

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2021

Bc. Adriana Čáková



**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

**STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ A ANTIOXIDAČNÍ  
AKTIVITY VYBRANÝCH BYLINNÝCH EXTRAKTŮ**

DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SELECTED HERBAL EXTRACTS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Adriana Čaková**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

**BRNO 2021**



## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1542/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Adriana Čaková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Stanovení antimikrobiální a antioxidační aktivity vybraných bylinných extraktů

### Zadání diplomové práce:

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

### Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

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

-----  
Bc. Adriana Čaková  
student(ka)

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

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Migrénovník (*Tetradenia* spp.) je rostlina přirozeně se vyskytující v Africe patřící do čeledi *Lamiaceae*, která je využívána v tradiční medicíně k léčbě malárie, angíny nebo k ošetření tropických onemocnění kůže. Pro získání bioaktivních látek byla z řady extrakčních metod vybrána macerace. Byla provedena optimalizace jejích podmínek, která se zaměřila na co možná nejvyšší získání bioaktivních sloučenin. Jako optimální byla vybrána teplota 60 °C, doba extrakce 40 minut, rozpouštědlo 40% ethanol a poměr navážky a rozpouštědla 1:5.

V takto získaném „optimálním“ extraktu bylo celkem identifikováno 63 aromaticky aktivních sloučenin. Největší zastoupení představovaly terpeny (88,60 %), z nich pak zejména kyslíkaté monoterpeny (55,65 %) a monoterpeny (29,52 %). Nejvíce zastoupenými sloučeninami byly kafr (51,76 %), *cis*- $\beta$ -ocimen (8,17 %), 3-oktanol acetát (7,71 %), *trans*- $\beta$ -ocimen (6,76 %),  $\gamma$ -terpinen (4,93 %), *o*-cymen (3,81 %), terpinolen (1,33 %), limonen (1,33 %), kamfen (1,19 %) a borneol (1,20 %). Dále byl stanoven celkový obsah polyfenolů  $0,31 \pm 0,02 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{ml}^{-1}$ , který odpovídá  $1,52 \pm 0,11 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  rostliny. Antioxidační aktivita činila  $417,56 \pm 32,84 \mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}$  a procento zhášení radikálu ABTS<sup>•+</sup>  $88,99 \pm 7,00 \%$ . Na závěr byla ověřena antimikrobiální aktivita optimálního extraktu vůči bakteriím *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* a kvasince *Candida glabrata*. Vůči *E. coli* a *C. glabrata* nevykazoval extrakt žádnou antimikrobiální aktivitu. Vůči *B. cereus* byla pozorována slabá antimikrobiální aktivita.

Získané výsledky potvrzují, že migrénovník obsahuje řadu zajímavých aromaticky aktivních látek, vykazuje antioxidační i antimikrobiální aktivitu a má tak dobrý potenciál pro využití jako přírodní zdroj nutričně i sensoricky cenných látek např. do různých potravin a pochutin.

## KLÍČOVÁ SLOVA

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

## ABSTRACT

*Tetradenia* spp. is herb naturally growing in Africa and is part of family called *Lamiaceae*. The herb is used in traditional medicine to cure malaria, angina or as treatment for tropical skin diseases. Maceration was chosen from number of extraction methods, to obtain bioactive compounds from this plant. Optimization was performed with aim to retrieve as much of bioactive compounds as possible. Optimal conditions chosen were: temperature 60 °C, extraction time 40 minutes, solvent 40% ethanol and solid-solvent ratio 1:5.

In total 63 aromatic active compounds were found in optimal extract. Terpenes were the most abundant (88,60 %), from them oxygenated monoterpenes (55,65 %) and monoterpenes (29,52 %). Compounds with highest percentage quantity were camphor (51,76 %), *cis*- $\beta$ -ocimene (8,17 %), 3-octyl acetate (7,71 %), *trans*- $\beta$ -ocimene (6,76 %),  $\gamma$ -terpinene (4,93 %), *o*-cymene (3,81 %), terpinolene (1,33 %), limonene (1,33 %), camphene (1,19 %) and borneol (1,20 %). Further, total phenolic content was  $0,31 \pm 0,02 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{ml}^{-1}$ , which equals  $1,52 \pm 0,11 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  of plant. Antioxidant activity was  $417,56 \pm 32,84 \text{ } \mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}$  and percentage of radical scavenging activity ABTS<sup>•+</sup> was  $88,99 \pm 7,00 \%$ . Finally antimicrobial activity was determined against bacteria *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and yeast *Candida glabrata*. Against *E. coli* and *C. glabrata* there was no inhibition exhibited. Against *B. cereus* there was seen mild inhibition activity.

The results confirm that *Tetradenia* spp. contain a number of interesting aroma active compounds, which shows antioxidant and antimicrobial activity. The herb has a good potential as natural source of nutritious and sensory active compounds to be used into various foods.

## KEY WORDS

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

ČAKOVÁ, Adriana. *Stanovení antimikrobiální a antioxidační aktivity vybraných bylinných extraktů*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131340>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
Bc. Adriana Čaková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych velmi poděkovat paní doc. Ing. Evě Vítové, Ph.D. za veškerou pomoc, rady a připomínky a za celkové vedení během zpracovávání této práce. Dále bych ráda poděkovala konzultantce Ing. Janě Zemanové, Ph.D. a paní laborantce Radce Novákové za ochotu a pomoc v laboratoři mikrobiologie. Na závěr bych chtěla poděkovat celé své rodině a blízkým za podporu během celého studia.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>10</b>
2.1 PROBLEMATIKA MIKROBIÁLNÍ RIZIKOVOSTI BYLINNÝCH EXTRAKTŮ PRO VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	10
2.1.1 <i>Legislativa</i> .....	10
2.1.2 <i>Bezpečnost rostlinných extraktů</i> .....	10
2.2 BIOLOGICKÉ ÚČINKY BYLINNÝCH EXTRAKTŮ .....	12
2.2.1 <i>Antimikrobiální látky a jejich aktivita</i> .....	12
2.2.2 <i>Antioxidanty a jejich aktivita</i> .....	13
2.3 METODY VYUŽÍVANÉ K ZISKU ROSTLINNÝCH EXTRAKTŮ.....	14
2.3.1 <i>Konvenční extrakční metody</i> .....	14
2.3.1.1 <i>Macerace</i> .....	15
2.3.1.2 <i>Hydrodestilace</i> .....	15
2.3.1.3 <i>Soxhletova extrakce</i> .....	16
2.3.2 <i>Nekonvenční („zelené“) extrakční metody</i> .....	17
2.3.2.1 <i>Superkritická fluidní extrakce</i> .....	17
2.3.2.2 <i>Ultrazvuková extrakce</i> .....	18
2.3.2.3 <i>Mikrovlnná extrakce</i> .....	18
2.3.2.4 <i>Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem</i> .....	18
2.4 METODY STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY EXTRAKTŮ .....	19
2.4.1 <i>Difúzní metody</i> .....	19
2.4.1.1 <i>Disková difúzní metoda (Disk-Diffusion Method)</i> .....	19
2.4.1.2 <i>Difúzní jamková metoda (Well Diffusion Method)</i> .....	20
2.4.2 <i>Diluční metody</i> .....	21
2.4.2.1 <i>Agarová diluční metoda (Agar Dilution Method)</i> .....	21
2.4.2.2 <i>Diluční mikrometoda (Broth Micro-Dilution Method)</i> .....	21
2.4.2.3 <i>Etest</i> .....	22
2.5 METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY EXTRAKTŮ.....	24
2.5.1 <i>Metoda využívající ABTS</i> .....	25
2.5.2 <i>Metoda dle Kanedy (DPPH)</i> .....	25
2.5.3 <i>Stanovení celkových polyfenolů</i> .....	26
2.6 METODY STANOVENÍ AROMATICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V EXTRAKTECH.....	27
2.6.1 <i>Plynová chromatografie</i> .....	27
2.6.1.1 <i>Hmotnostní spektrometrie</i> .....	28
2.6.1.2 <i>Plamenově ionizační detektor</i> .....	29
2.7 MOŽNOSTI VYUŽITÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH ÚČINKŮ PŘÍRODNÍCH EXTRAKTŮ .....	29
2.7.1 <i>Antimikrobiální účinky extraktů rostlin</i> .....	29
2.7.2 <i>Využití rostlinných extraktů v potravinářství</i> .....	30
2.7.3 <i>Využití rostlinných extraktů v kosmetice</i> .....	32
2.8 ČELEĎ <i>LAMIACEAE</i> .....	32
2.9 CHARAKTERISTIKA RODU <i>TETRADENIA SPP.</i> .....	33
2.9.1 <i>Charakteristika T. riparia</i> .....	35
2.9.2 <i>Biologická aktivita migrénovníku (T. riparia)</i> .....	36
2.9.2.1 <i>Antimikrobiální aktivita extraktů migrénovníku</i> .....	36

2.9.2.2	Antioxidační aktivita extraktů migrenovníku .....	39
2.9.2.3	Aromatické látky v extraktech migrenovníku .....	40
2.10	CHARAKTERISTIKA POUŽITÝCH MIKROORGANISMŮ .....	43
2.10.1	<i>Bacillus cereus</i> .....	43
2.10.2	<i>Escherichia coli</i> .....	44
2.10.3	<i>Candida glabrata</i> .....	44
<b>3.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>45</b>
3.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	45
3.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	45
3.3	ANALYZOVANÉ EXTRAKTY .....	45
3.4	METODY STANOVENÍ VYBRANÝCH UKAZATELŮ KVALITY/AKTIVITY EXTRAKTŮ MIGRÉNOVNÍKU .....	46
3.4.1	<i>Stanovení aromaticky aktivních látek</i> .....	46
3.4.2	<i>Stanovení celkových polyfenolů</i> .....	47
3.4.2.1	Příprava kalibrační křivky a roztoků .....	47
3.4.2.2	Postup stanovení .....	47
3.4.2.3	Vyhodnocení výsledků .....	48
3.4.3	<i>Stanovení antioxidační aktivity</i> .....	48
3.4.3.1	Příprava kalibrační křivky a roztoků .....	48
3.4.3.2	Postup stanovení .....	48
3.4.3.3	Vyhodnocení výsledků .....	49
3.4.4	<i>Ověření antimikrobiální aktivity</i> .....	49
3.4.4.1	Použité mikroorganismy .....	49
3.4.4.2	Příprava a zaočkování bujónů.....	50
3.4.4.3	Příprava kultivačního média.....	50
3.4.4.4	Postup stanovení .....	50
3.4.4.5	Vyhodnocení výsledků .....	51
3.5	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ .....	51
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>52</b>
4.1	OPTIMALIZACE MACERACE.....	52
4.1.1	<i>Vliv doby macerace na celkový obsah fenolických a třekavých látek</i> .....	53
4.1.2	<i>Vliv koncentrace rozpouštědla na celkový obsah fenolických a třekavých látek</i> .....	55
4.1.3	<i>Vliv poměru navážky/rozpouštědla na celkový obsah fenolických a třekavých látek</i> ...	58
4.1.4	<i>Vliv teploty na celkový obsah fenolických a třekavých látek</i> .....	60
4.2	CHARAKTERIZACE OPTIMÁLNÍHO EXTRAKTU .....	62
4.2.1	<i>Aromatické látky v optimálním extraktu</i> .....	62
4.2.2	<i>Celkový obsah polyfenolů v optimálním extraktu</i> .....	67
4.2.3	<i>Antioxidační aktivita optimálního extraktu</i> .....	68
4.2.4	<i>Antimikrobiální aktivita optimálního extraktu</i> .....	70
4.3	APLIKACE VYROBENÉHO EXTRAKTU .....	72
<b>5.</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>89</b>
<b>8.</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>91</b>

## 1. ÚVOD

V současnosti je zejména v potravinářském odvětví, ale také např. v kosmetickém, snaha o využívání co nejvíce přírodních látek jako aditiv. Extrakty nejrůznějších druhů bylin si v posledních letech získaly velkou pozornost, nikoliv jen pro své aromatické vlastnosti, ale také jako potenciální antioxidační a antimikrobiální látky, které by mohly v dohledné době zcela nahradit používané syntetické látky. Problém rostlinných extraktů představuje zejména jejich potenciální nebezpečnost, ať už z chemického nebo biologického hlediska. I z tohoto důvodu je využívání přírodních látek, tedy i extraktů, kontrolováno a podléhá legislativě. V současnosti je v Evropské unii povoleno využívání rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis L.*) jako antioxidantu do potravin.

Za několik posledních let bylo provedeno množství studií, které se zaměřovaly na využití extraktů a esenciálních olejů rostlin v potravinářství jako antimikrobiálních látek. Velkou výhodou využití extraktů rostlin je jejich schopnost vykazovat společnou antioxidační i antimikrobiální aktivitu. Těchto vlastností se využívá také v kosmetických produktech. Extrakty některých druhů bylin (např. bazalka, *Ocimum sanctum*) vykazují pozitivní vliv např. proti akné, které je v kosmetice velmi často rozebíraným problémem.

Nejrůznější byliny jsou používány v domácí medicíně již řadu let. Mnoho z nich si kromě svého vědeckého názvu získalo pojmenování podle jejich využití. Příkladem je také migrénovník (*Tetradenia* spp.), který v domácí medicíně nachází využití proti bolestem, kašli nebo nachlazení. Z rodu *Tetradenia* je asi nejznámější *Tetradenia riparia*. Tato rostlina byla v posledních letech studována pro své potenciální antimikrobiální i antioxidační účinky. Byly provedeny studie sledující inhibiční účinky migrénovníku vůči nejrůznějším mikroorganismům. Kromě těchto vlastností byla provedena stanovení obsahu aromatických látek, z nichž některé zodpovídají, mimo jiné, právě za antioxidační a antimikrobiální účinky.

Do dnešní doby bylo vyvinuto množství metod ke stanovení antioxidační a antimikrobiální aktivity. Pro stanovení celkových polyfenolů je téměř výhradně využívána metoda Folin-Ciocalteu. Metoda ABTS nebo DPPH patří mezi nejvíce využívané ke stanovení antioxidační aktivity. Antimikrobiální aktivitu je možné stanovit orientačně pomocí metod jako je difúzní disková nebo jamková metoda, popřípadě lze stanovit minimální inhibiční koncentraci extraktů za využití dilučních metod.

Z výše uvedených důvodů je cílem této práce získat extrakt migrénovníku a jeho komplexní charakterizace z hlediska antioxidačního, antimikrobiálního a senzorického za účelem posouzení jeho potenciálu pro případné využití v praxi.



## 2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Tato práce je zaměřena na možnosti získávání extraktu z migrénovníku (*Tetradenia* spp.) se zachováním maxima biologicky aktivních látek. V následujících kapitolách je popsána problematika bylinných extraktů obecně, jejich biologické účinky a možnosti využití v potravinářství, včetně příslušných legislativních požadavků.

Hlavní pozornost je pak věnována migrénovníku, jeho složení a účinkům. V neposlední řadě jsou popsány metody vhodné pro stanovení ukazatelů, které byly vybrány a sledovány jako hlavní charakterizující parametry extraktu připraveného v experimentální části práce: těkavé aromatické látky, antioxidační a antimikrobiální aktivita.

### 2.1 Problematika mikrobiální rizikovosti bylinných extraktů pro využití v potravinářství

#### 2.1.1 Legislativa

Výroba potravin, stejně jako mnoho jiných odvětví, podléhá legislativě. Základní legislativou potravinářského průmyslu je Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002. Toto nařízení stanovuje obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřízení Evropského úřadu pro bezpečnost potravin a dále postupy týkající se bezpečnosti potravin. V potravinářství existuje dále i Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 231/2012 ze dne 9. března 2012, které pojednává o stanovení specifikace pro potravinářské přídatné látky. Využití extraktů v potravinářství je, stejně jako např. aditiva v potravinách, hlídáno. Použití extrakčních činidel pro výrobu extraktů podléhá vyhlášce č. 253/2018 Sb., která pojednává o požadavcích na extrakční rozpouštědla, která jsou používána v potravinářství. Vyhláška obsahuje povolená extrakční rozpouštědla, podmínky a limity jejich použití. Při výrobě potravin lze, v případě že dojde k dodržení správné výrobní praxe, použít tato rozpouštědla: propan, butan, octan ethylnatý, ethanol, oxid uhličitý, aceton (s výjimkou rafinace olivového oleje z olivových pokrutin) a oxid dusný. Jako extrakční rozpouštědlo je možné použít také vodu, která může obsahovat regulátory kyselosti, popřípadě zásaditosti. Dále mohou být také použity potraviny, které mají vlastnosti extrakčních rozpouštědel. Všechna extrakční rozpouštědla, využívaná pro výrobu potravinářských přídatných látek, vitamínů a ostatních doplňků stravy, nesmí překročit povolená množství reziduí, která jsou ustanovena v tabulce č. 1 a 2 uvedených v příloze této vyhlášky. Extrakční rozpouštědla nesmí obsahovat toxikologicky nebezpečné množství žádného prvku ani látky a zároveň více než  $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  arsenu nebo více než  $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  olova. Výjimky jsou opět ustanoveny v tabulkách vyhlášky. Potravinářská extrakční rozpouštědla musí být také řádně označena obchodním názvem, výrobcem (dovozcem), slovem „pro potraviny“. Dále musí být uvedeno číslo šarže, množství (objem) a podmínky uchování a použití [1-3].

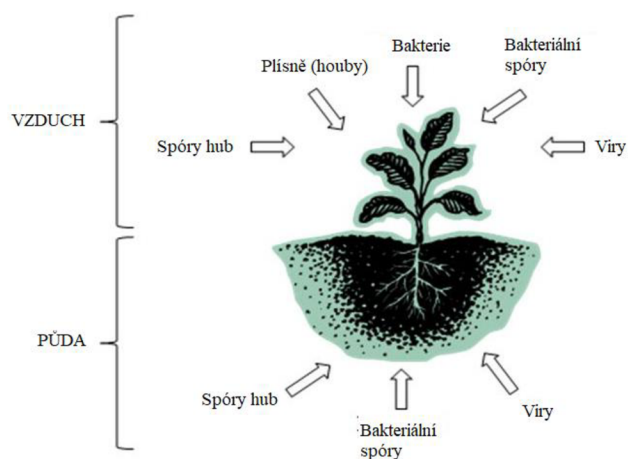
#### 2.1.2 Bezpečnost rostlinných extraktů

Se stále více se rozšiřujícím využíváním rostlinných extraktů je kladena pozornost na jejich potenciální mikrobiální nebezpečnost. Po dlouhou dobu bylo vnímáno něco přírodního jako zcela bezpečného, a až v posledních letech se tento pohled začal měnit. V praxi je často třeba zvážit výhody využití rostlinných extraktů oproti jejich potenciální mikrobiální, ale i jiné nebezpečnosti [4, 5].

Zdrojem biologické kontaminace rostlin může být např. využívání exkrementů, hnoje a jiných výkalů jako hnojiv. Ke kontaminaci ale může dojít také z přirozeného okolí rostliny, ať už ze vzduchu nebo z půdy (Obrázek 1.). Kromě biologické kontaminace se u léčivých rostlin hlídá také chemická kontaminace (např. rezidua pesticidů, mykotoxiny, aflatoxiny apod.), kontaminace těžkými kovy (Pb, Cd, Cr, Hg atd.), radioaktivní kontaminace ( $Cs^{134}$ ,  $Cs^{137}$ ) a jiné znehodnocující látky (toxické rostliny, benzodiazepiny atd.). V dnešní době je jen velmi málo léčivých rostlin využívaných např. v potravinářství nebo medicíně, které by byly sbírány přímo v přírodě [4, 5].

Ne vždy je možné plně zabránit biologické kontaminaci rostliny během pěstování, sklizení a dalších manipulací. Mezi typické biologické kontaminanty léčivých rostlin patří bakterie, jejich spory, kvasinky a plísňe, viry, prvoci, hmyz (jejich vajíčka, larvy) a další organismy. Množství a druh mikrobiální kontaminace léčivých bylin může být značně ovlivněn faktory jako je teplota, vlhkost, frekvence srážek. Vyšší obsah spor bakterií (*Clostridium* spp., *Bacillus* spp.) je důsledkem jejich velmi dobré odolnosti vůči teplotě i suchu. Příkladem izolovaných bakterií tvořících spory jsou *B. cereus* nebo *C. perfringens*, které byly nalezeny na heřmánku a dalších lékařských bylinách. Enterobakterie patří mezi bakterie v přírodě přirozeně se vyskytující, kontaminace bylin těmito bakteriemi (např. *E. coli*) může svědčit o nehygienických podmínkách pěstování. Bakterie *Staphylococcus aureus* je naopak vzácným kontaminantem bylin. Jen velmi vzácně je na rostlinném materiálu nalezena. V minulosti byly na léčivých bylinách izolovány bakterie jako *B. cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Shigella* spp., *Enterobacter agglomerans*, *E. cloacae*, *Vibrio fluvialis*, *Pasteurella multocida*, *S. epidermis*, *Acinetobacter iwoffi*, *Klebsiella* spp., *B. subtilis* nebo *Pseudomonas aeruginosa*, z hub např. *Rhizopus stolonifer*. Brown a Jiang [10] v studii izolovali z 21 bylin rezistentní bakterie *Bacillus* spp., *Erwinia* spp., *Ewingella americana*, *Staphylococcus* spp., *Enterobacter cloacae* a *Stenotrophomonas maltophilia* [4-7].

Typickými plísňovými kontaminanty jsou rody *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Mucor* spp., *Candida* spp. a *Trichosporium* spp. Kromě potenciální kontaminace plísněmi, hrozí nebezpečí kontaminace rostlinných extraktů produkty těchto plísní (např. mykotoxiny). Mezi producenty těchto toxinů patří hlavně *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus*. Z mykotoxinů asi nejzávažnější riziko představují aflatoxiny [4, 5].



Obrázek 1.: Ovlivnění mikrobiální kontaminace rostlin životním prostředím [5]

Problém využívání extraktů bylin v potravinářství představuje zejména mikroflóra, která se u bylin může přirozeně vyskytovat. Tato mikroflóra nemusí nutně znamenat nebezpečí pro samotnou rostlinu, ale může se jednat o mikroorganismy patogenní pro člověka. Problém představují zejména potraviny s obsahem takovýchto extraktů, kdy není provedena dostatečná tepelná úprava, a spory bakterií *Clostridium* spp. nebo *Bacillus* spp. mohou přežít a po zkonsumování potraviny způsobit závažné zdravotní problémy. Pro zajištění bezpečnosti rostlinných extraktů je možné využít např. gama záření, dostatečně vysokou teplotu, případně ošetření párou [8-11].

Atanassova a kol. [12] se zabývali kontrolou rostlin čeledě *Lamiaceae* (*Melissa officinalis*, *Salvia officinalis* a *Mentha piperita*) z hlediska mikrobiální kontaminace. Vzorke připravovali v souladu s normami ISO (ISO 6887). Testování na potenciální přítomnost mikrobiálních kontaminantů provedli několika standardními metodami popsány ISO normami, které ustanovují způsob počítání kolonií při 30 °C, počítání a detekování koliformních bakterií, *E. coli* a další. Sledovali celkové množství aerobních bakterií, koliformní bakterie (reprezentovány *E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, plísně a kvasinky. V žádném vzorku nebyly přítomné *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp. ani *S. aureus*. Celkové aerobní bakterie, *E. coli*, plísně i kvasinky tvořily méně než 10 CFU·g<sup>-1</sup>. Z těchto výsledků vyvodili, že stanovované vzorky bylin byly z mikrobiologického hlediska bezpečné [12].

## **2.2 Biologické účinky bylinných extraktů**

### **2.2.1 Antimikrobiální látky a jejich aktivita**

Jako antimikrobiální látky označujeme látky, které potlačují růst mikroorganismů (vykazují mikrobistatický účinek), případně je úplně usmrcují (vykazují mikrobicidní účinek). Tyto látky spolu s dezinfekčními látkami patří do skupiny látek uplatňujících se při chemických metodách kontroly mikrobiálního růstu. Jako antimikrobiální látky považujeme také např. antiparazitika, antimykotika, antivirotika nebo antituberkulotika. Obecně jsou tyto látky dvojího druhu. Prvními jsou antibiotika, které mají přírodní původ, v dnešní praxi však již většinou vyráběná synteticky. Druhým druhem jsou pak chemoterapeutika, která jsou připravena chemicky. Mezi mikrobistatické látky, tedy látky potlačující růst a množení mikroorganismů, řadíme např. tetracykliny, makrolidy nebo sulfonamidy. Mikrobicidní (usmrcující) účinek vykazují např. beta-laktamy, aminoglykosidy nebo polypeptidy. Kromě antibiotik a chemoterapeutik známe látky, které vykazují taktéž antimikrobiální účinek, patří mezi ně např. látky působící na mikrobiální enzymy, jako oxidační činidla, těžké kovy apod. Dále to mohou být látky, které reagují s deoxyribonukleovou kyselinou (DNA – Deoxyribonucleic Acid), ať už chemické mutageny, případně cytostatika [13, 14].

Rezistence mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám je značným problémem na celosvětové úrovni. Jako rezistenci přitom označujeme schopnost mikroorganismu odolat účinku inhibiční koncentrace antimikrobiální látky. Mikroorganismy mohou být také přirozeně (primárně) rezistentní (odolné) vůči některým antimikrobiálním látkám. Jako příklad lze uvést rezistenci gramnegativních střevních tyčinek vůči penicilinu a makrolidům. Takovýchto typů primární rezistence lze najít daleko více. Dalším typem je rezistence sekundární neboli získaná. Tento typ rezistence může být genetického nebo negenetického původu. Vzniká nejčastěji jako

důsledek působení antimikrobiální látky na populaci mikroorganismů. Díky selekčnímu tlaku antimikrobiální látky se v důsledku vyselektují rezistentní kmeny. V případě genetického původu se nejčastěji jedná o mutace kmenu. U negenetického původu pak může být důvodem např. ztráta specifických receptorových struktur. Největším problémem je v současné době multirezistence, tedy rezistence mikroorganismu vůči více druhům antimikrobiálních látek. Kromě klinické a veterinární praxe, se s problémem rezistence můžeme setkat také např. u potravin. Proto se u kontroly potravin často stanovuje antimikrobiální aktivita [13, 14].

