ ; $p < 0,001$ ) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Hvězdičky označují průkazné rozdíly mezi dvěma sledovanými variantami navážek, n.p. – není průkazný. ....	31

## Seznam obrázků

Obr. 1 Vzorce běžných fenolických kyselin (upraveno dle Pubchem Kim et al. 2019) .	13
Obr. 2 Základní struktury flavonoidů (převzato Panche et al. 2016) .....	15
Obr. 3 Vlastnosti flavonoidů a účinky na některé choroby (převzato Tapas 2008) .....	16
Obr. 4 Tvorbá opticky aktivních komplexů flavonoidů (upraveno dle Pubchem, Kim et al. 2019) .....	23
Obr. 5 Extrakce pod Liebigovým chladičem (foto: autor, 2020) .....	25
Obr. 6 Mlýn (foto: autor, 2020) .....	25
Obr. 7 Ultrazvuk (foto: autor, 2020) .....	26
Obr. 8 Filtrace (foto: autor, 2020) .....	26
Obr. 10 Kyselina gallová (upraveno dle Pubchem Kim et al. 2019) .....	27
Obr. 9 Kvercetin upraveno dle Pubchem Kim et al. 2019) .....	27

## Seznam grafů

Graf 1. TPC s navážkou 0,2 g. V grafu jsou zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ( $F(27,80) = 9,2835$ ; $p < 0,001$ ) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Stejná písmena označují homogenní skupiny .....	29
Graf 2. TPC s navážkou 0,3 g. V grafu jsou zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ( $F(27,80) = 9,2835$ ; $p < 0,001$ ) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Stejná písmena označují homogenní skupiny .....	29
Graf 3. TFC s navážkou 0,2 g. V grafu jsou zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ( $F(27,80) = 19,729$ ; $p < 0,001$ ) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Stejná písmena označují homogenní skupiny .....	31
Graf 4. TFC s navážkou 0,3 g. V grafu jsou zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ( $F(27,80) = 19,729$ ; $p < 0,001$ ) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Stejná písmena označují homogenní skupiny .....	31