### 2.2.2 Antioxidanty a jejich aktivita

Oxidace patří mezi esenciální biologické procesy v mnoha živých organismech. Reaktivní kyslíkové radikály (ROS – Reactive Oxygen Species) jsou schopny vyvolávat peroxidaci lipidů v lidském těle, která v důsledku vyvolává oxidační nerovnováhu, což má za následek nejrůznější zdravotní problémy. ROS spolu s dusíkovými radikály (RNS – Reactive Nitrogen Species) působí na biologicky významné sloučeniny jako jsou lipidy, bílkoviny nebo nukleové kyseliny. Jejich účinkem dochází ke změnám struktury těchto významných sloučenin, což má za následek také modifikaci jejich funkce. Reaktivní formy kyslíku způsobují zrychlení procesu stárnutí, ale také mnohem závažnější nemoci jako rakovinu, poruchy imunitního systému nebo kardiovaskulární onemocnění, mentální poruchy, onemocnění dýchacího ústrojí atd. Tyto formy kyslíku jsou snadno tvořeny v metabolismu a neutralizovány pomocí antioxidantů [16, 17, 19, 21].

Antioxidanty jsou jednou ze skupin látek, které je možné nalézt v rostlinách. Jejich nejdůležitějším úkolem je ochrana organismu vůči kyslíku při normálních atmosférických podmínkách. Antioxidanty jsou heterogenní sloučeniny, přičemž je důležité rozlišovat antioxidanty, které přímo chrání organismus před oxidací, a antioxidanty, které chrání organismus nepřímo, tak že např. vyvolávají biosyntézu antioxidantních enzymů. Antioxidanty zabraňují tvorbě reaktivních forem kyslíku a volných radikálů tím, že jim darují volný elektron nebo vodíkový atom. Mezi antioxidanty přirozeně se vyskytující v rostlinách patří např.  $\beta$ -karoten, xanthofyly, kyselina askorbová (vitamin C), nejrůznější flavonoidy a taniny, polyfenoly, katechiny, vitamin E a další. Jednou z nejvíce rozšířených a prozkoumaných skupin antioxidantů jsou fenolové sloučeniny. Jsou to produkty sekundárního metabolismu, přičemž jejich prekurzory jsou metabolity z šikimátové, pentózofosfátové a fenylpropanoidové dráhy [16-19].

Role antioxidantů v organismu je tedy předcházet, zabraňovat, popřípadě zpomalovat proces autooxidace. Autooxidace je radikálová řetězová reakce, která může být zahájena různými způsoby. Dochází tak k tvorbě množství radikálů, které reagují s oxidovatelnými substráty, buď odstraněním atomu vodíku nebo adicí atomu vodíku na vazbě C=C za vzniku uhlíkového radikálu (alkylu), který v přítomnosti kyslíku tvoří peroxylový radikál ( $\text{ROO}\cdot$  – Peroxyl Radical). Tento radikál pak může reagovat s dalším substrátem stejným způsobem a tvoří se tak řetězová reakce. Tuto řetězovou reakci je možné ukončit reakcí peroxylových radikálů mezi sebou, což je bez přítomnosti antioxidantů značně nepravděpodobné. Produkty primární oxidace mohou následně podléhat sekundární oxidaci, díky čemuž dochází k tvorbě sloučenin jako jsou aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny apod. [18].

Antioxidanty je možné rozdělit do tří skupin podle jejich mechanismu účinku vůči autooxidaci. První skupinou jsou tzv. preventivní antioxidanty, které narušují iniciační proces, tudíž zabraňují vzniku řetězové reakce. Patří sem např. kovová chelatační činidla jako kyselina fytová nebo kurkumin. Druhou skupinou jsou antioxidanty přerušující řetězec reakcí. Jsou to antioxidanty, které jsou schopné reagovat s peroxylovými radikály za vzniku produktů neschopných pokračovat v řetězové reakci. Do této skupiny patří zejména fenoly a polyfenoly, ale také např. kyselina askorbová nebo soli kyseliny močové. Poslední skupinou jsou antioxidanty podporující terminaci řetězové reakce. Patří sem např. nefenolové terpenoidy jako citral nebo  $\gamma$ -terpinen [18].

Antioxidační aktivita popisuje schopnost sloučeniny, případně směsi sloučenin, zabraňovat oxidačním procesům vůči nejrůznějším látkám. Je důležité rozlišovat dva pojmy, a to antioxidační kapacitu a antioxidační aktivitu. Kapacita nás informuje o délce trvání antioxidačního účinku. Naopak reaktivita charakterizuje počáteční dynamiku průběhu antioxidačního procesu při dané koncentraci antioxidantu [20].

V potravinářství chrání antioxidanty potraviny před oxidací, která může mít za následek vznik tzv. „off flavouru“, který se projevuje nepříjemnou chutí a pachem. Dále může oxidace látek v potravine způsobovat ztrátu barvy, textury. Antioxidanty mohou zabraňovat také nežádoucí peroxidaci lipidických látek, které jsou přítomny v řadě potravin [19, 21, 22].

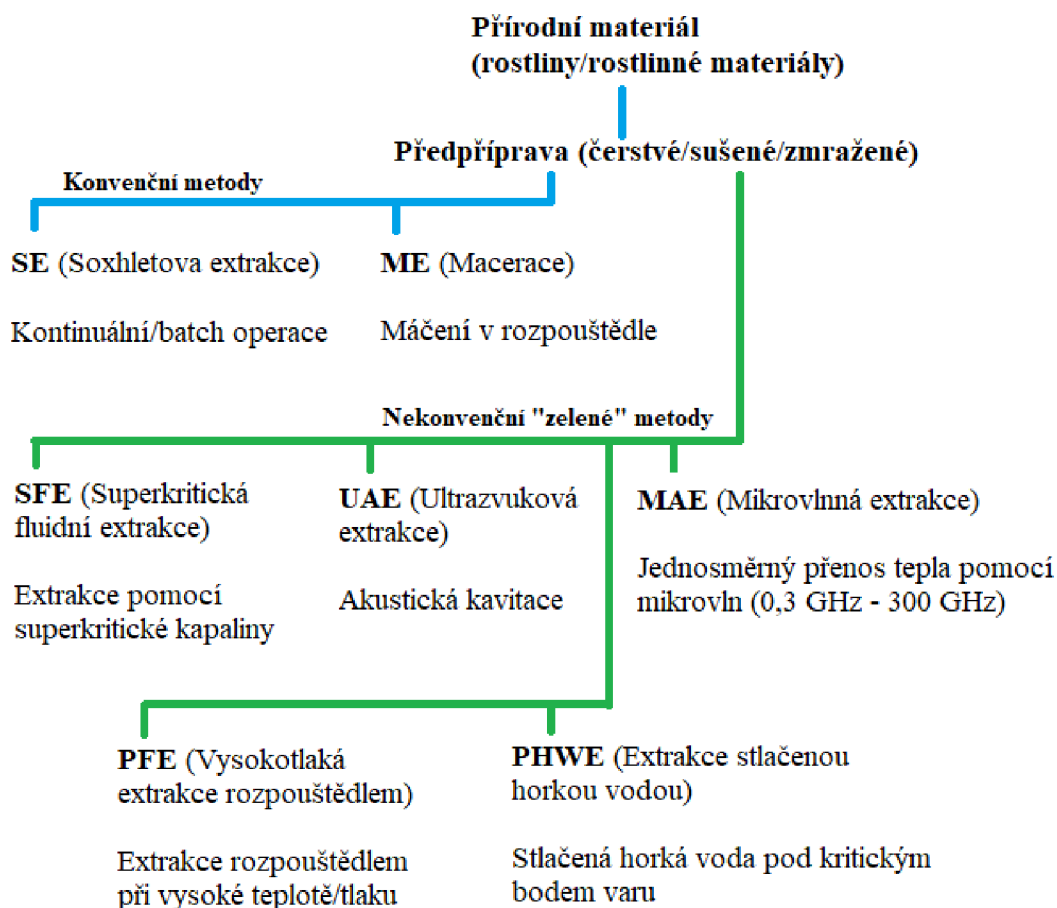
## **2.3 Metody využívané k získání rostlinných extraktů**

Přírodní medicína, jako např. stará čínská medicína, je využívána v nejrůznějších odvětvích již po staletí. Stále větší poptávku po účincích přírodní medicíny je ale možné vidět i ve značně vyspělých zemích, kdy v mnoha případech může přírodní medicína představovat levnější variantu komerčně vyráběným lékům [23, 26].

Přírodní látky získávané z rostlinných materiálů nacházejí stále více uplatnění nejen ve farmacii, ale také např. v potravinářském nebo kosmetickém průmyslu. Narůstající poptávka po těchto látkách tlačí zejména na vývoj nových extrakčních metod, které budou schopny konkurovat starým konvenčním metodám. Výhodnost nových extrakčních metod je hodnocena zejména z pohledu vlivu na životní prostředí, ceny, doby extrakce, spotřeby rozpouštědla, množství získání bioaktivních látek a celkové náročnosti provedení [24]. Rozdělení metod na konvenční a nekonvenční je shrnuto na Obrázku 2.

### **2.3.1 Konvenční extrakční metody**

Mezi konvenční metody řadíme např. Soxhletovu extrakci, maceraci nebo také hydrodestilaci. Jedná se o klasické metody, které využívají rozpouštědel k získání bioaktivních sloučenin z rostlinné matrice. Extrakce těmito metodami bývá často podporována různými teplotami, popřípadě mícháním [24].



Obrázek 2.: Metody využívané k získání rostlinných extraktů (upraveno) [25]

### 2.3.1.1 Macerace

Macerace je metoda, která je stále široce aplikovaná při studii léčivých bylin. Principem je máčení rostlinného materiálu v rozpouštědle v uzavřené nádobě. Nádoba i s rostlinným materiálem je ponechána stát po určitou dobu při pokojové teplotě. Záměrem je oslabení a porušení buněčné stěny rostliny a uvolnění biologicky aktivních látek do rozpouštědla. Volbou rozpouštědla lze ovlivnit druh látek, které budou z rostlinné matrice extrahovány [23].

Výhodou metody je její jednoduchost a nenáročnost. Značnou nevýhodou je pak dlouhá doba samotného procesu. Problémem může být také případný organický odpad, který je z důvodu použití velkého množství rozpouštědla, třeba řešit [23, 26].

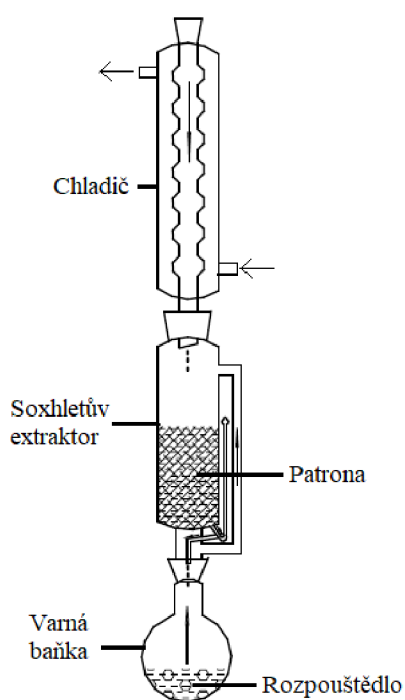
### 2.3.1.2 Hydrodestilace

Hydrodestilace patří mezi metody využívané k získání bioaktivních a těkavých látek, zejména pak esenciálních olejů. Při hydrodestilaci je jako rozpouštědlo používána voda. Během hydrodestilace je rostlinná matrice vložena do extrakční nádoby. K matrici je buďto přidána přímo voda, která je následně přivedena k varu, případně je do nádoby přiváděna již samotná pára. Horká voda, popřípadě pára, umožňují extrakci bioaktivních sloučenin z rostlinného vzorku [26, 27]. Extrahované látky jsou unášeny parou ke kondenzátoru, kde dojde ke zkapalnění. Směs vody a extrahovaných látek je pak jímána do separátoru, kde dojde na základě rozdílných hustot k oddělení vody a extrahovaných látek [28].

Výhodou hydrodestilace je vyhnutí se využívání drahých organických rozpouštědel [28]. Nevýhodou metody je možnost ztráty některých těkavých látek vzhledem k vyšší teplotě. Zároveň není vhodná pro získání termolabilních sloučenin [27].

### 2.3.1.3 Soxhletova extrakce

Principem metody je extrakce látek z tuhého materiálu, umístěného v pórovité nádobě (patroně), která bývá vyrobena z pevného filtračního papíru nebo celulózy. Patrona je umístěna do extraktoru Soxhletovy aparatury (viz Obrázek 3.). Extrakční rozpouštědlo je zahříváno ve spodní varné baňce, dochází k jeho vypařování a unikání do chladiče, kde je kondenzováno. Zkondenzované rozpouštědlo kape zpět do extraktoru na patronu, přičemž dochází ke kontaktu rozpouštědla a tuhého materiálu a k extrakci látek do rozpouštědla. V momentě, kdy dojde k naplnění extraktoru rozpouštědlem, dochází k jeho přelití zpět do varné baňky a celý proces se opakuje [23, 24].



Obrázek 3.: Soxhletova aparatura (upraveno) [24]

Výhodou metody je spotřeba menšího množství rozpouštědla, zejména v porovnání s macerací. Metoda je vcelku levná a jednoduchá. Problém je vystavení se nebezpečným a hořlavým kapalným organickým rozpouštědlům, která mohou během extrakce uvolňovat toxické páry. I z tohoto důvodu je třeba pro tento typ extrakce využívat rozpouštědla s vysokou mírou čistoty, která se pochopitelně projeví na ceně [23, 24]. Metoda zároveň není příliš vhodná pro získání termolabilních biologicky aktivních látek [24].



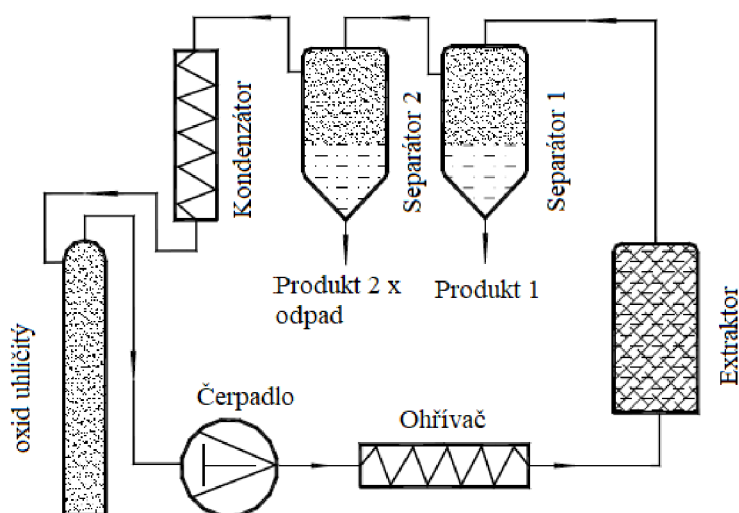
### 2.3.2 Nekonenční („zelené“) extrakční metody

Do dnešní doby nebylo možné vyvinout jednu standardní metodu, která by byla schopná účinné a rychlé extrakce bioaktivních látek z rostlinného materiálu. Konvenční metody často skýtají limitace, které nelze ovlivnit. I z tohoto důvodu je tlak na vývoj tzv. „zelených metod“, které jsou přívětivé pro ekologii, účinné, rychlé a zároveň cenově výhodné. Velkou výhodou většiny nekonvenčních oproti konvenčním metodám je zkrácení doby extrakce a snížení spotřeby rozpouštědla [25].

#### 2.3.2.1 Superkritická fluidní extrakce

Superkritická fluidní extrakce (SFE – Supercritical Fluid Extraction) využívá jako rozpouštědlo superkritickou kapalinu (SF – Supercritical Fluid). SF lze popsat jako tekutinu, které spojuje vlastnosti plynu a kapaliny v kritickém bodě. Dosáhnutí kritického bodu je ovlivněno teplotou a tlakem. SF vykazuje spíše chování plynu, ale zároveň si zachovává solvatační vlastnosti kapaliny. Příkladem SF je oxid uhličitý, který získává vlastnosti SF při teplotě cca 31 °C a tlaku 7380 kPa. Právě CO<sub>2</sub> je velmi často využívaným rozpouštědlem v SFE. Je vhodný k extrakci nepolárních látek, je dostupný a málo toxický. Nevýhodou CO<sub>2</sub> jako SF při SFE je malá schopnost extrahovat polární látky. Tuto skutečnost je možné ovlivnit malým přidavkem ethanolu nebo methanolu [23-26].

Schéma systému SFE lze vidět na Obrázku 4. Během SFE je rostlinný materiál vložen do extrakční nádoby, na kterou jsou připojeny kontrolní body a ventily, které udržují požadované extrakční podmínky. SF je čerpadlem tlačena do extrakční nádoby, kde probíhá extrakce. SF spolu s extrahovanými látkami je následně převedena až do separátoru. Zde změnou tlaku nebo teploty dochází k oddělení SF od extrahovaných látek. Získané látky jsou odčerpány ze dna separátoru. SF je dále regenerována a použita v dalším cyklu [24].



Obrázek 4.: Schéma systému SFE [24]



### **2.3.2.2 Ultrazvuková extrakce**

Ultrazvuková extrakce (UAE – Ultrasound-Assisted Extraction) využívá frekvenci v rozmezí od 20 kHz až do 2000 kHz. Princip extrakce spočívá ve využívání vzniku akustické kavitace, která zvýší kontakt mezi povrchem vzorku a rozpouštědlem a zvýší tak propustnost buněčných stěn. Kavítace vzniká jako následek silných ultrazvukových vln, které v médiu vytvoří bublinky a ty vlivem absorpce energie a dalšímu vystavování ultrazvukovým vlnám praskají. Díky kavítaci dochází k pozměnění fyzikálních a chemických vlastností vzorku, což má za následek narušení buněčných stěn. Vlivem porušení buněčných stěn vzorku dochází k uvolňování látek z materiálu vzorku a zároveň k pronikání rozpouštědla hlouběji do matrice vzorku [23, 25, 27].

Hlavní výhodou UAE je zkrácení extrakční doby a snížení spotřeby rozpouštědla. Metoda je jednoduchá a relativně levná a může být použita jak pro menší, tak i větší objemy rozpouštědla. Nevýhodou metody je riziko ovlivnění extrahovaných látek ultrazvukovými vlnami a tvorba volných radikálů [23, 25].

### **2.3.2.3 Mikrovlnná extrakce**

Mikrovlnná extrakce (MAE – Microwave-Assisted Extraction) využívá mikrovlnné energie k usnadnění oddělení látek z matrice vzorku do rozpouštědla. Mikrovlnná radiace interaguje s dipólem polárních a polarizovatelných materiálů, která způsobuje zahřívání povrchu matrice a prostupování tepla do matrice vlivem kondukce. Rotace molekul vlivem mikrovlnné radiace porušuje vodíkové vazby a zlepšuje tak migraci rozpuštěných iontů a zároveň penetraci rozpouštědla do matrice [23, 24].

Výhodou je zkrácení doby extrakce a snížení potřebného množství rozpouštědla oproti konvenčním metodám. Nevýhodou je potřeba regulace teploty, aby nedošlo k tepelnému rozkladu látek [23, 25, 28].

### **2.3.2.4 Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem**

Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PLE – Pressurized Liquid Extraction, PSE – Pressurized Solvent Extraction, PFE – Pressurized Fluid Extraction) je „zelená“ metoda využívající při extrakci zvýšený tlak, který zajišťuje udržení rozpouštědla v kapalném stavu i nad bodem varu. Rozpouštědlo si tak zachovává dobrou rozpustnost a zároveň vyšší prostup do rostlinné matrice, díky rozbití vazeb (Van der Waalsovy, vodíkové vazby atd.) v matrici působením vyšší teploty [25-27].

Při PLE je rostlinná matrice vložena do extraktoru a k ní přidáno rozpouštědlo, které je pumpováno pomocí vysokotlaké pumpy. Vzorek v extraktoru je udržován při požadované teplotě pomocí zdroje tepla do doby dosáhnutí potřebného tlaku. Při dosažení požadované kombinace tlaku a teploty je zahájena extrakce. Extrakce probíhá v cyklech a je třeba během nich doplňovat rozpouštědlo [25].

Výhodou PLE je zkrácení doby extrakce i snížení spotřeby rozpouštědla. Kromě těchto je oproti ostatním metodám výhoda dobré opakovatelnosti [26, 27].

## 2.4 Metody stanovení antimikrobiální aktivity extraktů

Antimikrobiální testy jsou využívány v nejrůznějších odvětvích, nejčastěji pak ke klinické analýze, např. stanovení účinnosti antibiotik. Své využití také nacházejí hojně v potravinářském odvětví, zejména ke kontrole potravin. Antimikrobiální testy se dále využívají i k výzkumu, např. k testování extraktů rostlin, které by mohly mít potenciální antimikrobiální účinek. Ke stanovení koncentrace látek, které mají inhibiční účinek nebo stimulují růst mikroorganismů, se využívá několika metod, jako např. metod zředovacích, nefelometrických, titrimetrických nebo difúzních. Metody stanovení rezistence mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám jsou rozdělovány na kvalitativní a kvantitativní [13-15]. Kvalitativní metody se využívají hlavně k rutinním stanovením citlivosti mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám. Mezi kvalitativní metody patří nejrůznější difúzní metody, např. kapkové (dochází k nakápnutí antimikrobiální látky na povrch média), diskové (využívá se disk filtračního papíru napuštěného antimikrobiální látkou), jamková (do zatuhlého média se vyhloubí jamky, do kterých se pipetuje antimikrobiální látka) a další [13, 14].

Vyhodnocení výsledků kvalitativních metod se provádí měřením inhibičních zón. Podle velikosti inhibiční zóny se sledované mikroorganismy označí jako citlivé (S – Susceptible), středně rezistentní (I – Intermediate) nebo rezistentní (R – Resistant) vůči použité antimikrobiální látce. Kvantitativní metody slouží k určení tzv. minimální inhibiční koncentrace (MIC – Minimal Inhibitory Concentration). MIC hodnota označuje nejnižší testovanou koncentraci antimikrobiální látky, která viditelně inhibuje růst mikroorganismů. Nejčastěji se MIC vyjadřuje v jednotkách hmotnosti na jednotky objemu, např.  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Stejně jako u kvalitativních metod se mikroorganismus označí jako citlivý, středně rezistentní nebo rezistentní. Kvantitativní metody jsou vhodné ke stanovení rezistence mikroorganismů izolovaných z potravin [13, 29].

Nejčastější mechanismy účinku antimikrobiálních látek [13]:

- Inhibice syntézy buněčné stěny.
  - Způsobena látkami jako např. beta-laktamy, glykopeptidy.
- Poškození syntézy cytoplasmatické membrány.
  - Např. polypeptidy (polymyxin B).
- Inhibice proteosyntézy.
  - Např. aminoglykosidy, tetracyklíny nebo chloramfenikol.
- Porucha syntézy nukleových kyselin.
  - Např. chinolony, nitroimidazoly.
- Antagonismus a kompetitivní inhibice.
  - Např. sulfonamidy.

### 2.4.1 Difúzní metody

#### 2.4.1.1 Disková difúzní metoda (*Disk-Diffusion Method*)

Disková difúzní metoda patří mezi nejvíce využívanou kvalitativní metodu stanovení citlivosti mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám. Tato metoda se využívá zejména pro stanovení citlivosti u bakterií rychle rostoucích a nenáročných, popřípadě i u některých náročnějších bakterií. Metoda byla vyvinuta v roce 1940. Je založena na interakci papírového disku (průměru cca 6 mm) napuštěného antimikrobiální látkou s povrchem inokulovaného

agaru, kde dochází k difundování molekul antimikrobiální látky do agaru. Jednotlivé disky jsou napuštěny různými koncentracemi antimikrobiální látky, čímž dochází k tvorbě různě velkých inhibičních zón. Okraje inhibiční zóny vznikají ve chvíli, kdy je koncentrace antimikrobiální látky stále schopná inhibovat mikroorganismy [13-15, 29].

U této metody nás také zajímá difúzní koeficient antimikrobiální látky, který je ovlivněn její molekulovou hmotností, velikostí, iontovým nábojem, ale také např. rozpustností ve vodě, teplotou, viskozitou a výškou agaru, popřípadě dalšími inkubačními podmínkami. Růst mikroorganismů je ovlivněn několika faktory, a to hlavně dostupností živin, teplotou, hustotou populace atd. [13].

Výsledky této metody mohou být využity jako kvalifikovaný odhad pro predikci léčebných výsledků antibiotik u zdravých pacientů, v případě normálních dávek. Avšak stanovení pouze touto metodou není dostatečné pro určení klinické účinnosti antibiotika, vzhledem k ovlivnění řadou faktorů. V praxi se využívá korelace právě s metodami kvantitativními, kde získáváme důležité MIC hodnoty [13].

Využití této metoda nalézá např. také jako screening některých speciálních mechanismů rezistence mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám. Patří sem hlavně detekce rezistence k vysokým hladinám aminoglykosidů i enterokoků, popřípadě také detekce přítomnosti širokospektré  $\beta$ -laktamasy a izolátů *E. coli* a dalších. V dnešní době se běžně používá v klinické praxi [13].

#### 2.4.1.2 Difúzní jamková metoda (Well Diffusion Method)

Opět se jedná o metodu kvalitativní. Metoda je obdobná k metodě diskové. Tato metoda se využívá zejména ke stanovení antimikrobiální aktivity u rostlinných a mikrobiálních extraktů.

Na stanovení se připraví agarová plotna, na jejíž povrch se rozetře inokulum se sledovaným mikroorganismem. Poté jsou do agaru asepticky vytvořeny jamky o průměru okolo 6 až 8 mm pomocí sterilního korkovrtu, nejčastěji se přitom volí 4 jamky (viz Obrázek 5.). Do vzniklých jamek je následně možné pipetovat roztok antimikrobiální látky o známé koncentraci. Antimikrobiální látka během kultivace difunduje z jamky do okolí a inhibuje růst mikroorganismů. Vyhodnocení se provádí stejně jako u diskové metody měřením inhibičních zón, které se vytvoří v okolí jamky [14, 29].



Obrázek 5.: Stanovení antimikrobiální aktivity Vipsilveru vůči *Kocuria rosea* difúzní jamkovou metodou [30]

## 2.4.2 Diluční metody

### 2.4.2.1 Agarová diluční metoda (Agar Dilution Method)

Jedná se o referenční metodu stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám. Dále se využívá k ověřování spolehlivosti ostatních metod [13].

Na provedení metody se nejčastěji využívá živné médium Mueller-Hinton agar. Pro stanovení se do tohoto média ještě přidává antimikrobiální látka. Antimikrobiální látka je naředěna na požadované koncentrace a přidána k vytemperovanému agaru, který má teplotu okolo 45–50 °C. Médium je následně rozléváno na Petriho misky, přičemž výška agaru by měla být okolo 3–4 mm. Po zatuhnutí agaru se plotny skladují po několik dní při nízkých teplotách. Standardně se pro stanovení připravuje 12–15 koncentrací antimikrobiální látky, a to řaděním dvojnásobnou geometrickou řadou. Inokulum obsahující sledované mikroorganismy je aplikováno na předsušené agarové plotny ve formě spotů pomocí speciálního vzorkovače. Jedna Petriho miska může obsahovat stanovení až 20 různých kmenů bakterií. Odečítání hodnoty MIC je prováděno po určité době inkubace. Inkubační podmínky jsou nastaveny tak, aby vyhovovaly testovanému mikroorganismu [13, 15, 29].

Využití nalézá např. u hodnocení účinku nových antibiotik. Metoda je zároveň vhodná jak pro stanovení antibakteriálních, tak i antifungálních účinků. Metoda je také doporučována pro testování náročnějších mikroorganismů, jako jsou např. anaeroby nebo *Helicobacter* spp. Dále se metoda využívá ke studiu účinku antifungálních látek v kombinaci s rostlinnými extrakty, a to vůči mikroorganismům jako *Candida* spp., *Aspergillus* nebo *Fusarium*. [13, 29].

### 2.4.2.2 Diluční mikrometoda (Broth Micro-Dilution Method)

Dříve byla kvantitativní metoda dilučního testu prováděná ve zkumavkách naplněných bujonem. V dnešní době se již z ekonomického hlediska upřednostňuje levnější varianta v mikrotitračních destičkách [13, 15].

Test se provádí v mikrotitračních destičkách s 96 jamkami, a to buďto s kulatým nebo kónickým dnem (Obrázek 6.). Antimikrobiální látka je opět ředěna dvojnásobnou řadou v tekutém živném médiu. Živné půdy s antimikrobiálními látkami jsou mechanicky plněny do jednotlivých jamek po cca 100 µl na jamku. Na stanovení se obvykle připravuje 8 koncentrací jedné antimikrobiální látky, přičemž na jedné destičce se pak vyšetřuje až 12 antimikrobiálních látek pro jeden kmen. Jamky v tomto případě slouží jako kontrola růstu mikroorganismů a pro kontrolu kontaminace živného média je možné jednu jamku nezaočkovat. Destičky je možné si připravit přímo v laboratoři nebo je možné je získat od komerčních výrobců [13, 15, 29].

Do jednotlivých jamek se následně přidává standardní inokulum testovaného kmene mikroorganismu. Vyhodnocení po inkubaci se provádí odečtem MIC pro jednotlivé antimikrobiální látky. Odečítání MIC lze provést vizuálně porovnáním zákalu, popřípadě pomocí „readeru“, který měří hodnotu absorbance jednotlivých jamek. K vyhodnocování lze také použít nejrůznější kolorimetrické metody, za použití barviv jako např. tetrazoliová sůl nebo alamarová modř. U antimikrobiálních látek trimethoprimu, sulfoaminu a jejich kombinace se odečítá koncentrace, kdy dochází k inhibici 80 % růstu oproti kontrolní jamce bez antimikrobiální látky [13, 15, 29].

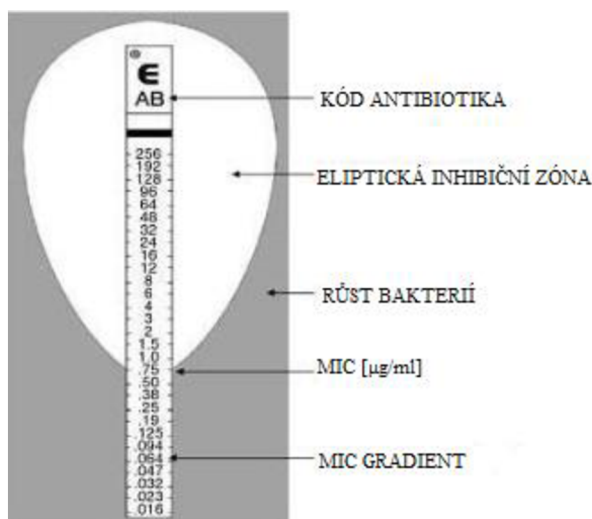


Obrázek 6.: Stanovení účinnosti extraktů rostlin vůči *B. subtilis* mikrodiluční metodou za použití resazurinu jako indikátoru růstu [29]

### 2.4.2.3 Etest

Jedná se o metodu vyvinutou ve Švédsku, která byla poprvé použita v roce 1988. Etest je moderní metoda spojující principy diskové difúzní a agarové diluční metody. Etest je vhodný pro stanovení MIC hodnoty u řady mikroorganismů, díky jeho vysoké shodě s výsledky MIC získanými jinými známými metodami. Právě i z tohoto důvodu je metoda vhodná i pro náročnější bakterie a anaeroby [13, 29].

Etest má podobu plastového proužku (Obrázek 7.), na spodní straně proužku je pak imobilizovaný předdefinovaný koncentrační gradient antimikrobiální látky (antibiotika nejčastěji) ve vysušeném stavu. Na přední straně je stupnice určující koncentraci látky. Gradient koncentrací je kalibrován na odpovídající hodnoty MIC, přičemž se jedná o řadu minimálně 15-ti dvojnásobných geometrických ředění [13, 15, 29].



Obrázek 7.: Schéma proužku Etestu [13]

Na provedení testu se připraví inokulum, které se následně aplikuje na povrch předsušené agarové plotny, a to buď sterilním tamponem nebo přelitím sterilní pipetou. Přelití se provádí tak, že se sterilní pipetou nanese na povrch agaru inokulum, a po přelití celého povrchu se přebytečné inokulum odsaje pryč. Následně se nechá inokulum zaschnout. Po zaschnutí se Etest

umístí na Petriho misku. Čím větší je Petriho miska, tím více Etestů je možné na ni umístit. Proužek Etestu se na misku pokládá ručně nebo pomocí automatického dispensoru. Gradient antimikrobiální látky (antibiotika) se musí dotýkat povrchu agaru, stupnice je přitom orientována vzhůru. Dle požadavků testovaného mikroorganismu jsou poté navoleny inkubační podmínky. Z Etestu umístěného na plotně se začne uvolňovat antimikrobiální látka do agaru. Pod proužkem a v jeho okolí se vytváří stabilní a kontinuální gradient antimikrobiální látky, který je udržován cca 18–20 hodin. Koncentrace minimální inhibice se odečte v místě, kde dochází ke křížení eliptické inhibiční zóny se stupnicí gradientu [13, 15].

Etest se běžně využívá v klinické diagnostice aerobních i anaerobních mikroorganismů, jako jsou streptokoky, pneumokoky, hemofily, gonokoky apod. Kromě antibiotik jsou k dostání také Etesty s antifungálními látkami, které umožňují testování citlivosti např. u *Candida* spp. Upravenými Etesty lze dosáhnout detekce speciálních mechanismů rezistence, jako např. širokospektrých  $\beta$ -laktamas nebo metalo- $\beta$ -laktamas [13, 29].

Srovnání výhod a nevýhod uvedených antimikrobiálních metod je uvedeno v Tabulce 1.

Tabulka 1.: Srovnání výhod a nevýhod antimikrobiálních metod [13-15, 29, 31]

Metoda	Výhody	Nevýhody
Disková difúzní metoda	<ul style="list-style-type: none"> <li>Jednoduché provedení,</li> <li>nenáročné požadavky na vybavení,</li> <li>možnost testování velkého množství mikroorganismů i antimikrobiálních látek,</li> <li>snadná modifikace testů vyšetřovaných antimikrobiálních látek,</li> <li>nízká cena.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nelze určit hodnotu MIC,</li> <li>časová náročnost,</li> <li>riziko překrytí inhibičních zón,</li> <li>nevhodná pro mikroorganismy izolované z potravin,</li> <li>není možno rozlišit mikrobistatický účinek od mikrobicidního.</li> </ul>
Difúzní jamková metoda	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nenáročnost na sterilní podmínky,</li> <li>difúze látky neovlivněna ostatními látkami,</li> <li>rychlá a citlivá metoda.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pracná příprava jamek,</li> <li>nebezpečí přelítí látky mimo jamky.</li> </ul>
Diluční mikro-metoda	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vysoká shoda s výsledky agarové diluční metody,</li> <li>pružná a snadná příprava velkého množství destiček,</li> <li>možnost dlouhodobého uchování destiček při <math>-20\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, aniž by došlo ke snížení kvality,</li> <li>jednoduché a levnější provedení oproti makrodilučnímu testu,</li> <li>možnost automatizace odečtu výsledků a vyhodnocení,</li> <li>koncentrace inokula neovlivňuje významně výsledek.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Obtížné rozpoznání kontaminace bakteriálního kmenu,</li> <li>neschopnost detekce rezistentní subpopulace,</li> <li>nelze použít u kmenů, které v tekutém prostředí autolyzují,</li> <li>komerční destičky nemusí vyhovovat dané laboratoři.</li> </ul>

MO – mikroorganismus, MIC – minimální inhibiční koncentrace



Tabulka 1 pokr.: Srovnání výhod a nevýhod antimikrobiálních metod [13-15, 29, 31]

Metoda	Výhody	Nevýhody
Etest	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Velmi rychlá a jednoduchá metoda,</li> <li>• lepší možnost odhalení kontaminace testovaných kmenů MO,</li> <li>• možnost studia kombinovaného účinku dvou antimikrobiálních látek,</li> <li>• test lze provádět na širokém spektru živných půd a za různých inkubačních podmínek.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vysoká cena testovacích proužků,</li> <li>• výsledky ovlivněny koncentrací inokula.</li> </ul>
Agarová diluční metoda	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vysoká standardizovatelnost provedení,</li> <li>• možnost vyšetření velkého množství kmenů za standardních podmínek,</li> <li>• spolehlivější odhalení kontaminace oproti mikrodiluční metodě,</li> <li>• lepší detekce heterorezistence.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pracná metoda,</li> <li>• časově i ekonomicky náročná,</li> <li>• nepraktická pro stanovení malého počtu či jednotlivých kmenů MO,</li> <li>• problém u MO s plazivým růstem.</li> </ul>

MO – mikroorganismus, MIC – minimální inhibiční koncentrace

## 2.5 Metody stanovení antioxidační aktivity extraktů

Metod stanovení antioxidační aktivity je celá řada, jelikož nízkomolekulární antioxidanty mohou působit nejrůznějšími mechanismy. Nejčastěji dochází k přímé reakci s radikály, případně k reakci s přechodnými kovy. Rozdělení odpovídá různým principům, pomocí kterých je možné hodnotit antioxidační aktivitu, přičemž základní rozdělení může vypadat např. takto [17, 21, 32]:

1. Metody založené na eliminaci radikálů:
  - a. Metody hodnotící eliminaci syntetických radikálů:
    - i. **Metoda používající ABTS (metoda TEAC),**
    - ii. **metoda používající DPPH (metoda dle Kanedy),**
    - iii. metoda používající galvinoxyl.
  - b. Metody hodnotící eliminaci kyslíkových radikálů:
    - i. Metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity),
    - ii. metody založené na vychytávání OH-radikálů,
    - iii. metody založené na vychytávání superoxidového anion-radikálu.
  - c. Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace.
2. Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek:
  - a. Metody chemické:
    - i. Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential).
  - b. Metody elektrochemické:
    - i. Cyklická voltametrie,
    - ii. HPLC metoda s elektrochemickou detekcí.

### 2.5.1 Metoda využívající ABTS

Jedná se o metodu založenou na eliminaci radikálů, tudíž se nejedná o metodu, která by přímo měřila antioxidační aktivitu jako takovou. Metody tohoto principu jsou hodnoceny dle schopnosti vzorku vychytávat volné radikály [17, 18]. Poprvé byla popsána v práci Miller a kol. [33].

Metoda ABTS, jinak zvaná TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity), je základní a nepoužívanější metoda ke stanovení antioxidační aktivity. Metoda je založena na schopnosti stanovovaného vzorku zhaset kation-radikál ABTS<sup>•+</sup> (2,2.-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)) modro-zelené barvy, který má maximální absorpenci při 734 nm. Název TEAC získala metoda díky tomu, že výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnána s antiradikálovou aktivitou látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) [17, 21, 32, 34, 35].

Ke zhasení radikálu ABTS<sup>•+</sup> dochází pomocí antioxidantů, které fungují jako donory vodíku. Tento proces, kdy dochází také k odbarvení roztoku, je pak možné sledovat spektrofotometricky, vyhodnocováním změn absorpčního spektra radikálu ABTS<sup>•+</sup>. Absorbance se nejčastěji měří při 734 nm po dobu cca 5 minut [17, 21, 33-35].

Měření může probíhat dvěma způsoby. Prvním častějším způsobem je měření antioxidační aktivity po přidání antioxidantu do reakční směsi, která již obsahuje vytvořený radikál ABTS<sup>•+</sup>. Radikál je vytvořen nejčastěji pomocí oxidačního činidla, jako např. peroxosíranu draselného nebo oxidu manganičitého, smíchaného s ABTS a inkubovaného v acetátovém pufru (pH 4,3) při 45 °C po dobu cca 60 minut. Druhou možností je měření aktivity, kdy antioxidant je přítomen již v reakční směsi během tvorby radikálu ABTS<sup>•+</sup>. Měření metodou ABTS je možné provádět též pomocí komerčních setů [17, 32, 34].

Vyhodnocení antioxidační aktivity se provádí hodnocením parametru TEAC, který označuje antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu Troloxu. Relativní antioxidační aktivita je pak definována jako koncentrace Troloxu se stejnou antioxidační aktivitou jako má 1 mmol·l<sup>-1</sup> koncentrace stanovovaného vzorku [17, 32].

Metoda je vcelku jednoduchá, rychlá a má široké uplatnění. Je možné stanovovat látky různého původu, dokonce i jejich směsi. Nevýhodou této metody je, že ABTS<sup>•+</sup> je radikál kation, zatímco peroxylový radikál je neutrální. Tudíž antioxidanty s ABTS<sup>•+</sup> reagují elektron přenašečovým mechanismem, zatímco s peroxylovým radikálem reagují přesunem atomu vodíku. Metoda má tedy malou selektivitu při reakcích s donory vodíkových atomů. Metoda je vhodná pro měření hydrofilních i lipofilních antioxidantů [17, 20, 34, 35].

### 2.5.2 Metoda dle Kanedy (DPPH)

Metoda DPPH neboli metoda dle Kanedy, je další z metod hodnotící eliminaci radikálů. Je jednou ze základních metodik stanovení antiradikálové aktivity u čistých látek i různých směsí látek [17].

Metoda je založená na reakci stanovované látky se stabilním volným radikálem DPPH fialové barvy (difenylpikrylhydrazylem – 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl) hydrazyl), který přechází do formy stabilní diamagnetické molekuly. Během reakce dochází k postupnému odbarvování roztoku, které je možné sledovat spektrofotometricky [17, 18, 32].



Reakce probíhá jako redukce radikálu DPPH za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin) a je sledována spektrofotometricky při cca 517–520 nm. Měří se pokles absorbance způsobený účinkem antioxidantů buďto po určitém časovém úseku, nebo se pracuje v kinetickém režimu. Dalšími možnými metodami sledování reakce je elektronová spinová rezonance (ESR – Electron Spin Resonance) nebo kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography), kde se sleduje plocha pásu odpovídající DPPH. Antioxidační aktivitu lze vyjádřit pomocí  $EC_{50}$  (Extract Concentration), která popisuje koncentraci antioxidantů potřebných ke snížení koncentrace radikálu DPPH o 50 % popřípadě lze použít vyjádření  $T_{EC50}$ , který popisuje čas potřebný k dosažení 50 % snížení DPPH radikálu [17, 18, 21, 32].

Měření antioxidační aktivity lze provést např. smícháním roztoku DPPH v ethanolu s acetátovým tlumivým roztokem (pH 4,3) a to v poměru 2:1. K tomuto vzniklému roztoku je následně přidán vzorek stanovované látky a ihned po přidání je změřena absorbance. Ta je měřena v dalších časových intervalech např. po 1 minutě. Celkové měření může trvat cca 10–60 minut. Měření se provádí při laboratorní teplotě. Výsledky jsou následně prezentovány jako úbytek DPPH po stanovené době měření v procentech. V případě směsí vzorků je radikálová aktivita vyjadřována v ekvivalentech askorbové kyseliny nebo v jednotkách standardu Troloxu. Metoda je více selektivní při reakci s donory vodíku než metoda ABTS [17, 20, 32, 34].

### 2.5.3 Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení celkových polyfenolů (TPC – Total Phenolic Content) je možné pomocí metody Folin-Ciocalteu (F-C). Metoda byla poprvé použita v práci Folin a Ciocalteu [36] k analýze proteinů, kde využili reaktivitu F-C činidla k proteinu tyrosinu, který obsahuje fenolickou složku. Singleton a kol. [37] v roce 1999, tedy o mnoho let později, rozšířili původní metodu o stanovení fenolů ve víně. Od tohoto roku došlo k objevení nespočtu dalších využití této metody. Postupem času se metoda stala známá zejména jako metoda pro stanovení celkových fenolických látek. F-C činidlo je nejčastěji složeno z wolframnanu sodného ( $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ ), molybdenanu sodného ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ), koncentrované HCl, 85% kyseliny fosforečné ( $H_3PO_4$ ), síranu lithného ( $Li_2SO_4 \cdot 4H_2O$ ) a vody. Tato směs dává činidlu intenzivní žluté zbarvení, které se v přítomnosti redukujících kontaminantů mění na zelenou barvu [36-38].

Pro stanovení je třeba vytvořit zásadité pH (~10), k čemuž je využíván uhličitan sodný. Při zásaditém pH dochází k reakci mezi fenolickými složkami vzorku a F-C činidlem. Disociace fenolického protonu vede k tvorbě fenolátových iontů, které jsou schopny redukovat F-C činidlo. Reakce je doprovázena barevnou změnou, kdy ze žlutého zbarvení vzniká modré. Měří se absorbance pomocí UV/VIS (Ultraviolet-Visible Light) spektrometru při vlnové délce okolo 750 až 765 nm. Metoda je v zásadě jednoduchá, snadno použitelná a reprodukovatelná, čímž si získala velkou oblibu při rutinních stanoveních fenolických sloučenin. Metoda je značně využívána v klinické a nutriční analýze k měření obsahu polyfenolů v rostlinných a biologických vzorcích. Výsledky metody F-C korelují velmi dobře s výsledky jiných metod studujících antioxidační aktivitu (ORAC, ABTS, DPPH) [36-40].

## 2.6 Metody stanovení aromaticky aktivních látek v extraktech

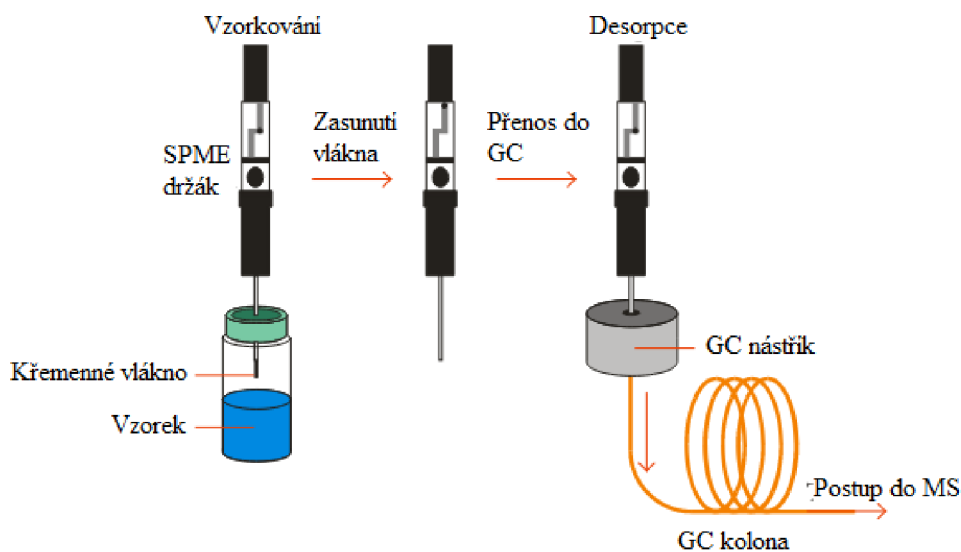
Jednou z nejvíce využívaných metod ke stanovení aromaticky aktivních látek (AAL) je plynová chromatografie (GC – Gas Chromatography). V celé řadě studií, zabývajících se charakteristikou rostlinných extrakcí, byly využity metody plynové chromatografie s hmotnostní (GC-MS – Gas Chromatography-Mass Spectrometry) nebo plamenově ionizační detekcí (GC-FID – Gas Chromatography-Flame Ionization Detector) [41-45].

Kromě plynové chromatografie je možné využít i jiných metod. V roce 2016 Sonmezdag a kol. [44] využili ke stanovení AAL v divokém tymiánu (*Thymus serpyllum*) kromě GC-MS také kapalinovou chromatografii ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, za využití ionizace elektrosprejem (LC-ESI-MS/MS) [44].

### 2.6.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie byla poprvé představena v roce 1952 v práci James a Martin [46]. Principem metody je rozdělení složek vzorku mezi stacionární a mobilní fázi. V případě plynové chromatografie je mobilní fází plyn, nejčastěji helium, vodík nebo dusík. Kolony jsou v dnešní době téměř výhradně využívány v kapilárním provedení, kdy je stacionární fáze uchycena na vnitřní stěně kolony. Páry vzorku vzniklé ve vyhřívaném injektoru putují do kolony, kde jsou separovány na jednotlivé frakce. Podle afinity ke stacionární nebo mobilní fázi dochází k rozdělení komponent vzorku. Složka, která má nejnižší afinitu ke stacionární fázi bude eluována (vymývána) z kolony jako první, následována dalšími složkami, až po složku s nejvyšší afinitou ke stacionární fázi. Po průchodu kolonou jsou složky unášeny mobilní fází k detektoru. V plynové chromatografii lze využít několik typů detektorů, např. plamenově ionizační (FID), tepelně vodivostní, dusíko-fosforový, plameno-fotometrický detektor, detektor elektronového záchytu nebo v současnosti asi nejvyužívanější možnost spojení GC-MS, kde jako detektor slouží hmotnostní spektrometr [47].

Pro stanovení těkavých látek se nejvíce využívá spojení plynové chromatografie s mikroextrakcí pevnou fází (SPME – Solid Phase Micro Extraction). Mikroextrakce pevnou fází byla vyvinuta týmem Pawliszyn a kol. [48] v roce 1990. Slouží jako metoda pro extrakci těkavých látek z kapalných i pevných vzorků. Funkci SPME zajišťuje 1 cm dlouhé křemenné vlákno pokryté polymerem. Toto vlákno je spojeno s ocelovým pístem a umístěno v duté ocelové jehle. Jehla má v případě SPME 2 funkce, slouží jako ochrana vlákna před mechanickým poškozením a také k propíchnutí septa vialky, kdy je křemenné vlákno zasunuto uvnitř jehly. Po propíchnutí septa je křemenné vlákno vysunuto do prostoru vialky a dochází k sorpci analytu na jeho povrch. Následně je vlákno opět zasunuto do jehly a přesunuto do GC injektoru, kde je analyt uvolněn desorpcí. Vzorkování lze provést dvěma způsoby, přímým ponořením vlákna do kapalného vzorku (DI, Direct Immersion) nebo adsorpcí analytu z plynného prostoru nad vzorkem (HS, Head-Space). Právě provedení HS-SPME ve spojení s GC je nejčastěji využíváno ke stanovení AAL v extraktech rostlin. Schéma principu spojení HS-SPME-GC lze vidět na Obrázku 8. [47, 49, 50].



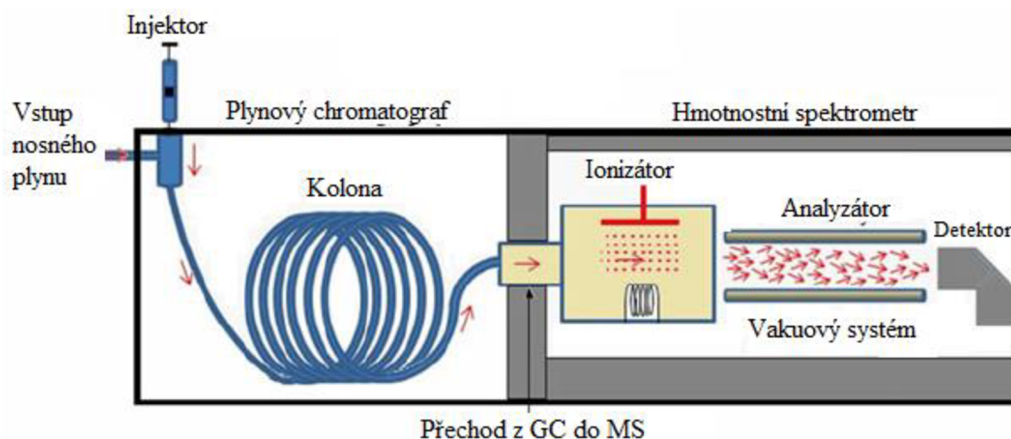
Obrázek 8.: Schéma principu spojení HS-SPME-GC (upraveno) [51]

### 2.6.1.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, jejímž principem je generování iontů z anorganických nebo organických sloučenin, jejich následná separace dle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$  – Mass to Charge Ratio), a nakonec jejich detekce. Ve spojení s plynovou chromatografií se k ionizaci nejvíce využívá elektronová nebo chemická ionizace. Jako analyzátoři se využívají zejména kvadrupólový analyzátor, analyzátor doby letu nebo iontová past [47, 52, 53].

Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem patří mezi jednu z nejvyužívanějších metod k identifikaci a kvantifikaci látek. Je téměř nenahraditelná v mnoha oblastech vědy. Metoda je využívána ke stanovení bezpečnosti potravin, v lékařství, v biologických studiích apod. Výhodou spojení metod je možnost stanovení komplexních směsí. Schéma GC-MS lze vidět na Obrázku 9. [47, 53].

Metodu GC-MS ke stanovení aromaticky aktivních látek v rostlinných extraktech využili např. Xuan a kol. [43] nebo Campbell a kol. [41].



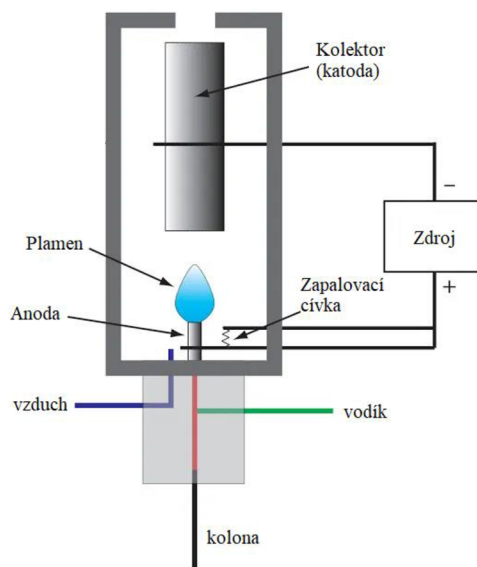
Obrázek 9.: Zjednodušené schéma instrumentace GC-MS (upraveno) [54]

### 2.6.1.2 Plamenově ionizační detektor

Plamenově ionizační detektor je schopen detekovat téměř všechny organické látky, které obsahují uhlovodíkovou vazbu. Je to jeden z nejvíce využívaných detektorů GC. Princip spočívá v měření změny elektrické vodivosti plamene, která nastává v přítomnosti organické látky procházející detektorem. Detektor je tvořen hořákem, kterým je zespod přiváděn nosný plyn z kolony a zároveň také inertní plyn, nejčastěji vodík nebo dusík. Kromě těchto plynů je přiváděn ještě vzduch, který slouží jako oxidační činidlo. Detektor je opatřen dvěma elektrodami, na které je vloženo stejnosměrné napětí. Schéma detektoru lze vidět na Obrázku 10. [47, 55].

Pokud putuje do hořáku pouze nosný plyn, jeho spálením vzniká zanedbatelné množství iontů, které neovlivní sledovaný proud. Ve chvíli, kdy do plamene vstoupí eluovaná složka a dojde k jejímu spálení, vzniknou ionty a elektrony, které způsobí zvýšení elektrické vodivosti [47, 55].

Plamenově ionizační detektor v kombinaci s plynovou chromatografií využili ke stanovení AAL v extraktu rostlin např. Blythe a kol. [42] nebo Högnadóttir a kol. [45].



Obrázek 10.: Schéma plamenově ionizačního detektoru (upraveno) [56]

## 2.7 Možnosti využití antimikrobiálních účinků přírodních extraktů

### 2.7.1 Antimikrobiální účinky extraktů rostlin

Do dnešní doby byl proveden nespočet studií zabývajících se antimikrobiálními účinky přírodních extraktů. Byly analyzovány nejrůznější druhy rostlin a sledovány účinky jejich extraktů vůči bakteriím, ať už grampozitivním nebo gramnegativním, vůči plísním nebo kvasinkám. Jedním z příkladů je např. studie Razafintsalama a kol. [57], zabývající se methanolovými extrakty 14 bylin z Madagaskaru, které se využívají v tradiční medicíně. Vieitez a kol. [58] se zaměřili na studium ovlivnění antimikrobiálních účinků extraktů podle způsobu jejich získání. Provedli extrakce pomocí klasické macerace (ethanol, hexan) a extrakci superkritickým CO<sub>2</sub>. Extrakty rostlin získané superkritickým CO<sub>2</sub> se ukázaly být více účinné k inhibici mikroorganismů oproti extraktům získaným klasickou macerací [57, 58].

Poměrně rozsáhlou studii provedli Zazharskyi a kol. [59], kde sledovali antimikrobiální účinnost extraktů z 50 různých druhů rostlin. Mezi testovanými rostlinami byly např. *Echinacea purpurea*, *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare*, *Salvia sclarea*, *Lavandula angustifolia*, *Ficus benjamina*, *Citrus sinensis* a další. Extrakty byly testovány proti množství mikroorganismů, mezi kterými byly i patogenní bakterie *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* nebo kvasinka *Candida albicans*. Nejlepší antimikrobiální aktivitu vykazoval extrakt rostliny *Punica granatum*, *Lavandula angustifolia* nebo *Echinacea purpurea*. Pouze 16 vzorků rostlin inhibovalo růst *S. typhimurium* a pouze 7 inhibovalo růst *E. coli* [59].

Zajímavou studii, zaměřenou na využití léčivých bylin v domácí medicíně, se zabývali Sewani-Rusike a kol. [60]. Studie byla zaměřena na rodiny studentů medicíny. Celkem odhalili využívání až 47 druhů rostlin. Mezi druhy byli např. *Zingiber officinale*, *Ocimum tenuiflorum*, *Mentha piperita*, *Lavandula* spp., *Eucalyptus regnans* nebo *Allium cepa*. Tyto byliny využívali v rodinách na gastrointestinální problémy, na poranění, na dýchací problémy, proti infekcím, bolestem (včetně bolestí hlavy). Využití našly byliny také vůči chronickým onemocněním, jako je vysoký tlak, cukrovka nebo rakovina. Mezi sledovanými bylinami byla také *Tetradenia riparia*, která nacházela v domácí medicíně využití proti bolestem břicha, průjům, kašli nebo nachlazení [60].

### 2.7.2 Využití rostlinných extraktů v potravinářství

Vzhledem ke stále se zpřísnujícím požadavkům na bezpečnost potravin jsou neustále hledány látky a jejich zdroje, které nějakým způsobem zlepšují bezpečnost potravin. Jedná se zejména o látky s antioxidačními a antimikrobiálními vlastnostmi. V dnešní době je tlak zejména na používání co nejvíce přirozených antimikrobiálních látek, zejména z rostlinných materiálů. Tyto materiály často obsahují vysoký obsah esenciálních olejů, které fungují jako antimikrobiální látky vůči různým druhům mikroorganismů. Zejména problémové z pohledu potravinářství jsou mikroorganismy *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* apod. Většina těchto bakterií způsobuje po požití nejruznější zdravotní problémy v trávicím traktu, nejčastěji pak průjemy [9, 61, 62].

Antimikrobiální látky jsou často produkovány jako sekundární metabolity, které mohou být použity např. jako léčiva (antibiotika). Pro aplikaci v potravinářství jsou zejména významné sekundární metabolity rostlin, které často vykazují zároveň antimikrobiální i antioxidační aktivitu. V průběhu let bylo provedeno mnoho studií, kde se sledoval potenciál různých rostlin produkovat antimikrobiální látky. V dnešní době bylo objeveno na 1350 rostlin vykazujících antimikrobiální aktivitu a identifikováno na 30 000 antimikrobiálních látek izolovaných z rostlin. Problémem spojeným s extrakty z rostlin je zejména jejich případné ovlivnění potravin, např. pachem, chutí [62, 63].

Je známo mnoho studií zabývajících se antimikrobiálními vlastnostmi extraktů rostlin, popřípadě esenciálních olejů rostlin. Tyto extrakty, resp. esenciální oleje, byly ve studiích použity jako aditiva a byl sledován jejich vliv na údržnost potravin. Velkou výhodou extraktů je, že mnoho z nich je označeno jako bezpečných z pohledu GRAS (Generally Recognised As Safe). Nejruznější esenciální oleje byly přidávány do potravin jako např. do masa, mléčných

výrobků, ovoce, zeleniny, ryb atd. Velké množství studií bylo provedeno zejména pro využití extraktů rostlin do masa a masných výrobků, které patří mezi nejrizikovější z hlediska možné kontaminace mikroorganismy. Příklady využití esenciálních olejů bylin v potravinářství lze najít v Tabulce 2. [61, 63, 64, 66-74].

V potravinářství nachází využití např. šalvějový esenciální olej, který je v koncentraci 0,3 % používán do rozmělněného hovězího masa spolu se sójovým proteinem. Studie Liu a kol. [75] se zabývala využitím rozmarýnu a česnekovníku čínského k prodloužení čerstvosti kuřecích párků [62, 75].

Jedním z možných využití antimikrobiálních látek je jejich použití ve formě povlaků nebo biofilmů, které vytvoří ochrannou bariéru na povrchu potraviny za současného uchování vizuální atraktivity pro spotřebitele. Gómez-Estaca a kol. [77] sledovali účinek biofilmů na bázi želatiny obohacené o extrakty z oregana (*Origanum vulgare*) a rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*) na zlepšení skladovatelnosti uzených sardinek. Z výsledků vyvodili, že biofilm obohacený o rostlinné extrakty snížil míru oxidace lipidů a zároveň snížil mikrobiální růst. Podobným příkladem je možnost využití extraktu saturejky (*Satureja hortensis*) do povlaků obsahující polysacharid pullulan. Tímto možným využitím se zabývala studie Kraśniewska a kol. [78]. Testovali antibakteriální vlastnosti těchto filmů nanesených na papriky a jablka. Došli k závěrům, že připravené povlaky inhibovaly růst jak grampozitivních, tak gramnegativních bakterií, čímž se zároveň prodloužila také údržnost sledovaných potravin. Tesfay a kol. [79] sledovali účinnost extraktu listů a semen moringy přidaného do povlaku obsahující karboxymethylcellulosu. Tento povlak aplikovali na avokádo. Povlak s obsahem extraktu vykazoval inhibici růstu plísní [62, 76-79].

Tabulka 2.: Příklady využití rostlinných esenciálních olejů v potravinářství [64-74]

Potravina	Esenciální olej	Účinek	Studie
Čerstvé zelí	<i>Thymus vulgaris</i> <i>Origanum vulgare</i> <i>Cymbopogon flexuosus</i>	Antibakteriální	Hyun a kol. [68]
Jahody	<i>Syzygium aromaticum</i>	Antifungální	Aguilar-González a kol. [67]
Kuře	<i>Origanum vulgare</i>	Antimikrobiální	Fernández-Pan a kol. [72]
Papája	<i>Origanum vulgare</i> <i>Cinnamomum zeylanicum</i> <i>Cymbopogon flexuosus</i>	Antimikrobiální	Espitia a kol. [66]
Párky	<i>Ocimum basilicum</i>	Antibakteriální	Gaio a kol. [73]
Ryby	<i>Syzygium aromaticum</i>	Antimikrobiální, antioxidační	Gómez-Estaca a kol. [69], Salgado a kol. [70]
Sardinky	<i>Mentha suaveolens</i>	Antimikrobiální	Petretto a kol. [71]
Sýr	<i>Origanum vulgare</i>	Antimikrobiální	Otero a kol. [74]



### 2.7.3 Využití rostlinných extraktů v kosmetice

V kosmetice nacházejí rostlinné extrakty a esenciální oleje využití zejména jako antioxidanty, antimikrobiální látky a popřípadě barviva nebo vonné látky do parfémů. Herman a kol. [80] se ve studii zaměřili na porovnání antimikrobiální aktivity rostlinných extraktů (*Matricaria chamomilla*, *Aloe vera*, *Calendula officinalis*) a esenciálních olejů (*Lavandula officinalis*, *Melaleuca alternifolia*, *Cinnamomum zeylanicum*). Tyto rostlinné zdroje srovnávali s aktivitou methylparabenu. Aktivitu sledovali vůči *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans*. Esenciální oleje se prokázaly jako více inhibiční oproti extraktům a methylparabenu. Tato studie poukazuje na možnost využití jak extraktů, tak esenciálních olejů jako náhrad syntetických antimikrobiálních látek v kosmetice [80, 81].

Z rostlinných extraktů využívaných v kosmetice je možné uvést např. bazalku (*Ocimum sanctum*). Extrakt této rostliny vykazuje protizánětlivé účinky, kterých se využívá zejména k ošetření akné. Olej z listů *O. gratissimum* je používán na léčbu akné pro své antibakteriální vlastnosti. K léčbě akné je používán také např. extrakt z červené cibule (*Allium cepa*), který, stejně jako extrakt z bazalky, vykazuje i antimikrobiální účinky. Široké využití nachází v kosmetice také jojobový olej (*Buxus chinensis*, *Simmondsia chinensis*), který vykazuje analgetické, protizánětlivé, antipyretické, antioxidační, antibakteriální i antiparazitické vlastnosti. Asi nejvíce využívaná a nejnámější rostlina v kosmetice je *Aloe vera*. Tato rostlina se v kosmetice využívá zejména pro své antibakteriální, protizánětlivé, antioxidační vlastnosti, dále pro vysoký obsah nutrientů jako vitamíny, minerály, které napomáhají k hydrataci, léčbě a regeneraci kůže [82].

## 2.8 Čeleď *Lamiaceae*

Z širokého spektra léčivých bylin byl pro experimentální část této práce vybrán migrenovník (*Tetradenia spp.*), patřící do čeledě *Lamiaceae*.

Jedná se o velmi důležitou čeleď lékařských rostlin. Rostliny této čeledě tvoří aromatické byliny a keře. Do čeledě náleží byliny jako tymián, máta peprná nebo coleus (africká kopřiva). Rostliny jsou často pěstovány pro jejich zdravotní, parfémové, kulinářské a dekorativní využití. Pro medicínské účely se využívají zejména pro přítomnost aromatických esenciálních olejů, taninů, saponinů a organických kyselin. Oleje se získávají destilací a nacházejí využití např. v aromaterapii, kde vykazují zklidňující účinky. Rostliny mohou mít ale různé účinky od sedativních, močopudných, posilujících, protikřečových až po antiseptické [83-86].

Původně bylo předpokládáno, že rostliny patří spíše k čeledi *Verbenaceae*, ale v 90. letech během fylogenetických studií bylo odhaleno, že mnoho rodů považovaných za patřící do čeledi *Verbenaceae*, patří právě do čeledi *Lamiaceae*. *Lamiaceae* obsahuje na 236 rodů a okolo 6 900 až 7 200 druhů rostlin. Nejvíce obsáhlý je rod Šalvěj (*Salvia*, 1015 druhů), Šišák (*Scutellaria*, 471), Molicce (*Plectranthus*, 300) nebo Tymián (*Thymus*, 220). Díky své aromatické povaze jsou rostliny používány v kulinářství, známé jsou např. bazalka, máta, rozmarýn, šalvěj, saturejka, majoránka, oregano, tymián, levandule nebo perila. Jsou pěstovány nejen kvůli svým kvalitám, ale také díky jednoduchosti pěstování, patří mezi jedny z nejjednodušších na rozmnožování pomocí řízkování. U některých druhů pěstovaných jako potravina nejsou používány listy, ale naopak semínka, příkladem jsou např. semínka chia. Původní jméno

čeledě bylo *Labiatae*, ale v dnešní době většina botaniků upřednostňuje využívání jména *Lamiaceae* [83, 86, 87].

Čeď *Lamiaceae* zahrnuje rody, které se vyznačují vysokým obsahem fenolických kyselin, které jsou známy jako velmi účinné antioxidanty. Tyto rostliny jsou tedy považovány za dobrý zdroj přirozených antioxidantů. Ve studii z roku 2003 Ziaková a Brandšteterová [88] analyzovaly několik druhů rostlin čeledě *Lamiaceae*, konkrétně se jednalo o *Melissa officinalis* (Meduňka lékařská), *Rosmarinus officinalis* (rozmarýn), *Salvia officinalis* (šalvěj), *Thymus serpyllum* (tymián) a *Origanum vulgare* (oregano). Sledovaly obsah fenolických látek metodou HPLC, přičemž zjistily, že kyselina rozmarýnová byla nejvíce zastoupenou fenolickou kyselinou ve všech vzorcích. Další kyselinou přítomnou ve všech vzorcích byla kyselina kávová. Další fenolické látky byly ve vzorcích přítomny v množství až 100x nižším než kyselina rozmarýnová, a tudíž jejich antioxidační potenciál není příliš významný [88].

V současnosti je v Evropské unii povoleno využívání extraktu z rostliny *Rosmarinus officinalis* L. (Rozmarýn lékařský), patřící do rodu *Lamiaceae*. Bylo tak poprvé ustanoveno ve směrnici Komise 2010/67/EU dne 20. října 2010. Tato směrnice pozbyla platnosti v roce 2012 a byla nahrazena Nařízením Komise (EU) č. 231/2012 ze dne 9. března 2012. Směrnice a následně i Nařízení Komise posuzovaly bezpečnost rozmarýnových extraktů pro využití jako antioxidanty v potravinách. Bylo zjištěno, že extrakty rostliny *Rosmarinus officinalis* L. obsahují několik sloučenin, které vykazují antioxidační účinky, a to zejména fenolické sloučeniny, flavonoidy, diterpenoidy a triterpenoidy. Extrakty byly povoleny pro použití jako potravinářské přídatné látky dle směrnice Evropského parlamentu a Rady 95/2/ES. Extraktům rozmarýnu byl přidělen kód E392. Bylo popsáno několik typů výrobních postupů, které využívají extrakce rozpouštědlem (ethanol, aceton a hexan) a extrakce superkritickým oxidem uhličitým. Extrakty se získávají z listů rostliny a je možné je dezodorizovat a odbarvit, popřípadě mohou být extrakty také standardizovány [1, 89].

Kromě antioxidačních účinků jsou rostliny čeledě *Lamiaceae* studovány jako potenciální antimikrobiální látky. Kot a kol. [90] sledovali antimikrobiální aktivitu pěti esenciálních olejů získaných z několika rostlin této čeledě. Aktivitu sledovali vůči rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus*. Stanovení provedli pro rostliny *Lavandula angustifolia*, *Mentha piperita*, *Origanum majorana*, *Salvia officinalis* a *Thymus vulgaris*. Nejlepší inhibici vykazoval extrakt *T. vulgaris*, který by mohl být využit např. k lokálnímu ošetření kůže, toto využití však vyžaduje další důkladné klinické testování [64, 90].

Velmi rozsáhle je prostudována také antifungální aktivita rostlin z čeledě *Lamiaceae*. Souhrnný přehled vypracoval Karpiňski [91], kde poukázal na antifungální aktivitu 72 esenciálních olejů získaných z čeledě *Lamiaceae*. Nejvíce účinné vůči plísním a kvasinkám se ukázaly být rody *Clinopodium*, *Lavandula*, *Mentha*, *Thymbra* a *Thymus* [91].

## 2.9 Charakteristika rodu *Tetradenia* spp.

V minulosti byla identifikace afrických východních druhů rostlin značně zmatečná. Rod *Tetradenia* Benth. pocházející z Madagaskaru byl poprvé popsán Benthemem v roce 1830. Tento rod patřící do čeledě *Lamiaceae* byl považován za náležící pouze území Madagaskaru po dobu asi 150 let. V roce 1983 Codd objevil, že sedm druhů rodu *Iboza* N.E.Br.,

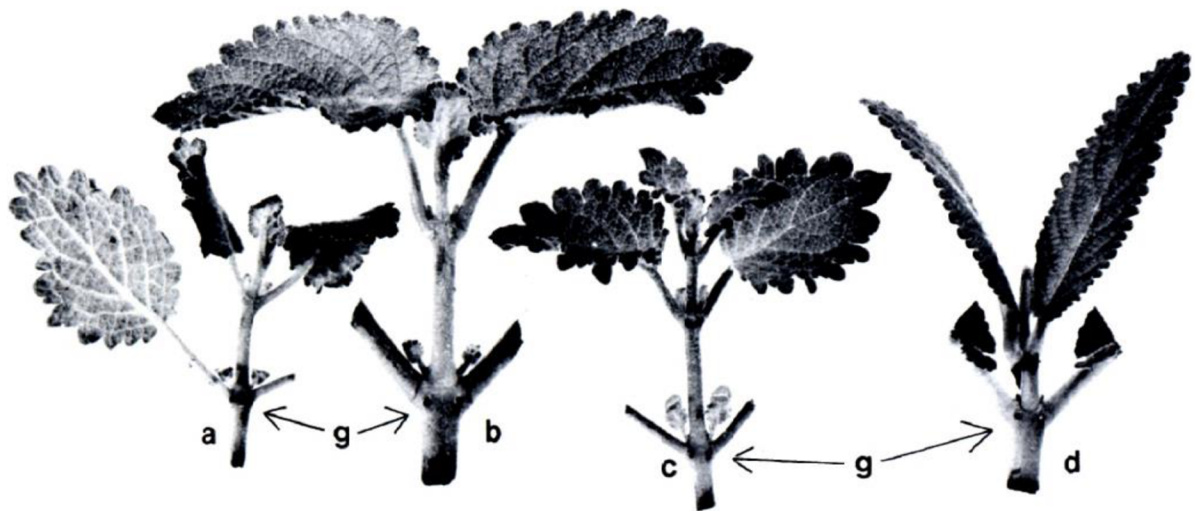


kteřé jsou původem z pevninské Afriky, se značně podobají právě rodu z Madagaskaru a odvodil, že si rody musí být příbuzné. Pouze 3 druhy *Iboza spp.* byly přiřazeny k rodu *Tetradenia* a vznikly tak nové názvy *T. barberae* (N.E.Br.) Codd, *T. brevispicata* (N.E.Br.) Codd a *T. riparia* (Hochst.) Codd. V rodu *Tetradenia* je v současnosti identifikováno a uznáno 20 druhů rostlin. Nejvíce studovaným druhem je *T. riparia*, dříve známá také jako *Iboza riparia* [92, 93].

Rod *Tetradenia* se přirozeně vyskytuje v oblasti od Eritrei až po Jižní Afriku, včetně Madagaskaru (Obrázek 11.). Jedná se o aromatické rostliny tvořící dvoudomé víceleté keřky, keře a výjimečně i malé stromy, většinou rozkvétající bezlisté až téměř bezlisté. Stonek bývá silný, ale křehký a semisukulentní. Aromatické listy, malé i větší, jsou řapíkaté s vroubkovanými nebo zoubkovanými okraji. Často bývají semisukulentní v různé fázi dospívání. Květy malé, jednopohlavní, výjimečně oboupohlavní (*T. barberae*) jsou uspořádány ve velkých a složitých latovitých květenstvích, jeho konce formované do špičky tvoří květnaté bodce. Kalich bývá krátký trubkovitý, protáhlá koruna je srostlá z 5 plátků a 2 pysků, které mohou být bílé až fialové barvy. Květy jsou podepírány listeny, mají obdobnou podobu jako listy a směrem vzhůru se zmenšují. Plodem bývají 4 vejčité, popřípadě podlouhlé hnědé tvrdky. Zajímavostí rodu jsou žláznaté struktury (Obrázek 12.) nacházející se u uzlů pod řapíkem, které byly pozorovány u všech druhů. Tyto struktury nebyly pozorovány u žádného jiného rodu čeledě *Lamiaceae*. Nejrozšířenějšími druhy *Tetradenia* jsou *T. galpinii*, *T. urticifolia* a *T. riparia*. Mezi druhy přirozeně se vyskytující pouze na Madagaskaru patří celkem 9 z 20 druhů tohoto rodu, jsou jimi např. *T. fruticosa*, *T. goudotii* nebo *T. nervosa* [92-95].



Obrázek 11.: Oblast přirozeně se vyskytujícího rodu *Tetradenia* [92]



Obrázek 12.: Mladé stonky rodu *Tetradenia* vyobrazující uzlové žlázy. a - (*T. brevispicata*, Codd 8778, z Britsu), b - (*T. riparia*, Codd 8398, z Soutpansbergu), c - (*T. riparia*, De Winter 3597, z jihovýchodní Afriky/Namibia), d - (*T. spp.*, Hardy a Rauh 2910, z Madagaskaru) [95]

### 2.9.1 Charakteristika *T. riparia*

*Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd (Obrázek 13.) tvoří drobné keře až menší stromy, 1 až 5 m vysoké, které bývají často volně rozvětvené. Stonky jsou semisukulentní, křehké, ale silné. Listy řapíkaté, vejčitého až okrouhlého tvaru, pokryté řídké až hustě žláznatými chloupky (trichomy) po obou stranách listu. Tvoří jednoduché hroznovité květenství zvané latovitě. Listy na květové ose (listeny) jsou silně zakulaceny. Kalich bývá cca 1 mm dlouhý, u zralých samičích květů prodloužen až na 2,5 mm. Okvěti bílé až fialkové, samčí okolo 3–3,5 mm dlouhé. Samičí je od samčího menší a má méně trychtýřovitý tvar. Je široce rozšířená v jižní Africe (Obrázek 14.), nalezneme ji od KwaZulu-Natalu, Svazijska, Mosambiku, Zimbabwe, Namibie, Botswany, Angoly až po Malawi [93-95].



Obrázek 13.: *T. riparia* [92]

Kvete převážně v období května až září. Roste spíše v nížinách a ve vlhčích lokalitách. Lze ji nalézt rostoucí i v lokalitách, kde rostou druhy *T. bainesii*, *T. brevispicata* a *T. galpinii*. *T. riparia* se vyznačuje výrazným dimorfismem mezi samčími a samičími květy a květenstvími. Samčí květy lze snadno odlišit od ostatních druhů díky jejich velké velikosti a dlouhým stonkům. *T. riparia* se nejvíce podobá *T. galpinii*. Lze je odlišit podle samčích květenství, dále také podle ochlupení stonku. U *T. riparia* lze na stonku nalézt převážně žláznaté trichomy, zatímco u *T. galpinii* můžeme nalézt žláznaté, ale i jiné nežláznaté trichomy. *T. riparia* má mnoho variací velikosti listů, jejich tvaru a ochlupení. Samčí rostliny *T. riparia* jsou pěstovány jako zahradní ozdoba v mnoha tropických a subtropických státech, včetně států mimo její přirozený výskyt [93].

V Africe je často tato bylina využívána v tradiční medicíně k léčbě malárie, angíny, gastroenteritidy, dále k ošetření tropických onemocnění kůže nebo onemocnění ledvin. Zároveň působí proti bolesti hlavy nebo proti horečce [41, 96, 97].



Obrázek 14.: Rozšíření *T. riparia* v jižní Africe [92]

## 2.9.2 Biologická aktivita migrénovníku (*T. riparia*)

Jak již bylo zmíněno, migrénovník obsahuje řadu aromaticky a biologicky aktivních sloučenin, díky kterým vykazuje významné antimikrobiální a antioxidační účinky. V následujících podkapitolách jsou přehledně shrnuty dosud provedené studie, věnující se této problematice.

### 2.9.2.1 Antimikrobiální aktivita extraktů migrénovníku

V roce 2014 Njau a kol. [98] provedli extrakci listů *T. riparia* macerací za pomoci rozpouštědel methanolu, ethanolu, hexanu a destilované vody. U těchto extraktů následně sledovali antimikrobiální účinky vůči bakteriím *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. Pro stanovení antimikrobiální aktivity využili agarovou diluční

metodu a mikrodiluční metodu ke zjištění minimální inhibiční koncentrace (MIC). U *E. coli* a *S. aureus* byla patrná antimikrobiální aktivita extraktů všech rozpouštědel. Proti *E. faecalis* byly účinné pouze extrakty methanolové a ethanolové. Nejnižší antimikrobiální aktivitu vykazoval proti všem použitým bakteriím hexanový extrakt *T. riparia*. Pomocí mikrodiluční metody, kde využili různých koncentrací extraktů (10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 a 0,156 mg·ml<sup>-1</sup>), stanovili MIC pro jednotlivé bakterie. Nejnižší koncentrace, která inhibovala růst *E. coli* a *S. aureus*, byla rovna 2,50 mg·ml<sup>-1</sup>, tato hodnota byla shodná pro extrakt *T. riparia* v rozpouštědlech ethanolu, methanolu a destilované vodě. *E. faecalis* byl inhibován methanolovým a ethanolovým extraktem při koncentraci 5,00 mg·ml<sup>-1</sup> [98].

Melo a kol. [99] provedli studii zaměřenou na zhodnocení antimikrobiální aktivity extraktu *T. riparia* vůči bakteriím ústní dutiny (*Streptococcus salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* a *Lactobacillus casei*), které bývají zejména zodpovědné za kazivost zubů. Pro stanovení antimikrobiální aktivity využili mikrodiluční metodu. Nejnižší koncentrace inhibující růst bakterie *S. mitis* byla rovna 31,25 µg·ml<sup>-1</sup>. Při koncentraci 125 µg·ml<sup>-1</sup> byl inhibován růst *S. sanguinis* a *S. salivarius*. *S. sobrinus*, *S. mutans* a *L. casei* byly inhibovány při koncentraci extraktu 62,5 µg·ml<sup>-1</sup>. Extrakt *T. riparia* se projevil jako účinný vůči všem použitým bakteriím [99].

Fernandez a kol. [100] sledovali antimikrobiální aktivitu frakcí extraktu byliny *Tetradenia riparia*. Pro získání extraktu použili bylinu ve formě prášku, který podrobili extrakci 70% ethanolem. Po filtraci nechali rozpouštědlo odpařit na vakuové rotační odparce při 40 °C pro zkoncentrování extraktu. Získaný extrakt pomocí chromatografické kolony naplněné silikagelem rozdělili na 25 frakcí. Z těchto frakcí pomocí tenkovrstvé chromatografie vybrali 10, u kterých stanovovali antimikrobiální a antioxidantní aktivitu. Antimikrobiální aktivita frakcí byla sledována vůči bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a *Aeromonas hydrophila*. Bakterie byly kultivovány na Trypton-sójovém agaru při teplotě 37 °C po dobu 24 hod. Ke stanovení antimikrobiální aktivity byla použita metoda mikrodiluční a vyhodnocena pomocí MIC. Antimikrobiální aktivita byla sledována v rozmezí koncentrací 0,49 až 500 µg·ml<sup>-1</sup>. Hodnota MIC byla stanovena po 18 hodinách inkubace při cca 35 °C. Extrakt vykazoval antimikrobiální aktivitu zejména vůči *S. aureus*, *E. faecalis* a *B. cereus*. Proti zbylým bakteriím byla MIC hodnota vyšší než 500 µg·ml<sup>-1</sup> [100].

Kakande a kol. [101] provedli studii v roce 2019 zaměřenou na dermatofyty (plísně způsobující onemocnění kůže, nehtů a vlasů), kde sledovali antimikrobiální účinky ethanolového extraktu *T. riparia* vůči *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophyte* a *Microsporum audouinii*. Ke stanovení využili difúzní jamkovou metodu a diluční metodu. Extrakt *T. riparia* vykazoval pozitivní inhibiční účinek vůči všem třem dermatofytům. Studie potvrdila účinnost extraktů této byliny vůči těmto druhům plísní [101].

Přehled mikroorganismů testovaných vůči extraktům a esenciálním olejům migrenovníku je uveden v Tabulce 3.

Tabulka 3.: Přehled mikroorganismů testovaných při studiích antimikrobiální aktivity extraktů  
*T. riparia* [96-105]

Název mikroorganismu	Typ mikroorganismu	Citlivost vůči antimikrobiálním látkám	Zdroj
<i>Bacillus cereus</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[97, 100, 102, 104, 105]
<i>Bacillus pumilus</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[97]
<i>Bacillus subtilis</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[96, 103]
<i>Candida albicans</i>	kvasinka	Růst inhibován	[96, 103]
<i>Candida parapsilosis</i>	kvasinka	Růst inhibován	[96]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	G– bakterie	Růst inhibován	[105]
<i>Enterobacter cloacae</i>	G– bakterie	Růst inhibován	[97, 103]
<i>Enterococcus faecalis</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[97, 98, 100, 103, 104]
<i>Escherichia coli</i>	G– bakterie	Růst inhibován	[96, 98, 100, 102, 103]
<i>Klebsiella pneumonia</i>	G– bakterie	Růst inhibován	[97, 103]
<i>Lactobacillus casei</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[99]
<i>Micrococcus kristinae</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[97]
<i>Micrococcus luteus</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[97]
<i>Microsporium audouinii</i>	plíseň	Růst inhibován	[101]
<i>Microsporium canis</i>	plíseň	Růst inhibován	[105]
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[105]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[104]
<i>Proteus vulgaris</i>	G– bakterie	Růst inhibován	[97, 102]
<i>Salmonella enterica</i>	G– bakterie	Růst inhibován	[103]
<i>Salmonella typhi</i>	G– bakterie	Růst inhibován	[102, 105]
<i>Serratia liquefaciens</i>	G– bakterie	Růst inhibován	[102, 105]
<i>Serratia marcescens</i>	G– bakterie	Růst inhibován	[97, 102]
<i>Shigella flexneri</i>	G– bakterie	Růst inhibován	[97]
<i>Staphylococcus aureus</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[96, 98, 100, 103, 104]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[102]
<i>Streptococcus mitis</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[99]
<i>Streptococcus mutans</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[99]
<i>Streptococcus salivarius</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[99]
<i>Streptococcus sanguinis</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[99]
<i>Streptococcus sobrinus</i>	G+ bakterie	Růst inhibován	[99]

G+ grampozitivní, G– gramnegativní



Tabulka 3 pokr.: Přehled mikroorganismů testovaných při studiích antimikrobiální aktivity extraktů *T. riparia* [96-105]

Název mikroorganismu	Typ mikroorganismu	Citlivost vůči antimikrobiálním látkám	Zdroj
<i>Trichophyton mentagrophyte</i>	plíseň	Růst inhibován	[101]
<i>Trichophyton tonsurans</i>	plíseň	Růst inhibován	[101]
<i>Aeromonas hydrophila</i>	G– bakterie	Růst neinhibován	[100]
<i>Candida tropicalis</i>	kvasinka	Růst neinhibován	[96]
<i>Proteus mirabilis</i>	G– bakterie	Růst neinhibován	[103]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G– bakterie	Růst neinhibován	[96, 97, 100, 103, 104]
<i>Salmonella typhimurium</i>	G– bakterie	Růst neinhibován	[100, 104]

G+ grampozitivní, G– gramnegativní

### 2.9.2.2 Antioxidační aktivita extraktů migrénovníku

Amoo a kol. [106] sledovali antioxidační aktivitu několika bylinných extraktů ze sušených i čerstvých rostlin, včetně *T. riparia* po dlouhodobém skladování. Ke stanovení celkových polyfenolů použili Folin-Ciocalteu metodu. Při stanovení využili kyselinu gallovou jako standard a vyjádřili obsah jako mg kyseliny gallové na gram vzorku. Obsah fenolických látek v sušené rostlině ( $6,1 \pm 0,2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a v čerstvé rostlině ( $7,2 \pm 0,38 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) nebyl signifikantně odlišný (na hladině významnosti  $P=0,05$ ). Jako další provedli stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH. Při stanovení použili jako negativní kontrolu methanol a jako pozitivní kontrolu kyselinu askorbovou a butylhydroxytoluen (BHT – Butylhydroxytoluene). Pokles absorbance měřili při 517 nm. Antioxidační aktivita v procentech u sušené rostliny ( $68,5 \pm 1,39 \%$ ) a u čerstvé rostliny ( $23,8 \pm 2,44 \%$ ) byla značně odlišná. Antioxidační aktivitu zároveň vyjádřili ve formě  $EC_{50}$ , tedy koncentrace extraktu potřebné k zhašení 50 % vytvořeného radikálu DPPH. Tento výpočet provedli pouze pro suchou rostlinu ( $41,0 \pm 5,29 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Nakonec vyjádřili antioxidační aktivitu ve formě AAI (Index antioxidační aktivity) u sušené rostliny ( $0,5 \pm 0,06$ ) [106].

Elaka a kol. [109] sledovali antioxidační aktivitu extraktu *T. riparia* metodou ABTS a DPPH testu. Extrakty získali filtrováním 10 g vzorku 150 ml směsí dichlormethanu a methanolu (1:1). Rozpouštědlo následně odpařili pod tlakem při 40 °C. Extrakty následně rozpustili v methanolu, který zároveň použili jako kontrolu. Obě použité metody vyhodnocovali spektrofotometricky při příslušných vlnových délkách. Vyhodnocení provedli stanovením  $IC_{50}$  (Inhibition Concentration), tedy koncentrace extraktu schopné inhibovat 50 % radikálu. Výsledky  $IC_{50}$  u ABTS vykazovaly slabší aktivitu ( $11,55 \pm 3,97 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) oproti DPPH ( $125,31 \pm 10,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) [109].

Fernandez a kol. [100] sledovali kromě antimikrobiální aktivity frakcí také aktivitu antioxidační včetně celkových polyfenolů. Celkové polyfenoly stanovovali za použití Folin-Ciocalteu metody, která byla popsána Singleton a Rossi [107] v roce 1965 a upravena

Viuda-Martos a kol. [108] v roce 2010. Vzorky rozpustili v methanolu na koncentraci  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Pro měření použili  $0,3 \text{ ml}$  methanolového roztoku smíchaného s  $2,5 \text{ ml}$  10% vodného roztoku Folin-Ciocalteau činidla a  $2 \text{ ml}$  7,5% uhličitanu sodného. Směs ponechali po dobu 15 minut ve vodní lázni o  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Absorbance byla měřena pomocí UV/VIS spektrometru při  $760 \text{ nm}$ . Koncentrace fenolů byla vztažena na koncentraci standardu, kterou byla kyselina gallová. Jako další byla provedena stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH testu. Vzorek *T. riparia* ( $100 \mu\text{l}$ ) smíchali s  $3,9 \text{ ml}$  methanolového roztoku DPPH ( $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Směs ponechali po dobu 30 minut ve tmě při pokojové teplotě. Klesající absorbanci měřili pomocí UV/VIS spektrometru při  $515 \text{ nm}$ . Ve čtvrté frakci vzorku byl vysoký obsah fenolických látek ( $181,97 \mu\text{g}_{\text{kys. gallové}}\cdot\text{mg}^{-1}$  vzorku) a aktivita DPPH ( $\text{IC}_{50} = 0,62 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Tuto skutečnost vysvětlili přítomností flavonoidů (Astragalin a Luteolin), které ve frakci identifikovali a které vykazují antioxidační aktivitu [100, 107, 108]

### 2.9.2.3 Aromatické látky v extraktech migrénovníku

Jedna z prvních studií, zaměřená na chemické složení *T. riparia*, byla provedena v roce 1996 Campbellem a kol. [41]. Ke stanovení využili esenciální olej z listů byliny a provedli analýzu pomocí GC a GC-MS, kdy získali 38 píků. Největší obsah vykazovaly monoterpeny (69 %), z nich pak  $\alpha$ -terpineol (22,6 %), fenchon (13,6 %),  $\beta$ -fenchylalkohol (10,7 %),  $\beta$ -karyofylen (7,9 %) a perillylalkohol (6,0 %). Kromě těchto nejvíce zastoupených obsahoval esenciální olej *T. riparia* také látky jako např. linalool, kafr, borneol, terpinen-4-ol, geraniol,  $\beta$ -humulen a další, zejména diterpeny [41].

Ngule a kol. [102] provedli orientační analýzu extraktu *T. riparia*. V extraktu této rostliny identifikovali sloučeniny patřící mezi taniny, saponiny, flavonoidy, glykosidy, fenoly a alkaloidy [102].

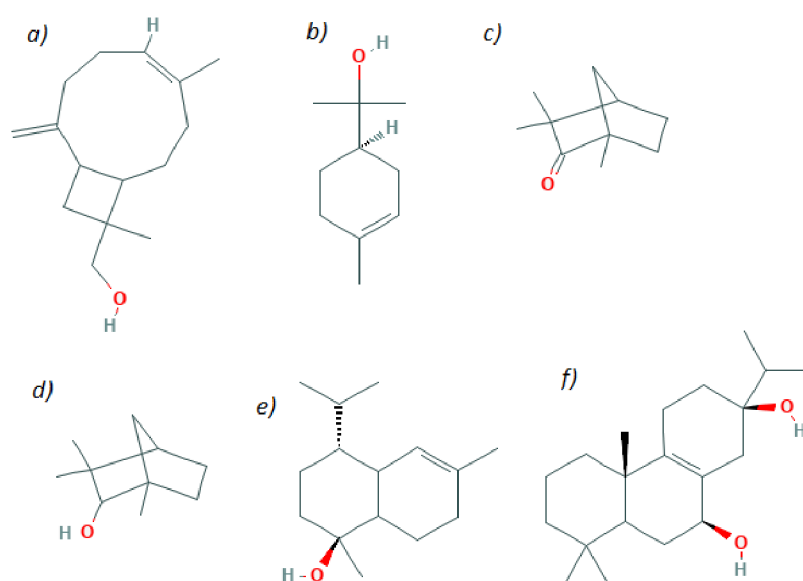
Fernandez a kol. [100] v roce 2017 identifikovali pomocí nukleární magnetická rezonance (NMR – Nuclear Magnetic Resonance) a GC-MS látky přítomné v extraktu *T. riparia*. Celkem identifikovali 7 sloučenin s biologickou aktivitou. Při  $m/z$  288 identifikovali abieta-7,9(11)-dien-13- $\beta$ -ol ( $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}$ ). Při  $m/z$  306 identifikovali ibozol ( $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_2$ ). Jako další byli identifikovány dva diterpenoidy ( $m/z$  304) a to 8(14),5-sandarakopimaradien-2 $\alpha$ -18-diol a 8(14),5-sandarakopimaradien-7 $\alpha$ -18-diol. Nakonec identifikovali směs tří látek. První z nich byl boronolid ( $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_8$ ,  $m/z$  370), luteolin ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ ,  $m/z$  286) a astragalin ( $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ ,  $m/z$  448) [100].

Ve studii z roku 2010 se Gazim a kol. [103] zaměřili na ovlivnění složení a aktivity extraktu *T. riparia* v závislosti na období odběru. Odběr byliny z Brazílie provedli na jaře, na podzim, v létě a v zimě a sledovali rozdílné složení a získali oleje z listů. Nejvíce oleje získali ze zimního sběru a nejméně na jaře. Pomocí metody GC-MS byli schopni identifikovat 36 složek, které z 95–99,6 % tvořily těkavé látky. Dominantní skupinou byly kyslíkaté seskviterpeny (45,18–64,33 %). Z této skupiny to byly zejména 14-hydroxy-9-epi-karyofylen, cis-muurolol-5-en-4- $\alpha$ -ol,  $\alpha$ -kadinol a ledol. Další větší skupinu tvořily kyslíkaté diterpeny (12,11–25,73 %), a z nich zejména kalykulon. Z kyslíkatých monoterpenu (5,37–19,52 %) byl nejvíce zastoupen fenchon. Při analýze zjistili, že z kyslíkatých seskviterpenů se nejvíce lišil v závislosti na období odběru 14-hydroxy-9-epi-karyofylen, který měl nejvyšší koncentraci v jarním odběru a

v zimním nebyl přítomen vůbec. Naproti tomu vyšší obsah ze zimního sběru vykazoval kyslíkatý diterpen kalykulon [103].

Studie Blythe a kol. [42] byla zaměřena na stanovení chemického složení esenciálního oleje z byliny *T. riparia*. Stejně jako v předešlých studiích i v této bylo výsledkem množství těkavých látek různého charakteru. Metodou GC-FID a GC-MS identifikovali celkem 48 látek, které tvořily 86,6 % celkového zastoupení. Jako hlavní komponenta byl identifikován fenchon (14,8 %),  $\delta$ -kadinen (10,6 %), 14-hydroxy-9-epi-karyofylen (7,9 %). Největší obsah zaujímaly seskviterpenoidy (56,9 %), dále seskviterpeny (29 %), kyslíkaté seskviterpeny (27,9 %), kyslíkaté monoterpeny (26,4 %) a monoterpeny (3,3 %) [42].

Vzorce některých z identifikovaných látek v extraktech *T. riparia* lze vidět na Obrázku 15. Přehled dosud identifikovaných těkavých látek migrénovníku lze vidět v Tabulce 4.



Obrázek 15.: Těkavé látky identifikované v extraktech *T. riparia*: a) 14-hydroxy-9-epi-caryophyllen, b)  $\alpha$ -terpineol, c) fenchon, d) fenchylalkohol, e)  $\alpha$ -cadinol, f) ibozol [41, 100, 102, 103, 110]



Tabulka 4.: Přehled těkavých látek dosud identifikovaných v bylině *T. riparia* [41, 42, 103]

Látka	Klasifikace	Obsah [%]	Zdroj
abietadien	diterpen	5,51–13,54	[103]
kalykulon	kyslíkatý diterpen	11,57–24,70	[103]
manoyl oxid	kyslíkatý diterpen	0,41–1,61	[103]
1,8-cineol (eukalyptol)	kyslíkatý monoterpen	0,10–1,30	[41, 42]
borneol	kyslíkatý monoterpen	0,73–3,50	[41, 42, 103]
fenchon	kyslíkatý monoterpen	2,40–14,80	[41, 42, 103]
fenchyl alkohol (fenchol)	kyslíkatý monoterpen	0,77–10,70	[41, 42, 103]
geranial	kyslíkatý monoterpen	0,60	[41]
geraniol	kyslíkatý monoterpen	4,20	[41]
kafr	kyslíkatý monoterpen	0,90–3,90	[41, 42, 103]
linalool	kyslíkatý monoterpen	1,10	[41]
terpinen-4-ol	kyslíkatý monoterpen	1,00–1,40	[41, 42]
tymol	kyslíkatý monoterpen	1,40	[42]
$\alpha$ -terpineol	kyslíkatý monoterpen	0,60–1,43	[41, 42, 103]
1,10- <i>diepi</i> -kubenol	kyslíkatý seskviterpen	1,80	[42]
14-hydroxy- $\beta$ -karyofylen	kyslíkatý seskviterpen	7,90–24,36	[41, 42, 103]
1- <i>epi</i> -kubenol	kyslíkatý seskviterpen	0,40	[42]
<i>epi</i> -kubebol	kyslíkatý seskviterpen	0,40	[42]
globulol	kyslíkatý seskviterpen	0,90–3,97	[42, 103]
guaiol	kyslíkatý seskviterpen	1,24–3,50	[41, 103]
karyofylen oxid	kyslíkatý seskviterpen	0,60	[42]
kubebol	kyslíkatý seskviterpen	0,30	[42]
ledol	kyslíkatý seskviterpen	1,2–8,74	[41, 42, 103]
spatulenol	kyslíkatý seskviterpen	0,10–1,20	[42, 103]
<i>tau</i> -kadinol	kyslíkatý seskviterpen	6,90	[42]
<i>tau</i> -muurolol	kyslíkatý seskviterpen	1,40	[42]
viridiflorol	kyslíkatý seskviterpen	0,50–4,20	[42, 103]
$\alpha$ -eudesmol	kyslíkatý seskviterpen	0,70	[42]
$\alpha$ -kadinol	kyslíkatý seskviterpen	3,10–8,33	[42, 103]
$\delta$ -kadinol ( $\alpha$ -muurolol)	kyslíkatý seskviterpen	0,60	[42]
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimen	monoterpen	0,20	[42]
kamfen	monoterpen	0,70	[42]
limonen	monoterpen	0,40–3,69	[42, 103]
<i>p</i> -cymen	monoterpen	0,10	[42]
sabinen	monoterpen	0,40	[42]
terpinolen	monoterpen	0,10	[42]
$\alpha$ -pinen	monoterpen	0,70	[42]
$\beta$ -pinen	monoterpen	0,50	[42]
$\gamma$ -terpinen	monoterpen	0,20	[42]
<i>trans</i> - $\beta$ -farnesen	seskviterpen	0,10	[42]

Tabulka 4 pokr.: Přehled těkavých látek dosud identifikovaných v bylině *T. riparia* [41, 42, 103]

Látka	Klasifikace	Obsah [%]	Zdroj
<i>allo</i> -aromadendren	seskviterpen	0,28–0,90	[103]
bicyklogermakren	seskviterpen	0,46–3,40	[42, 103]
bicykloseskvifelandren	seskviterpen	0,40	[42]
kadina-1,4-dien (kubenen)	seskviterpen	0,30	[42]
kalamenen	seskviterpen	0,30	[42]
<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoten	seskviterpen	1,08–4,78	[103]
<i>trans</i> - $\beta$ -bergamoten	seskviterpen	1,40	[42]
$\alpha$ -gurjunen	seskviterpen	0,25–1,40	[42, 103]
$\alpha$ -kadinen	seskviterpen	0,70	[42]
$\alpha$ -kopaen	seskviterpen	0,53–0,90	[42, 103]
$\alpha$ -muurolen	seskviterpen	1,80	[42]
$\beta$ -elemen	seskviterpen	0,20–0,40	[42, 103]
$\beta$ -karyofylen	seskviterpen	0,34–7,90	[41, 42, 103]
$\gamma$ -amorfen	seskviterpen	0,30	[42]
$\gamma$ -kadinen	seskviterpen	0,18–2,90	[42, 103]
$\gamma$ -muurolen	seskviterpen	0,90	[42]
$\delta$ -elemen	seskviterpen	0,12–0,15	[103]
$\delta$ -kadinen	seskviterpen	0,32–10,6	[42, 103]

## 2.10 Charakteristika použitých mikroorganismů

Ke stanovení antimikrobiální aktivity extraktů migrénovníku získaných v experimentální části této práce budou využity tři zástupci mikroorganismů. Z bakterií byl vybrán *Bacillus cereus* (grampozitivní) a *Escherichia coli* (gramnegativní), a zástupce kvasinek *Candida glabrata*.

### 2.10.1 *Bacillus cereus*

*B. cereus* patří mezi grampozitivní sporulující tyčinky. Spory této bakterie mívají oválný až cylindrický tvar a jsou schopny odolávat běžným pasteračním teplotám. V potravinách s vyšším obsahem tuku, který jim poslouží jako tepelná ochrana, jsou spory schopny tolerovat i vyšší teploty [112].

*B. cereus* tvoří poměrně velké buňky. Při růstu na polysacharidovém substrátu produkuje toxiny, které mohou způsobovat otravy [111]. Zvracení vyvolává bakterie nejčastěji po konzumaci škrobnatých potravin, kde již došlo ke tvorbě toxinů a po konzumaci dochází k intoxikaci. Průjmové onemocnění se vyskytuje po konzumaci mléka, salátů nebo masa. V těchto případech dojde ke zkonsumování velkého množství namnožených buněk této bakterie. U zdravých jedinců je zotavení poměrně rychlé, během jednoho až dvou dní. Problém nastává u lidí se zdravotními problémy, u kterých se mohou po konzumaci projevit vážné komplikace [112, 113].

*B. cereus* produkuje  $\beta$ -laktamasy a z tohoto důvodu je odolný vůči  $\beta$ -laktamovým antimikrobiálním látkám, jako jsou např. cefalosporiny. Aminoglykosidy, vankomycin nebo chloramfenikol jsou však proti této bakterii účinné [112].

### 2.10.2 *Escherichia coli*

Jedná se o gramnegativní fakultativně anaerobní nesporulující bakterii tvořící tyčinky. Patří do čeledi *Enterobacteriaceae*, do které kromě nepatogenů a podmíněných patogenů patří také nebezpečné střevní patogeny, jako např. *Salmonella* nebo *Shigella*. Bakterie rodu *Escherichia* se nejčastěji vyskytují v trávicím traktu nejrůznějších živočichů. Konkrétně *E. coli* se nachází v spodní části střevního traktu člověka a teplokrevných zvířat [111].

*E. coli* patří mezi jeden z nejvíce prozkoumaných mikroorganismů. V genetickém nebo biochemickém odvětví slouží jako modelový organismus. Tato bakterie má schopnost zkvašovat cukry jako je glukosa nebo laktosa a tvořit z nich nejrůznější produkty. Při zkvašování dochází k výrazné tvorbě kyselin a plynu. V mikrobiologických rozbořech slouží jako ukazatel fekálního znečištění [111].

### 2.10.3 *Candida glabrata*

Kvasinka *C. glabrata* tvoří haploidní buňky a rozmnožuje se klonováním. Patří do čeledi *Saccharomycetaceae* a evolučně je blíže kvasince *Saccharomyces cerevisiae* nežli ostatním z rodu *Candida*. Na rozdíl od ostatních druhů rodu *Candida* netvoří *C. glabrata* pseudohýfy při teplotách nad 37 °C. Dále také není schopná tvořit proteázy, ale je schopná fermentovat glukosu nebo trehalosu. Na dextrózovém agaru tvoří lesklé, hladké, krémově zbarvené kolonie. Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 1–4  $\mu\text{m}$  [114-116].

*C. glabrata* můžeme nejčastěji najít v lidském těle v dutině ústní, jícnu, střevech nebo na poševní sliznici. Produkuje fosfolipázy, které mohou způsobovat narušení sliznice v těle hostitele. Zároveň může způsobovat infekce krevního řečiště, zejména u starších osob, diabetiků a pacientů s orgánovou transplantací [114-116].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité chemikálie

- Ethanol 96% p.a. (Penta s.r.o., ČR)
- Kyselina gallová (Sigma-Aldrich, USA)
- Uhličitan sodný p.a. bezvodý (Centralchem s.r.o., SK)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (VWR Chemicals, ČR)
- ABTS (Sigma-Aldrich, USA)
- Peroxodisíran draselný p.a. (Lach-Ner s.r.o., ČR)
- Trolox (Sigma-Aldrich, USA)
- Masopeptonový agar (Nutrient Agar No. 2, HiMedia Laboratories, ČR)
- Sladinový agar (Malt Extract Agar Base, HiMedia Laboratories, ČR)
- Masopeptonový bujón (HiMedia Laboratories, ČR)
- Sladinový bujón (HiMedia Laboratories, ČR)

#### 3.2 Použité přístroje

- Spektrofotometr (Helios Gamma and Delta Spectronic Unicam, USA)
- Analytické digitální váhy (GR-202-EC, HELAGO, Itálie)
- Vortex (Heidolph, Reax top)
- Sušárna (Memmert, Německo)
- SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30  $\mu\text{m}$  (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA)
- Plynový chromatograf Trace<sup>TM</sup> 1310 se split/splitless injektorem (Thermo Fisher Scientific INC., Waltham, MA, USA)
- Hmotnostní detektor ISQ<sup>TM</sup> LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific INC., Waltham, MA, USA)
- Předvážky (AND, EK-1200i, USA)
- Autokláv (Vaposteri, BMT, ČR)
- Inkubátor (IP-100, Biotech, ČR)
- Inkubátor (Binder BD 115, Německo)
- Běžné laboratorní sklo a další vybavení

#### 3.3 Analyzované extrakty

V experimentální části diplomové práce byly připraveny a analyzovány vzorky extraktů rostliny migrénovníku (*Tetradenia* spp.).

Na přípravu extraktů byly použity čerstvé listy a drobné stonky této rostlinky (Obrázek 16.). Ty byly nožem nakrájeny na drobné částice do velikosti cca 5 mm.

Získání extraktů bylo provedeno macerací při různých extrakčních podmínkách. Nejprve byla provedena optimalizace macerace, kde byly sledovány nejvýhodnější zadané podmínky a jejich vliv na zisk biologicky aktivních látek. Extrakční účinnost byla v této fázi posuzována sledováním přítomných těkavých látek a stanovením obsahu celkových fenolických látek.

Po provedení optimalizace s cílem získat co nejvíce aktivních látek z rostliny, byl za optimálních podmínek připraven extrakt, u kterého byly stanoveny těkavé látky, celkové fenolické látky, antioxidační a antimikrobiální aktivita.



*Obrázek 16.: Analyzovaný migrénovník*

### **3.4 Metody stanovení vybraných ukazatelů kvality/aktivity extraktů migrénovníku**

#### **3.4.1 Stanovení aromaticky aktivních látek**

Stanovení aromaticky aktivních látek bylo provedeno ve všech připravených extraktech migrénovníku. Ke stanovení byla použita metoda headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (HS-SPME-GC-MS).

Do vialky byly napipetovány 2 ml připraveného extraktu a vialka byla uzavřena kovovým uzávěrem opatřeným vzduchotěsným kaučuk-teflonovým septem a umístěna do autosampleru GC-MS. V programu Xcalibur byla nastavena analýza o parametrech, které jsou uvedeny v Tabulce 5. Vyhodnocení chromatogramů bylo provedeno porovnáním retenčních časů a hmotnostních spekter s interní a externí knihovnou. Obsah identifikovaných sloučenin je vyjádřen semikvantitativně pomocí ploch příslušných píků na chromatogramu, nebo jako relativní obsah (v %).

Tabulka 5.: Podmínky analýzy HS-SPME-GC-MS

<b>Podmínky SPME extrakce</b>	
Doba inkubace (temperování)	10 minut
Teplota extrakce a inkubace (teplota agitátoru)	40 °C
Doba extrakce	20 minut
Agitátor zapnutý	5 sekund
Agitátor vypnutý	60 sekund
<b>Podmínky GC-MS analýzy</b>	
Kapilární kolona	TG-WaxMS
Rozměry kolony	30 m x 0,25 mm x 0,5 µm
Teplota injektoru (desorpce)	240 °C
Doba desorpce	20 minut
<b>Dávkování splitless, ventil uzavřený 10 minut</b>	
Nosný plyn	hélium
Průtok nosného plynu	1 ml·min <sup>-1</sup>
Teplotní program	40 °C s výdrží 1 min, vzestupný gradient 5 °C·min <sup>-1</sup> do 220 °C s výdrží 12 min
Celková doba analýzy	55 minut
<b>Hmotnostní detektor v módu elektronové ionizace</b>	
Energie ionizačních elektronů	70 eV
Teplota iontového zdroje	200 °C
Skenovací rozsah <i>m/z</i>	30-370 amu
Rychlost skenování	0,2 s

### 3.4.2 Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení celkového obsahu polyfenolických sloučenin bylo provedeno spektrofotometricky metodou F-C (kapitola 2.5.3). Pro zjištění koncentrace TPC byla připravena kalibrační řada standardu kyseliny gallové. Výsledné koncentrace TPC v extraktech byly vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE – Gallic Acid Equivalent).

#### 3.4.2.1 Příprava kalibrační křivky a roztoků

Pro přípravu kalibrační řady byl připraven roztok kyseliny gallové o koncentraci 1 g·l<sup>-1</sup>. Tento roztok byl následně naředěn na koncentrace 10; 20; 50; 100; 250 a 500 mg·l<sup>-1</sup>.

Pro stanovení byl připraven nasycený roztok uhličitanu sodného a zředěný roztok F-C činidla v poměru 1:9.

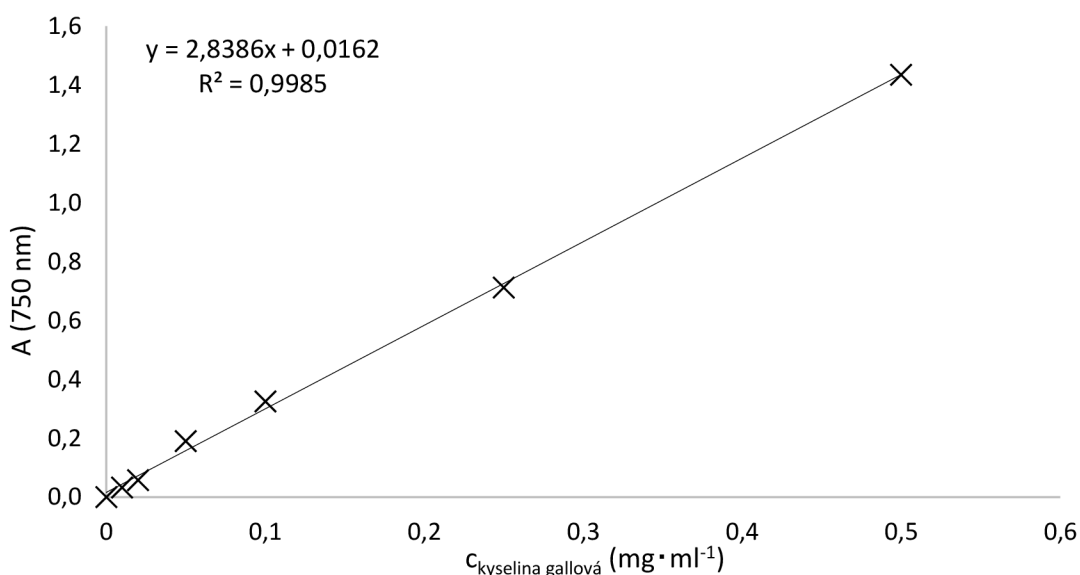
#### 3.4.2.2 Postup stanovení

Do zkumavek byl postupně napipetován 1 ml destilované vody, 1 ml zředěného F-C činidla a 100 µl extraktu (v případě slepého vzorku destilovaná voda). Směs byla dobře promíchána pomocí vortexu a ponechána stát po dobu 5 minut. Po 5 minutách byl do zkumavek přidán 1 ml roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a obsah byl opět promíchán. Vzorky byly ponechány po dobu 45 minut

v temnotě a poté ještě jednou promíchány. Následně byla změřena absorbance při 750 nm pomocí UV-VIS spektrofotometru.

### 3.4.2.3 Vyhodnocení výsledků

Pro výpočet koncentrace TPC v extraktech byla použita sestavená kalibrační křivka kyseliny gallové o koncentraci 10 až 500 mg·l<sup>-1</sup> (viz Obrázek 17.). Koncentrace TPC byla vyjádřena v mg ekvivalentu kyseliny gallové na gram rostliny (mg<sub>GAE</sub>·g<sup>-1</sup>).



Obrázek 17.: Graf kalibrační křivky – závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové

### 3.4.3 Stanovení antioxidační aktivity

Stanovení antioxidační aktivity bylo provedeno metodou TEAC (kapitola 2.5.1), kde se sleduje potenciál látek zhaset radikál ABTS<sup>•+</sup>. Pro výpočet obsahu biologicky aktivních látek s antioxidačním potenciálem byla použita kalibrační řada standardu Troloxu a výsledná koncentrace byla vztažena na ekvivalentní množství Troloxu a vyjádřena v μg<sub>TEAC</sub>·ml<sup>-1</sup>. Kromě koncentrace byla vypočtena také procentuální hodnota zhasení radikálu.

#### 3.4.3.1 Příprava kalibrační křivky a roztoků

Pro přípravu kalibrační řady byl nachystán zásobní roztok Troloxu o koncentraci 1 g·l<sup>-1</sup>. Tento roztok byl následně naředěn na koncentrace 0; 50; 100; 150; 200; 250; 300; 350 a 400 μg·ml<sup>-1</sup>.

Pro stanovení byl připraven ABTS<sup>•+</sup> smícháním 7 mmol·l<sup>-1</sup> ABTS s 2,45 mmol·l<sup>-1</sup> peroxidisíranem draselným. Takto připravený roztok byl ponechán ve tmě a chladu po dobu nejméně 12 hodin. Před měřením byl ABTS<sup>•+</sup> naředěn 60% ethanolom na absorbanci 0,7 ± 0,02 při 734 nm (měřeno oproti ethanolu) a na další měření byl použit již pouze tento roztok.

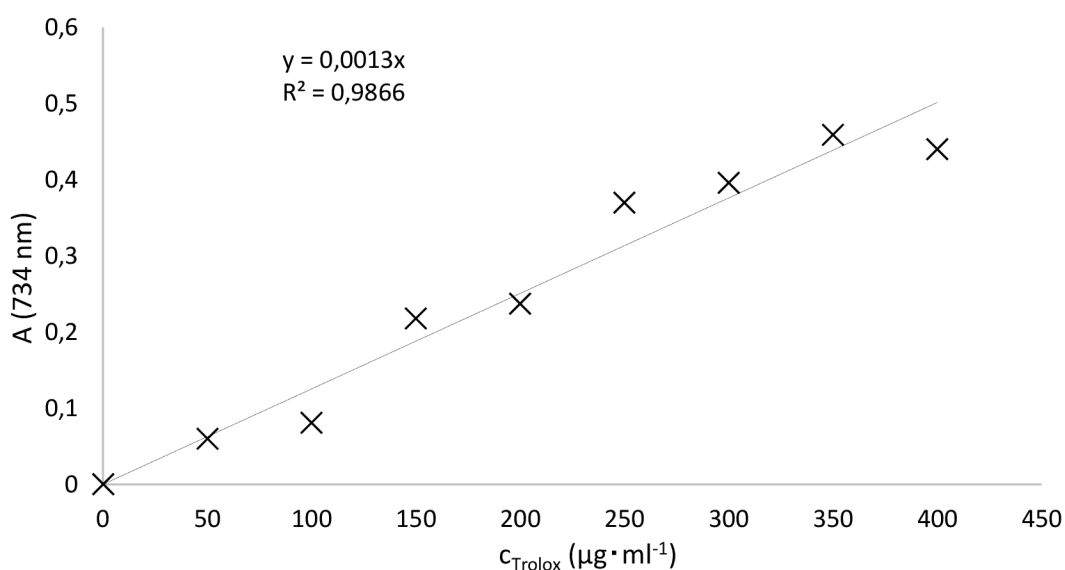
#### 3.4.3.2 Postup stanovení

Do kyvety bylo napipetováno 10 μl destilované vody a 1 ml zředěného ABTS<sup>•+</sup> a ihned byla změřena absorbance v čase 0 (A<sub>t</sub> = 0) při 734 nm. Následně bylo do zkumavky napipetováno

10  $\mu\text{l}$  extraktu (Troloxu) a 1 ml ABTS<sup>+</sup>. Obsah byl promíchán a ponechán ve tmě po dobu 10 minut. Po 10 minutách ( $A_t = 10$ ) byla změřena absorbance.

### 3.4.3.3 Vyhodnocení výsledků

Výsledná absorbance byla vypočtena pomocí rovnice (1). Dále bylo vypočteno také procento zhášení radikálu pomocí rovnice (2). Pro výpočet koncentrace biologicky aktivních látek v extraktech byla použita sestrojená kalibrační křivka Troloxu o koncentraci 50 až 400  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (viz Obrázek 18.). Koncentrace byla vztažena na ekvivalentní množství Troloxu a vyjádřena v  $\mu\text{g}_{\text{TEAC}}\cdot\text{ml}^{-1}$ .



Obrázek 18.: Graf kalibrační křivky – závislost absorbance na koncentraci Troloxu

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

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

### 3.4.4 Ověření antimikrobiální aktivity

Pro stanovení antimikrobiální aktivity optimalizovaného extraktu migrénovníku byla použita jamková difúzní metoda, jejíž princip je uveden v kapitole 2.4.1.2.

#### 3.4.4.1 Použité mikroorganismy

Pro testování byly vybrány 3 různé organismy. Z bakterií jako zástupce grampozitivních *Bacillus cereus* a zástupce gramnegativních *Escherichia coli*. Dále jako zástupce kvasinek *Candida glabrata*. Charakteristika použitých mikroorganismů je popsána v kapitole 2.10.

Před vlastním ověřením antimikrobiální aktivity bylo nutné testované mikroorganismy nakultivovat na šikmých agaroch příslušných živných medií (viz Tabulka 7.).



### 3.4.4.2 Příprava a zaočkování bujónů

Na zaočkování *B. cereus* a *E. coli* byl použit masopeptonový bujón. Bujón byl připraven dle návodu navážením 25 g přípravku a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody. Pro zaočkování kvasinky *C. glabrata* byl použit sladinový bujón navážením 19,2 g přípravku na 1000 ml destilované vody. Oba bujóny byly následně vysterilizovány při teplotě 121 °C po dobu 20 minut a rozpipetovány po 5 ml do zkumavek. Pouze pro *E. coli* byl odpipetován bujón o objemu 50 ml. Složení obou médií viz Tabulka 6.

*B. cereus* a *C. glabrata* byli přeočkováni z šikmého agaru do zkumavek s připraveným bujónem. 50 ml bujónu bylo *E. coli* zaočkováno pomocí oživení kultury z želatinového disku. Vyžíhanou kličkou byl z lahvičky přenesen želatinový disk do bujónu.

Bujóny byly inkubovány při 25 °C (*B. cereus*, *C. glabrata*) a 37 °C (*E. coli*) po dobu 24 hod.

Tabulka 6.: Složení tekuté živné pudy (bujónu) pro bakterie a kvasinku

Bakterie		Kvasinka	
Složka	Obsah (g·l <sup>-1</sup> )	Složka	Obsah (g·l <sup>-1</sup> )
Masový pepton	10,0	Sladinový extrakt	13,0
Hovězí extrakt	10,0	Želatinový pepton	5,5
Chlorid sodný	5,0	Kvasinkový extrakt	0,5

### 3.4.4.3 Příprava kultivačního média

Na přípravu kultivačního média pro bakterie byl použit masopeptonový agar (Nutrient Agar No. 2, HIMEDIA). Živné médium bylo připraveno dle návodu navážením 40 g do 1000 ml destilované vody. Médium bylo vysterilizováno při 121 °C po dobu 20 minut. Vysterilizované médium mělo pH 7,2 ± 0,2 při 25 °C.

Pro kvasinku byl použit sladinový agar (Malt Extract Agar Base, HIMEDIA). Živné médium bylo připraveno dle návodu navážením 50 g do 1000 ml destilované vody. Médium bylo vysterilizováno při 121 °C po dobu 20 minut. Vysterilizované médium mělo pH 5,4 ± 0,2 při 25 °C. Složení médií viz Tabulka 7.

Tabulka 7.: Složení kultivačního média pro bakterie a kvasinku

Bakterie		Kvasinka	
Složka	Obsah (g·l <sup>-1</sup> )	Složka	Obsah (g·l <sup>-1</sup> )
Masový pepton	10,0	Sladový extrakt	30,0
Hovězí extrakt	10,0	Mykologický pepton	5,0
Chlorid sodný	5,0	Agar	15,0
Agar	15,0		

### 3.4.4.4 Postup stanovení

Do 150 ml vysterilizovaného zchlazeného kultivačního média bylo napipetováno 1,5 ml bujónu obsahujícího 24hodinovou kulturu daného mikroorganismu. Naočkované živné médium (inokulum) bylo rozlito do Petriho misek a ponecháno k zatuhnutí. V případě anaerobní *E. coli* byl zatuhnutý agar ještě přelit čistým živným médiem a opět ponechán k zatuhnutí. Po zatuhnutí byly do agaru pomocí korkovrtu udělány 4 jamky o průměru 1 cm. Do 3 jamek byl pipetován

připravený extrakt a do kontrolní jamky bylo napipetováno rozpouštědlo použité pro přípravu extraktu (40% ethanol). Misky byly kultivovány při 25 °C (*B. cereus*, *C. glabrata*) a při 37 °C (*E. coli*) po dobu 72 hodin.

#### **3.4.4.5 Vyhodnocení výsledků**

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno měřením vzniklých inhibičních zón v okolí jamek. Byly změřeny průměry inhibičních zón s přesností na milimetry.

### **3.5 Statistické vyhodnocení výsledků**

Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny pomocí programů MS Excel 2016 a Statistica 13. Jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD), přičemž měření byla opakována dvakrát ( $n = 2$ ).

Pro zjištění rozdílů mezi vzorky byla použita parametrická jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA – Analysis of Variance) s využitím Tukeyho HSD-testu a neparametrická analýza rozptylu s využitím Kruskal-Wallisova testu. Pro zhodnocení vztahu mezi obsahem polyfenolů a naměřenou antioxidační aktivitou byla provedena korelační analýza s využitím neparametrického Spearmanova korelačního koeficientu.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

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

Podstatou práce byla optimalizace podmínek extrakce migrénovníku (*Tetradenia* spp.) s cílem získání maximálního množství biologicky aktivních látek. Na základě studia literatury a provedených předběžných experimentů byla jako extrakční metoda zvolena jednoduchá macerace. Jednotlivé extrakty byly vždy analyzovány z pohledu obsahu fenolických látek a aromaticky aktivních sloučenin. Z výsledků koncentrací TPC a zastoupení AAL a s přihlédnutím k dalším faktorům, např. environmentálním, ekonomickým aj., byly vybrány podmínky pro získání „optimálního“ extraktu. Pro posouzení kvality a účinnosti takto získaného extraktu u něj byly sledovány celkové polyfenoly pomocí F-C metody, antioxidační aktivita metodou TEAC. Jamkovou difúzní metodou byla stanovena antimikrobiální aktivita, a nakonec byly metodou HS-SPME-GC-MS stanoveny AAL.

### 4.1 Optimalizace macerace

Jak již bylo zmíněno, cílem optimalizace macerace byl získání co největšího množství biologicky aktivních sloučenin, což bylo posouzeno sledováním změn obsahu celkových fenolických látek a těkavých látek. Pro provedení optimalizace bylo nejprve třeba si zvolit faktory, které budou dostatečně ovlivňovat proces macerace. Na základě studia literatury a provedených předběžných experimentů byly vybrány 4 faktory, a to teplota a doba macerace, koncentrace rozpouštědla a poměr navážka ku rozpouštědlu.

Pro optimalizaci byla použita jednoduchá standardní metoda, jejíž princip spočívá v tom, že se mění vždy jeden parametr (faktor) a ostatní parametry zůstávají během experimentu konstantní. U každého z faktorů byly sledovány 3 odlišné zadané hodnoty.

Pro každý bod z jednotlivých faktorů byly provedeny vždy 2 paralelní macerace a byl stanoven celkový obsah fenolických a těkavých látek.

Výsledné hodnoty celkových polyfenolů a obsahů (ploch píků) těkavých látek byly zpracovány pomocí boxových a skládaných grafů a testovány pomocí analýzy rozptylu. Hypotéza  $H_0$  předpokládá, že mezi jednotlivými body faktorů není statisticky významný rozdíl. Opačně u hypotézy  $H_1$  je předpoklad, že mezi body existuje statisticky významný rozdíl. V případě nastaveného intervalu spolehlivosti 95 % platí  $H_1$  v případě že  $p < 0,05$  a  $F > F_{krit.}$  [117]. Pro zjištění statistického rozdílu mezi jednotlivými body faktorů byl proveden Tuckeyho (pro rovnoměrně distribuovaná, homogenní data) a Kruskal-Wallisův test (pro nerovnoměrně distribuovaná a nehomogenní data).

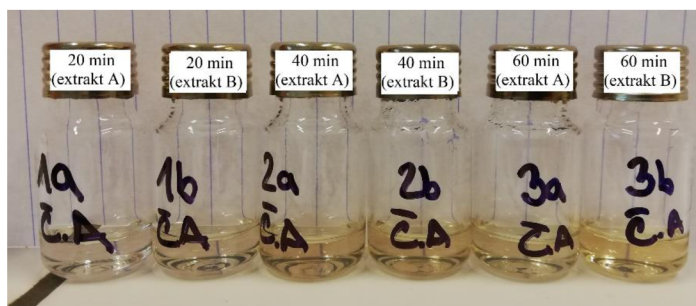
Podmínky experimentu dle jednotlivých faktorů lze vidět v Tabulce 8.

Tabulka 8.: Podmínky optimalizace macerace

Macerace	Doba macerace (min)	Koncentrace rozpouštědla (%)	Navážka/ rozpouštědlo	Teplota (°C)
1	20	40	1:10	20
2	40	40	1:10	20
3	60	40	1:10	20
4	60	0	1:10	20
5	60	40	1:10	20
6	60	80	1:10	20
7	60	40	1:10	20
8	60	40	1:5	20
9	60	40	1:3,33	20
10	60	40	1:10	20
11	60	40	1:10	40
12	60	40	1:10	60

#### 4.1.1 Vliv doby macerace na celkový obsah fenolických a těkavých látek

Při optimalizaci doby macerace byly rostliny macerovány po dobu 20, 40 a 60 minut. Ostatní faktory (koncentrace rozpouštědla, navážka/rozpouštědlo a teplota) byly nastaveny na hodnoty viz Tabulka 8. (40% ethanol, 1:10, 20 °C). Na Obrázku 19. lze vidět takto získané extrakty.



Obrázek 19.: Extrakty migrenovníku získané macerací, vliv doby macerace na sledované parametry

V Tabulce 9. jsou uvedeny naměřené hodnoty obsahu TPC (zprůměrované,  $n = 9$ ) pro obě opakování (extrakt A a B). Na Obrázku 20. jsou tyto výsledky pro lepší přehlednost vyjádřeny graficky. Nejnižší průměrná naměřená koncentrace celkových fenolů byla při 60 min  $0,42 \pm 0,04 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ , nejvyšší při 40 min  $0,91 \pm 0,01 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Za použití statistické metody analýzy rozptylu, která sleduje rozdíly mezi skupinami, byl zjištěn statisticky významný rozdíl (hypotéza  $H_1$ ,  $p < 0,05$ ,  $F(68,95) > F_{\text{krit}}(3,68)$ ) mezi naměřenými hodnotami všech 3 bodů (20, 40, 60 min). Z těchto výsledků lze odvodit, že doba macerace má signifikantní vliv na zisk celkových polyfenolů.

Jako další byl při optimalizaci sledován vliv doby macerace na obsah těkavých látek. Na Obrázku 21. lze vidět závislost obsahu těkavých látek (vlevo) a počtu identifikovaných sloučenin (vpravo) na době macerace. U všech tří použitých časů zaujímala největší obsah skupina terpenů. Obsahově bylo největší množství látek získáno při 40 minutách. Počet identifikovaných terpenů byl při 40 a 60 minutách stejný (19 sloučenin), avšak při 40 min bylo identifikováno celkově více sloučenin. Kruskal-Wallisovým testem nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (hypotéza  $H_0$ ,  $p > 0,05$ ) v obsahu získaných těkavých látek při jednotlivých

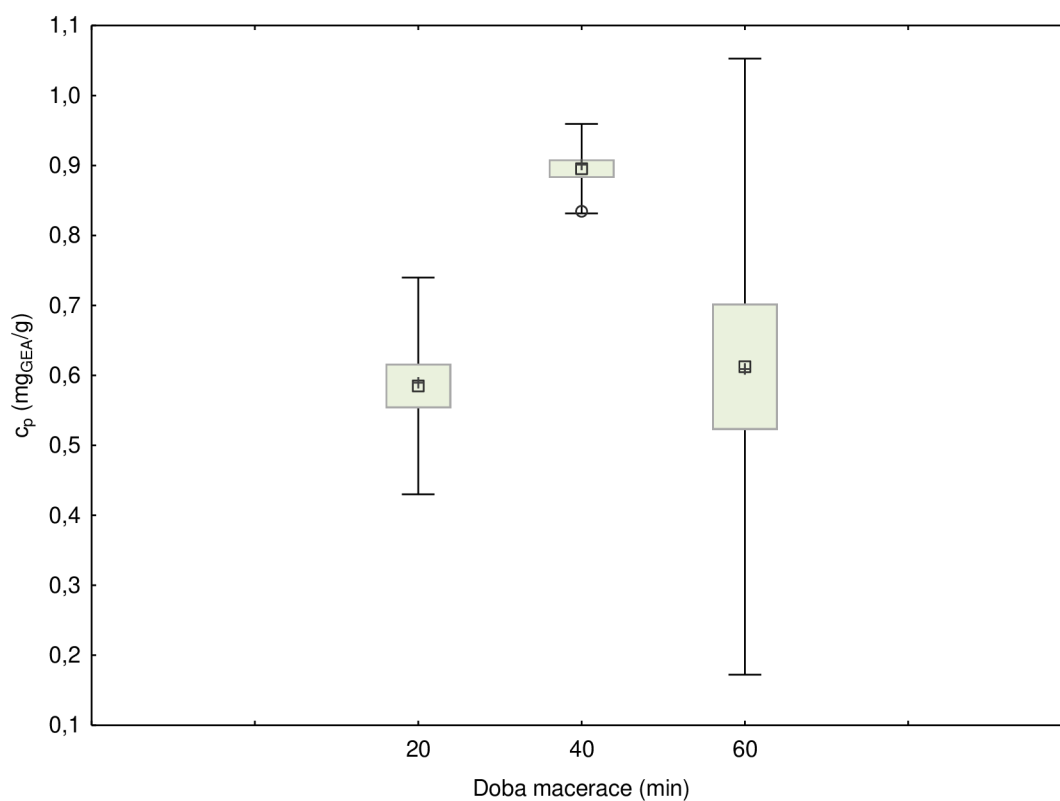
dobách macerace, a lze tedy předpokládat, že doba macerace neměla na obsah těkavých látek vliv.

Po zhodnocení těchto výsledků byla jako optimální pro přípravu extraktu vybrána doba 40 minut.

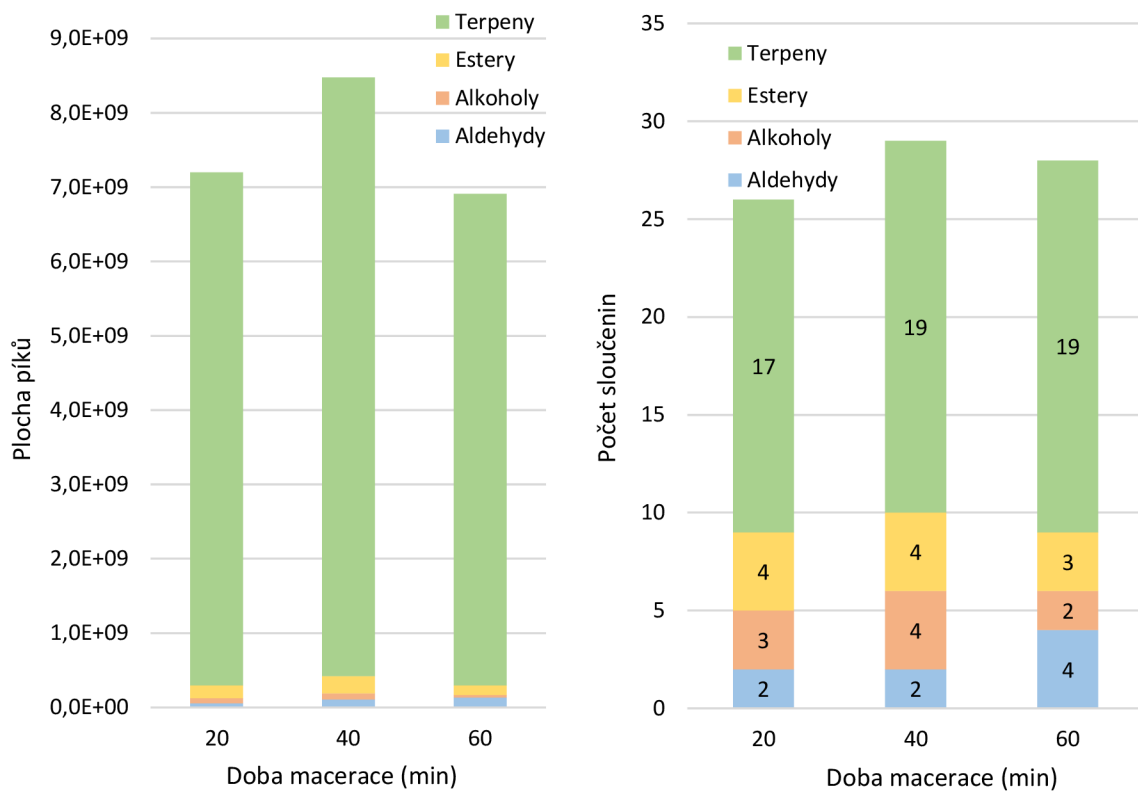
Tabulka 9.: Výsledný obsah celkových polyfenolů pro extrakt A a B po 20, 40 a 60 minutách macerace. Hodnoty značené jiným písmenem (a, b, c) se od sebe statisticky významně liší ( $p < 0,05$ )

Doba extrakce (min)	TPC ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ ) + SD			
	Extrakt A	Extrakt B	Min	Max
20	$0,52 \pm 0,05^a$	$0,64 \pm 0,03^a$	0,48	0,68
40	$0,87 \pm 0,04^b$	$0,91 \pm 0,01^b$	0,83	0,92
60	$0,42 \pm 0,04^c$	$0,81 \pm 0,05^c$	0,38	0,85

TPC – celkový obsah polyfenolů, SD – směrodatná odchylka



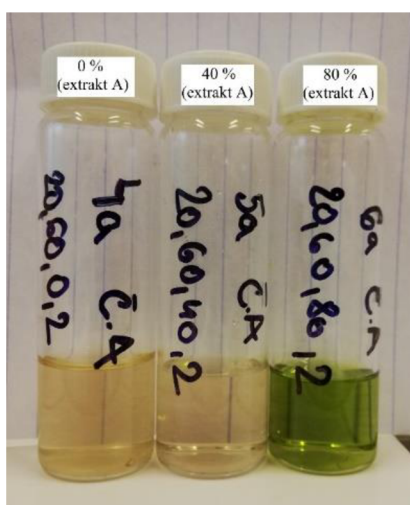
Obrázek 20.: Graf závislosti celkového obsahu polyfenolů na době macerace



Obrázek 21.: Grafy závislosti obsahu těkavých látek (plochy píků) a počtu sloučenin na době macerace

#### 4.1.2 Vliv koncentrace rozpouštědla na celkový obsah fenolických a těkavých látek

Dalším faktorem sledovaným při optimalizaci byl vliv koncentrace rozpouštědla. Jako rozpouštědlo byl zvolen různě koncentrovaný ethanol (povolen pro použití v potravinářství), přesněji koncentrace 0 % (destilovaná voda), 40 % a 80 %. Ostatní faktory (doba macerace, navážka/rozpuštědlo a teplota) byly nastaveny na hodnoty viz Tabulka 8. (60 min, 1:10, 20 °C). Na Obrázku 22. lze vidět získané extrakty při použití různých koncentrací ethanolu.



Obrázek 22.: Extrakty migrenovníku získané macerací, vliv koncentrace rozpouštědla na sledované parametry

V Tabulce 10. jsou uvedeny získané hodnoty obsahu TPC (zprůměrované,  $n = 9$ ) pro obě opakování (extrakt A a B) a na Obrázku 23. jsou výsledky prezentovány graficky. Nejnižší průměrná naměřená koncentrace celkových fenolů byla při destilované vodě (0% ethanol)  $0,23 \pm 0,01 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ , nejvyšší při použití 80% ethanolu  $1,39 \pm 0,05 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Za použití Kruskal-Wallisova testu byl zjištěn statisticky významný rozdíl (hypotéza  $H_1$ ,  $p < 0,05$ ) mezi 0 a 80% ethanolem u obou extraktů. Z celkových výsledků lze tedy odvodit, že použité rozpouštědlo má významný vliv na zisk celkových polyfenolů.

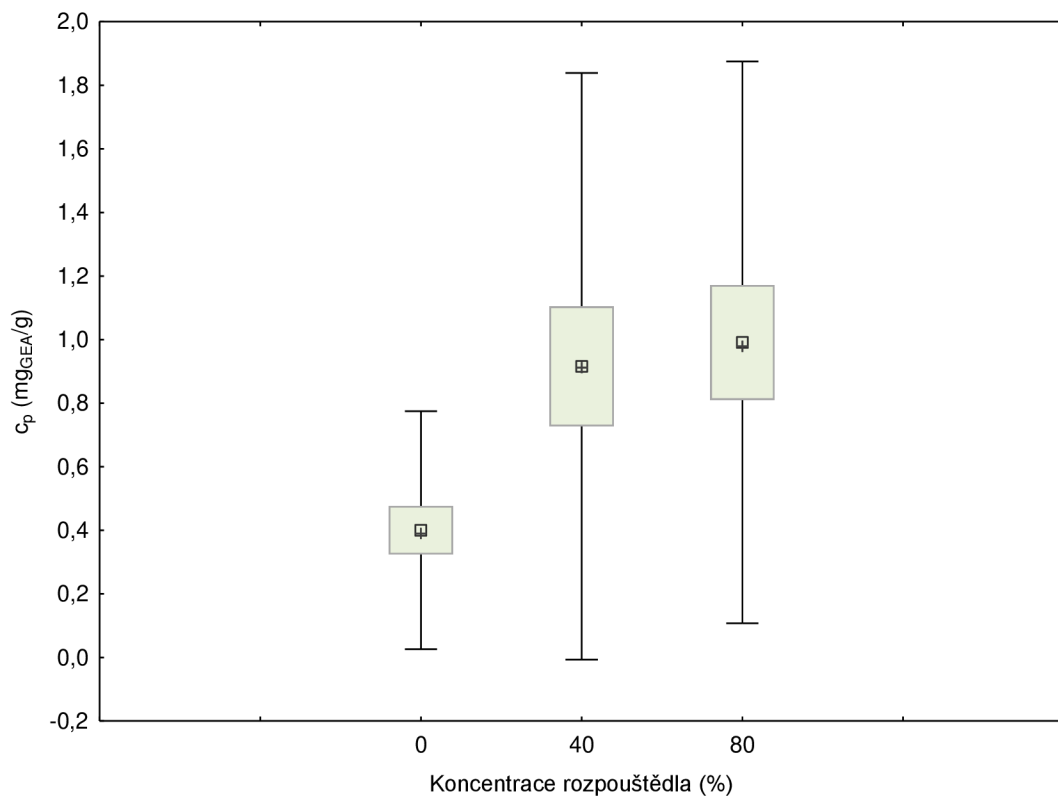
Na Obrázku 24. lze vidět výsledný obsah těkavých látek (vlevo) a počet identifikovaných sloučenin (vpravo) v závislosti na koncentraci rozpouštědla. Největší obsah i počet sloučenin byl identifikován ve vodném extraktu. Naopak nejméně látek bylo extrahováno z rostliny 80% ethanolem. Kruskal-Wallisovým testem nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (hypotéza  $H_0$ ,  $p > 0,05$ ) v obsahu získaných těkavých látek. Z těchto výsledků vyplývá, že koncentrace rozpouštědla neměla významný vliv na obsah těkavých látek.

Z výsledků tedy vyplývá, že pro zisk polyfenolů je nejlepší volbou 40% nebo 80% ethanol. Mezi těmito dvěma koncentracemi nebyl v zisku polyfenolů významný rozdíl, a tedy z ekonomického hlediska je výhodnější využít 40% ethanol. Naopak pro těkavé látky se zdá být nejvýhodnější extrakce pomocí obyčejné destilované vody. Po zhodnocení těchto výsledků byla zvolena jako optimální kompromis 40% ethanol, který se u těkavých látek, zejména v počtu identifikovaných látek, lišil od 0% ethanolu pouze o 4 sloučeniny.

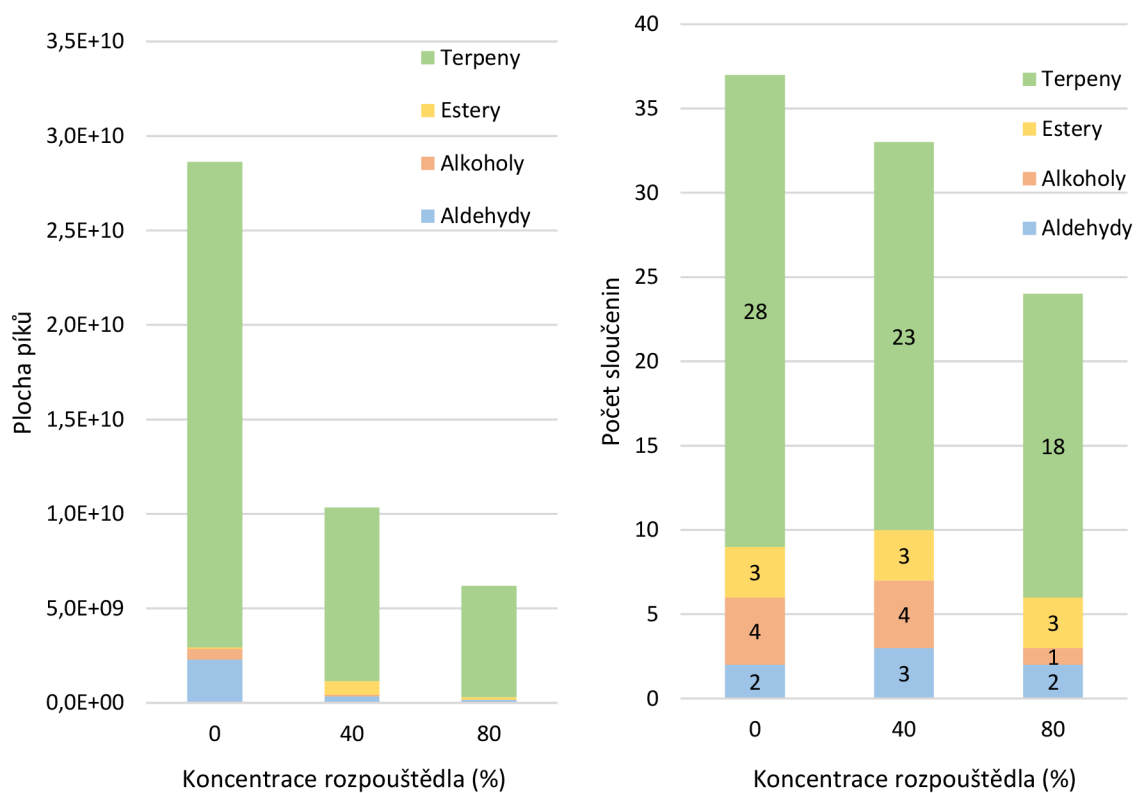
Tabulka 10.: Výsledný obsah celkových polyfenolů pro extrakt A a B při maceraci 0, 40 a 80% ethanolem. Hodnoty značené jiným písmenem (a, b, c) se od sebe statisticky významně liší ( $p < 0,05$ )

Koncentrace rozpouštědla (%)	TPC ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ ) + SD			
	Extrakt A	Extrakt B	Min	Max
0	$0,23 \pm 0,01^a$	$0,56 \pm 0,05^a$	0,22	0,63
40	$0,49 \pm 0,01^{ab}$	$1,33 \pm 0,02^{ab}$	0,49	1,36
80	$0,59 \pm 0,01^b$	$1,39 \pm 0,05^b$	0,58	1,45

TPC – celkový obsah polyfenolů, SD – směrodatná odchylka



Obrázek 23.: Graf závislosti celkového obsahu polyfenolů na koncentraci rozpouštědla

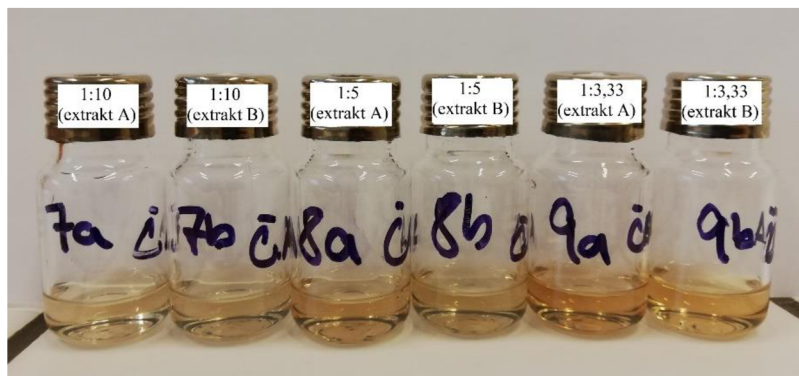


Obrázek 24.: Grafy závislosti obsahu těkavých látek (plochy píkú) a počtu sloučenin na koncentraci rozpouštědla



#### 4.1.3 Vliv poměru navážky/rozpouštědla na celkový obsah fenolických a těkavých látek

Při optimalizaci navážky migrénovníku, resp. poměru navážka vs. rozpouštědlo, byly zvoleny 3 hodnoty, 1:10 (tedy 10 g rostliny na 100 ml rozpouštědla), 1:5 (20 g na 100 ml) a 1:3,33 (30 g na 100 ml). Ostatní faktory (doba macerace, koncentrace rozpouštědla a teplota) byly nastaveny na hodnoty viz Tabulka 8. (60 min, 40% ethanol, 20 °C). Na Obrázku 25. lze vidět získané extrakty při různé volbě poměru navážka/rozpouštědlo.



Obrázek 25.: Extrakty migrénovníku získané macerací, vliv poměru navážka/rozpouštědlo na sledované parametry

V Tabulce 11. jsou uvedeny získané hodnoty obsahu TPC (zprůměrované,  $n = 9$ ) pro obě opakování (extrakt A a B). Na Obrázku 26. lze vidět grafickou závislost množství získaných polyfenolů na použitých poměrech navážka/rozpouštědlo. Nejnížší průměrná naměřená koncentrace celkových fenolů byla  $0,97 \pm 0,04 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  (1:3,33), nejvyšší  $1,12 \pm 0,13 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  (1:10) a  $1,12 \pm 0,03 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  (1:5).

Za použití analýzy rozptylu, nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (hypotéza  $H_0$ ,  $p > 0,05$ ,  $F(2,13) < F_{\text{krit}}(3,68)$ ) mezi naměřenými hodnotami. Z tohoto vyhodnocení vyplývá, že poměr navážky ku rozpouštědlu neměl signifikantní vliv na získání celkových polyfenolů.

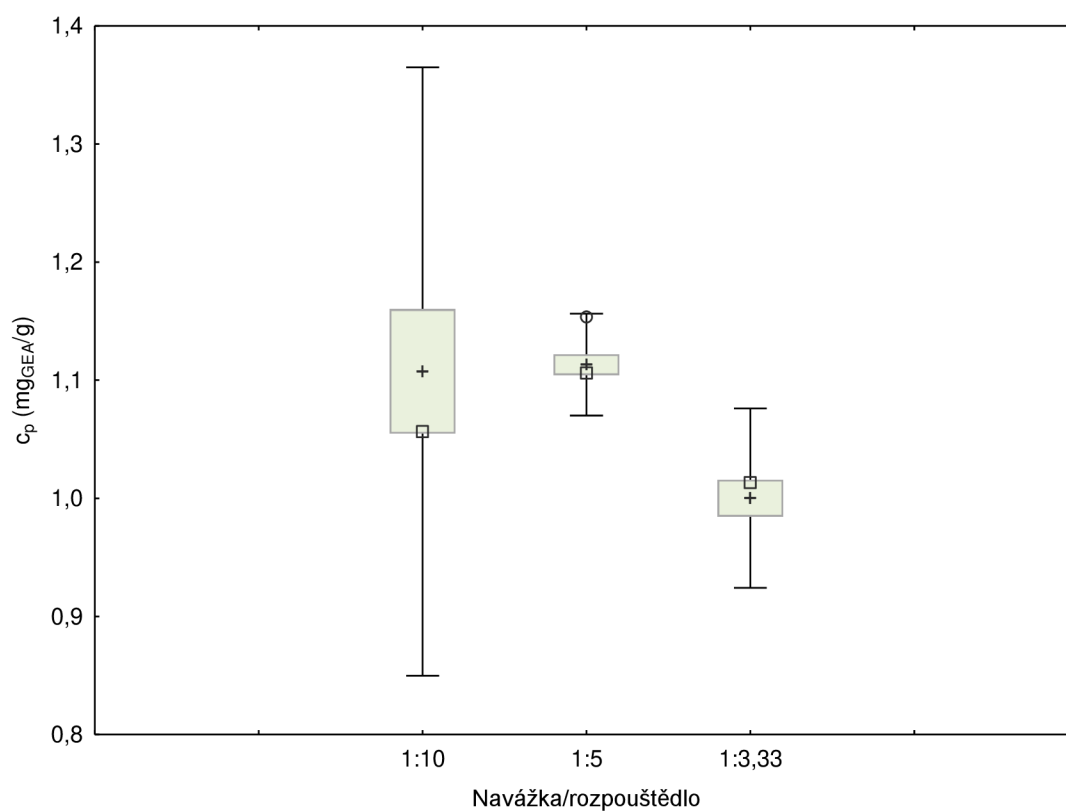
Na Obrázku 27. lze vidět závislost obsahu těkavých látek (vlevo) a počtu identifikovaných sloučenin (vpravo) na poměru navážka/rozpouštědlo. Obsahově bylo největší množství látek získáno při poměru 1:5, tedy navážce 20 g migrénovníku na 100 ml rozpouštědla. Kruskal-Wallisovým testem nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (hypotéza  $H_0$ ,  $p > 0,05$ ) v obsahu získaných těkavých látek. Lze tedy usoudit, že poměr navážka ku rozpouštědlu neměla na obsah těkavých látek v extraktu významný vliv.

Z výsledku tedy vyplývá, že poměr navážka/rozpouštědlo neměl významný vliv na obsah celkových polyfenolů ani těkavých látek. Na základě těchto výsledků byl pro přípravu optimálního extraktu vybrán poměr 1:5, který u těkavých látek vykazoval nejvyšší hodnoty.

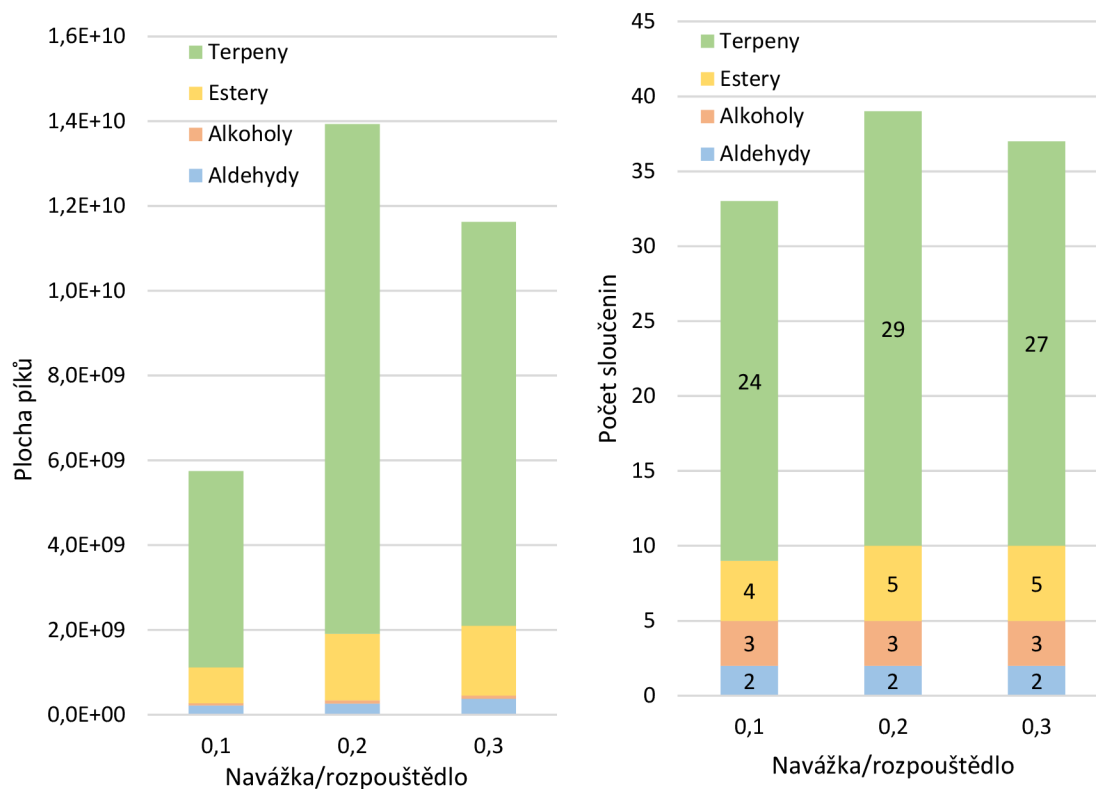
Tabulka 11.: Výsledný obsah celkových polyfenolů pro extrakt A a B při poměru navážka/rozpuštědlo 1:10, 1:5 a 1:3,33. Hodnoty značené jiným písmenem (a, b, c) se od sebe statisticky významně liší ( $p < 0,05$ )

Navážka/ rozpuštědlo	TPC (mg <sub>GAE</sub> ·g <sup>-1</sup> ) + SD			
	Extrakt A	Extrakt B	Min	Max
<b>1:10</b>	1,12 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,09 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,96	1,27
<b>1:5</b>	1,12 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,09	1,15
<b>1:3,33</b>	0,97 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,95	1,04

TPC – celkový obsah polyfenolů, SD – směrodatná odchylka



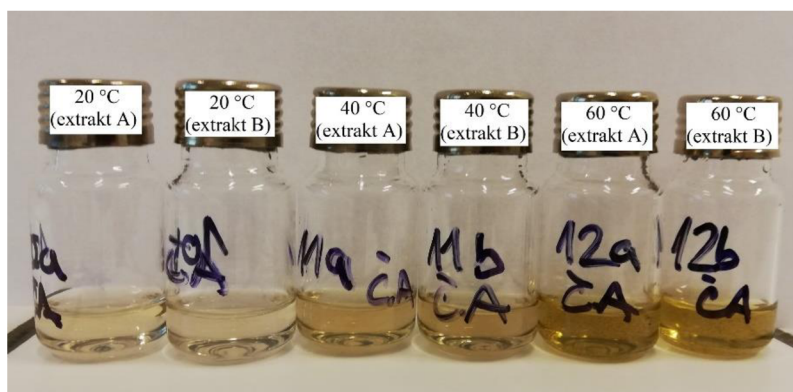
Obrázek 26.: Graf závislosti celkového obsahu polyfenolů na poměru navážka/rozpuštědlo



Obrázek 27.: Grafy závislosti obsahu těkavých látek (plochy piků) a počtu sloučenin na poměru navážka/rozpouštědlo (0,1 = 1:10; 0,2 = 1:5; 0,3 = 1:3,33)

#### 4.1.4 Vliv teploty na celkový obsah fenolických a těkavých látek

Jako poslední byl sledován vliv teploty na obsah celkových polyfenolů a těkavých látek. Macerace byla provedena při teplotách 20, 40 a 60 °C. Ostatní faktory (doba macerace, koncentrace rozpouštědla a navážka/rozpouštědlo) byly nastaveny na hodnoty viz Tabulka 8. (60 min, 40% ethanol, 1:10). Na Obrázku 28. lze vidět získané extrakty při různé teplotě.



Obrázek 28.: Extrakty migrénovníku získané macerací, vliv teploty na sledované parametry

V Tabulce 12. jsou uvedeny získané hodnoty obsahu TPC (zprůměrované,  $n = 9$ ) pro obě opakování (extrakt A a B). Na Obrázku 29. jsou výsledky opět prezentovány graficky. Nejnížší průměrná naměřená koncentrace celkových fenolů byla při 20 °C  $1,05 \pm 0,13 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ , nejvyšší při 60 °C  $6,22 \pm 0,34 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Za použití Kruskal-Wallisova testu byl zjištěn statisticky významný rozdíl (hypotéza  $H_1$ ,  $p < 0,05$ ) mezi teplotami 20 a 60 °C. Z těchto výsledků lze odvodit, že teplota má signifikantní vliv na zisk celkových polyfenolů.

Výsledky vlivu teploty na obsah (vlevo) a počet (vpravo) těkavých látek lze vidět na Obrázku 30. Obsahově bylo největší množství látek získáno při 60 °C. Počet identifikovaných terpenů činil při této teplotě 42 sloučenin. Mezi teplotami 20 a 40 °C nebyl výrazný rozdíl, v počtu sloučenin se lišily pouze o 4 sloučeniny. Ve všech extraktech zaujímala největší obsah i počet skupina terpenů. Kruskal-Wallisovým testem nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (hypotéza  $H_0$ ,  $p > 0,05$ ) v obsahu získaných těkavých látek mezi jednotlivými teplotami. Z těchto výsledků vyplývá, že teplota neměla významný vliv na obsah těkavých látek.

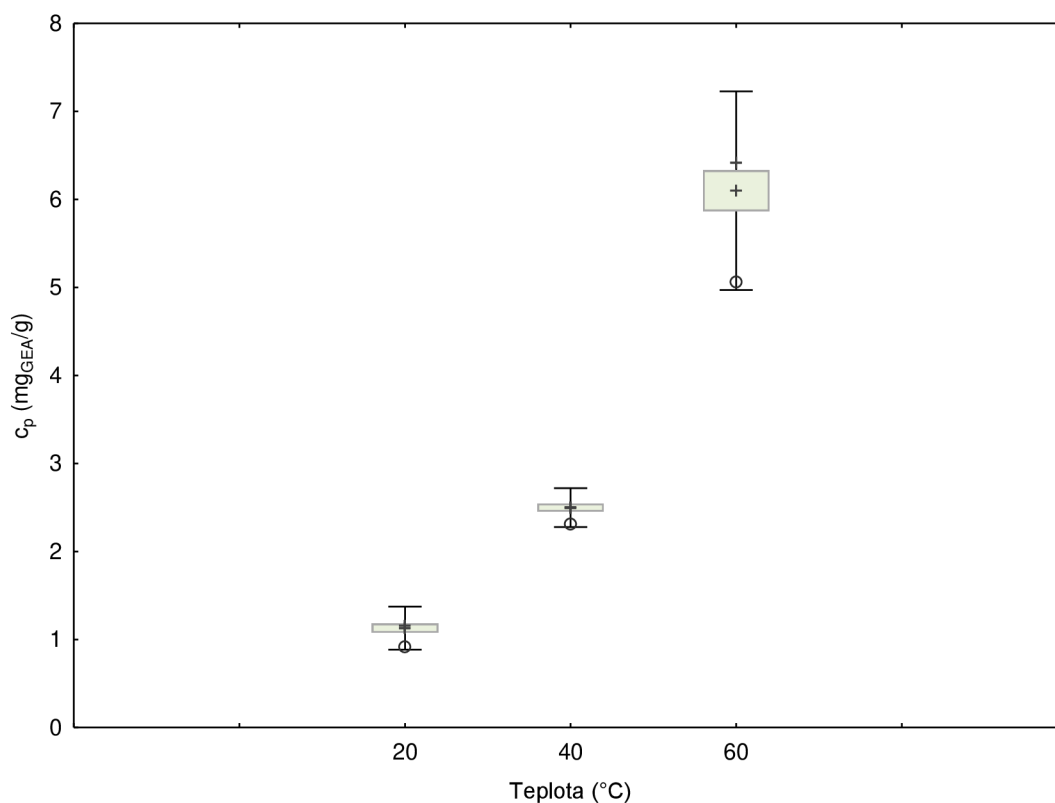
Na základě vyhodnocení výsledků byla pro přípravu optimálního extraktu vybrána teplota 60 °C.

Tabulka 12.: Výsledný obsah celkových polyfenolů pro extrakt A a B při teplotě 20, 40 a 60 °C.

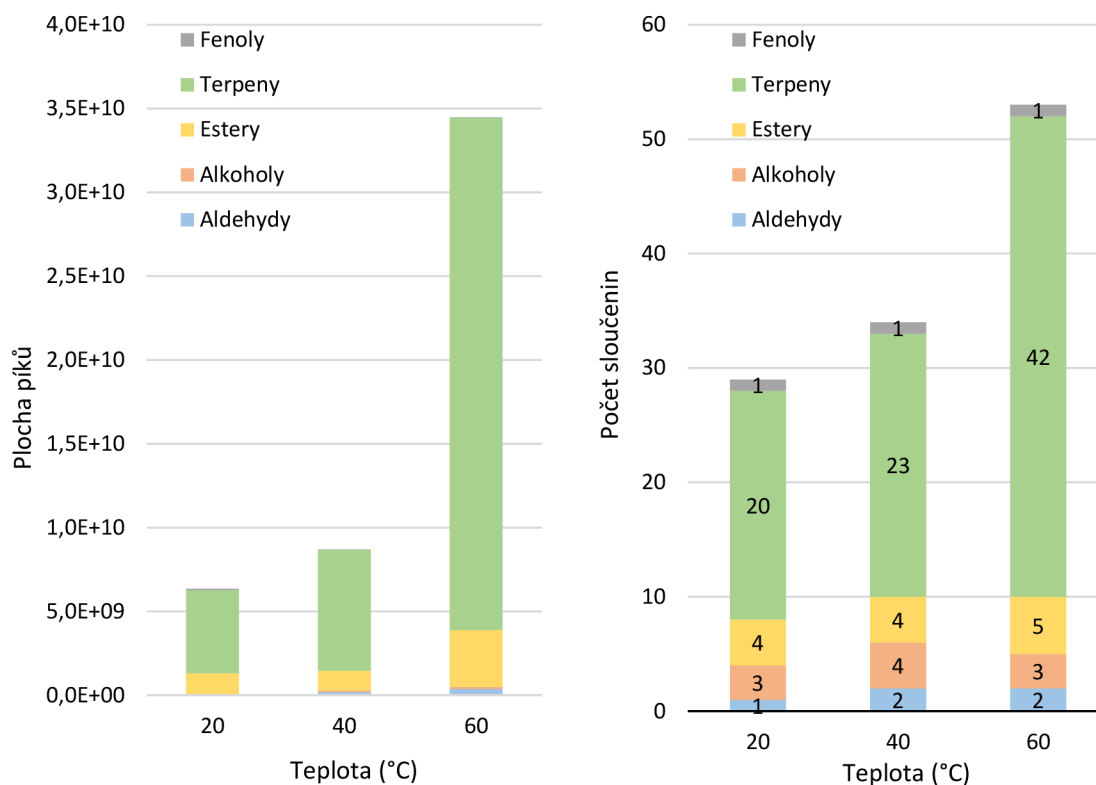
Hodnoty značené jiným písmenem (a, b, c) se od sebe statisticky významně liší ( $p < 0,05$ )

Teplota (°C)	TPC (mg <sub>GAE</sub> ·g <sup>-1</sup> ) + SD			
	Extrakt A	Extrakt B	Min	Max
20	1,20 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,05 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,92	1,27
40	2,43 ± 0,10 <sup>ab</sup>	2,56 ± 0,08 <sup>ab</sup>	2,31	2,65
60	6,22 ± 0,34 <sup>b</sup>	5,98 ± 0,80 <sup>b</sup>	5,06	6,45

TPC – celkový obsah polyfenolů, SD – směrodatná odchylka



Obrázek 29.: Graf závislosti celkového obsahu polyfenolů na teplotě



Obrázek 30.: Grafy závislosti obsahu těkavých látek (plochy piků) a počtu sloučenin na teplotě

## 4.2 Charakterizace optimálního extraktu

Na základě výsledků optimalizačního procesu (kapitola 4.1) byl připraven „optimální“ extrakt, tj. extrakt, který obsahoval pokud možno co nejvyšší množství biologicky aktivních látek z migrénovníku.

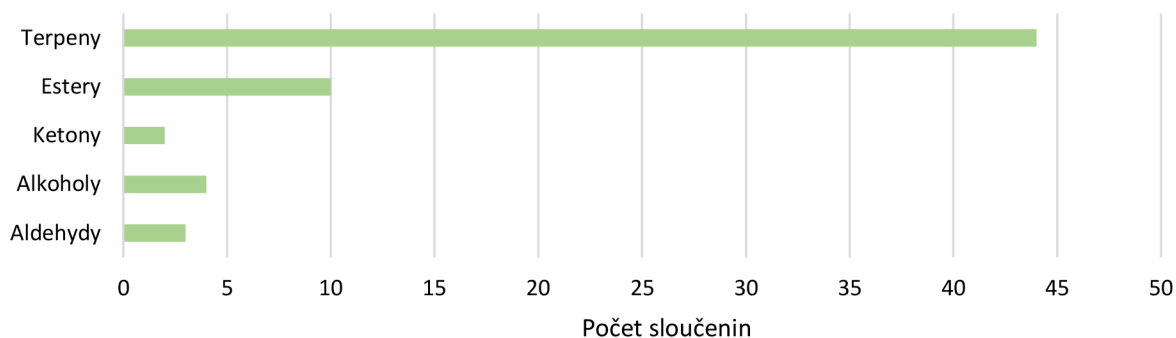
Optimální extrakt byl připraven ve třech paralelních maceracích, za těchto podmínek: doba macerace 40 minut, rozpouštědlo 40% ethanol, navážka/rozpouštědlo 1:5 (20 g rostliny na 100 ml rozpouštědla) a teplota 60 °C.

Připravený optimální extrakt byl následně charakterizován z pohledu obsahu aromaticky aktivních a celkových fenolických látek, stejně jako u optimalizace. Dále bylo provedeno stanovení antioxidační a antimikrobiální aktivity.

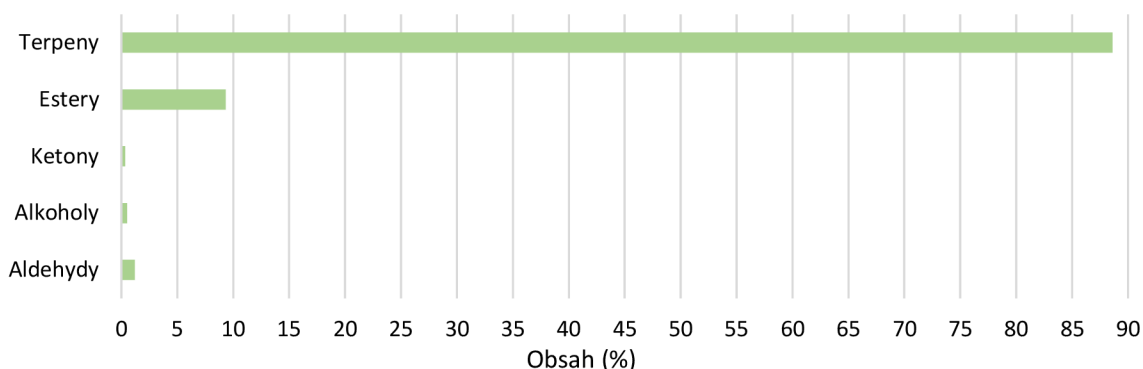
### 4.2.1 Aromatické látky v optimálním extraktu

Těkavé aromatické látky tvoří důležitou skupinu látek, kterou lze z rostlin izolovat. Kromě potenciálních antioxidačních a antimikrobiálních účinků těchto látek, jsou využívány zejména jako voňavé a chuťové látky ať už v potravinách nebo kosmetice. Velmi často se využívá jejich účinků, a to zejména těch uklidňujících, také v aromaterapii.

Aromatické látky byly stanoveny pomocí metody HS-SPME-GC-MS a s pomocí knihoven spekter identifikovány jednotlivé sloučeniny. Celkem bylo v optimálním extraktu identifikováno 63 sloučenin, jejich přehled, klasifikace a procentuální zastoupení lze vidět v Tabulce 13. Největší zastoupení (viz Obrázek 31. a 32.) zaujímaly terpeny (88,60 %). Dále byly zastoupeny estery (9,32 %), aldehydy (1,20 %), alkoholy (0,52 %) a nakonec ketony (0,35 %).



Obrázek 31.: Zastoupení (počet sloučenin) jednotlivých skupin v optimálním extraktu



Obrázek 32.: Obsah jednotlivých skupin látek v optimálním extraktu

Z celkového počtu 63 identifikovaných těkavých látek byly nejvíce zastoupeny terpeny, procentuální zastoupení jednotlivých podskupin a počet sloučenin lze vidět na Obrázku 33 a 34. Největší množství představovaly kyslíkaté monoterpeny (55,65 %) a monoterpeny (29,52 %), dále seskviterpeny (1,71 %), kyslíkaté seskviterpeny (1,46 %) a diterpeny (0,27 %). Přehled obsahu jednotlivých látek těchto skupin lze vidět na Obrázku 35. (kyslíkaté monoterpeny), Obrázku 36. (monoterpeny), Obrázku 37. (seskviterpeny) a Obrázku 38. (kyslíkaté seskviterpeny). Nejméně zastoupené, z velké části pouze ve stopovém množství, byly ketony, diterpeny, alkoholy a aldehydy.

Nejvíce zastoupenou látkou byl kafr (51,76 %), *cis*- $\beta$ -ocimen (8,17 %), 3-oktanol acetát (7,71 %), *trans*- $\beta$ -ocimen (6,76 %),  $\gamma$ -terpinen (4,93 %), *o*-cymen (3,81 %), terpinolen (1,33 %), limonen (1,33 %), kamfen (1,19 %) a borneol (1,20 %).

Většina látek identifikovaných v optimálním extraktu se shoduje s látkami identifikovanými v nejrůznějších studiích [41, 42, 103]. Studie bohužel nelze plně srovnávat vzhledem k využívání různých metod a podmínek získání extraktů. V těchto studiích byly nejvíce zastoupeny 14-hydroxy- $\beta$ -karyofylen a fenchon, které však nebyly v našem případě v optimálním extraktu identifikovány.



Tabulka 13.: Aromaticky aktivní látky identifikované v optimálním extraktu, jejich klasifikace a procentuální zastoupení (tučně označeny látky nalezené v jiných studiích [41, 42, 103])

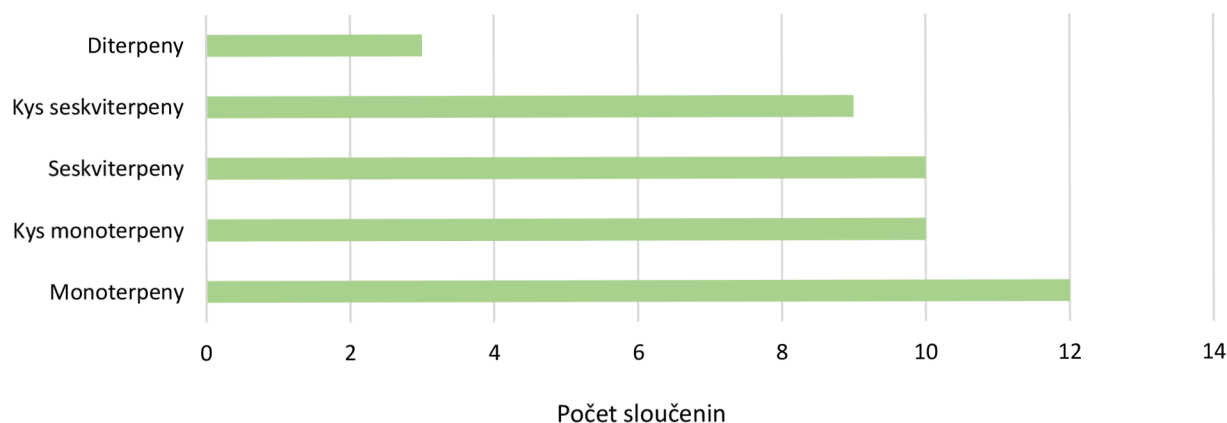
RT (min)	Sloučenina	Klasifikace	Procentuální zastoupení
<b>6,55</b>	<b>kamfen</b>	<b>Monoterpen</b>	<b>1,19 %</b>
<b>7,66</b>	<b>sabinen</b>	<b>Monoterpen</b>	<b>st</b>
8,89	$\beta$ -myrcen	Monoterpen	0,77 %
9,30	$\alpha$ -terpinen	Monoterpen	0,74 %
<b>9,81</b>	<b>limonen</b>	<b>Monoterpen</b>	<b>1,33 %</b>
<b>10,16</b>	<b>1,8-cineol</b>	<b>Kyslíkatý monoterpen</b>	<b>0,82 %</b>
10,88	trans- $\beta$ -ocimen	Monoterpen	6,76 %
11,16	$\gamma$ -terpinen	Monoterpen	4,93 %
<b>11,35</b>	<b>cis-<math>\beta</math>-ocimen</b>	<b>Monoterpen</b>	<b>8,17 %</b>
11,93	o-cymen	Monoterpen	3,81 %
<b>12,20</b>	<b>terpinolen</b>	<b>Monoterpen</b>	<b>1,33 %</b>
13,64	3-oktanol acetát	Ester	7,71 %
16,24	ethylester kyseliny oktanové	Ester	st
16,50	p-cymen	Monoterpen	0,34 %
16,89	3-nonanol	Alkohol	0,22 %
17,08	cis-sabinen hydrát	Monoterpen	st
17,33	6-ethenyl-2,2,6-trimethyloxan-3-on	Keton	0,33 %
17,67	2-ethyl-1-hexanol	Alkohol	0,12 %
17,98	decanal	Aldehyd	0,18 %
<b>18,58</b>	<b>kafr</b>	<b>Kyslíkatý monoterpen</b>	<b>51,76 %</b>
<b>19,12</b>	<b>linalool</b>	<b>Kyslíkatý monoterpen</b>	<b>0,80 %</b>
20,01	bornyl acetát	Ester	1,22 %
<b>20,42</b>	<b>karyofylen</b>	<b>Seskviterpen</b>	<b>0,21 %</b>
<b>20,58</b>	<b>terpinen-4-ol</b>	<b>Kyslíkatý monoterpen</b>	<b>0,55 %</b>
21,29	ethylester kyselina kaprinové	Ester	st
<b>21,99</b>	<b><math>\gamma</math>-muurolen</b>	<b>Seskviterpen</b>	<b>0,15 %</b>
22,14	humulen	Seskviterpen	st
22,23	guaia-6,9-dien	Seskviterpen	0,24 %
<b>22,59</b>	<b>geranial</b>	<b>Kyslíkatý monoterpen</b>	<b>st</b>
22,75	$\beta$ -vatirenen	Seskviterpen	st
<b>22,81</b>	<b><math>\alpha</math>-terpineol</b>	<b>Kyslíkatý monoterpen</b>	<b>0,25 %</b>
<b>22,91</b>	<b>borneol</b>	<b>Kyslíkatý monoterpen</b>	<b>1,20 %</b>
23,19	pinokarveol	Kyslíkatý monoterpen	st
23,32	$\beta$ -selinen	Seskviterpen	0,25 %
23,42	$\gamma$ -gurjunen	Seskviterpen	0,37 %
23,78	seskvicineol	Kyslíkatý seskviterpen	0,71 %
<b>24,12</b>	<b>kadina-1(10),4-dien</b>	<b>Seskviterpen</b>	<b>0,25 %</b>
24,68	selina-3,7(11)-dien	Kyslíkatý seskviterpen	0,15 %
25,04	methyl ester kyseliny laurové	Ester	st
<b>25,86</b>	<b>kalamenen</b>	<b>Seskviterpen</b>	<b>st</b>

RT – retenční čas, st – stopové množství

Tabulka 13 pokr.: Aromaticky aktivní látky identifikované v optimálním extraktu, jejich klasifikace a procentuální zastoupení (tučně označené látky nalezené v jiných studiích [41, 42, 103])

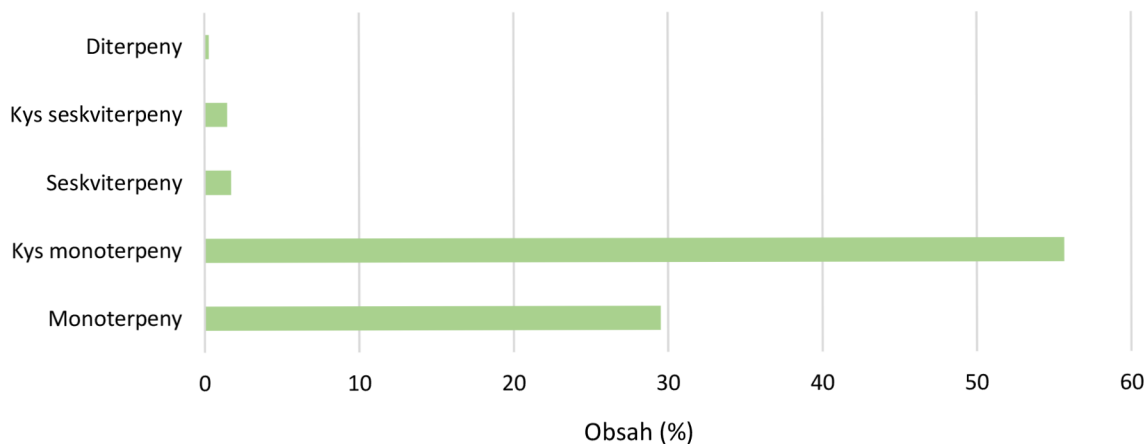
RT (min)	Sloučenina	Klasifikace	Procentuální zastoupení
26,28	3-methylbutyl ester kyseliny pentadekanové	Ester	st
27,63	2-fenylethanol	Alkohol	st
<b>27,91</b>	<b>ledol</b>	<b>Kyslíkatý seskviterpen</b>	<b>st</b>
28,51	1-dodekanol	Alkohol	0,12 %
29,40	2-methylbutyl ester kyseliny fenylctové	Ester	st
29,84	isopropyl myristát	Ester	st
30,87	elemol	Kyslíkatý seskviterpen	st
<b>31,00</b>	<b>viridiflorol</b>	<b>Kyslíkatý seskviterpen</b>	<b>st</b>
31,29	2-ethyl-cyklohexanon	Keton	st
<b>32,24</b>	<b>globulol</b>	<b>Kyslíkatý seskviterpen</b>	<b>st</b>
32,61	$\gamma$ -eudesmol	Kyslíkatý seskviterpen	st
32,92	karvakrol	Kyslíkatý monoterpen	st
33,34	methylester kyseliny palmitové	Ester	st
<b>33,48</b>	<b>tymol</b>	<b>Kyslíkatý monoterpen</b>	<b>st</b>
<b>33,63</b>	<b><math>\alpha</math>-eudesmol</b>	<b>Kyslíkatý seskviterpen</b>	<b>0,15 %</b>
33,78	$\beta$ -eudesmol	Kyslíkatý seskviterpen	0,15 %
33,99	ethylester kyseliny palmitové	Ester	st
35,52	sklaren	Diterpen	st
36,13	$\alpha$ -hexyl-cinnamaldehyde	Aldehyd	st
37,07	guaiazulen	Seskviterpen	st
<b>37,88</b>	<b>abietadien</b>	<b>Diterpen</b>	<b>st</b>
38,55	abietatrien	Diterpen	0,17 %
40,90	2,3,4,5-tetramethoxybenzaldehyde	Aldehyd	0,96 %

RT – retenční čas, st – stopové množství

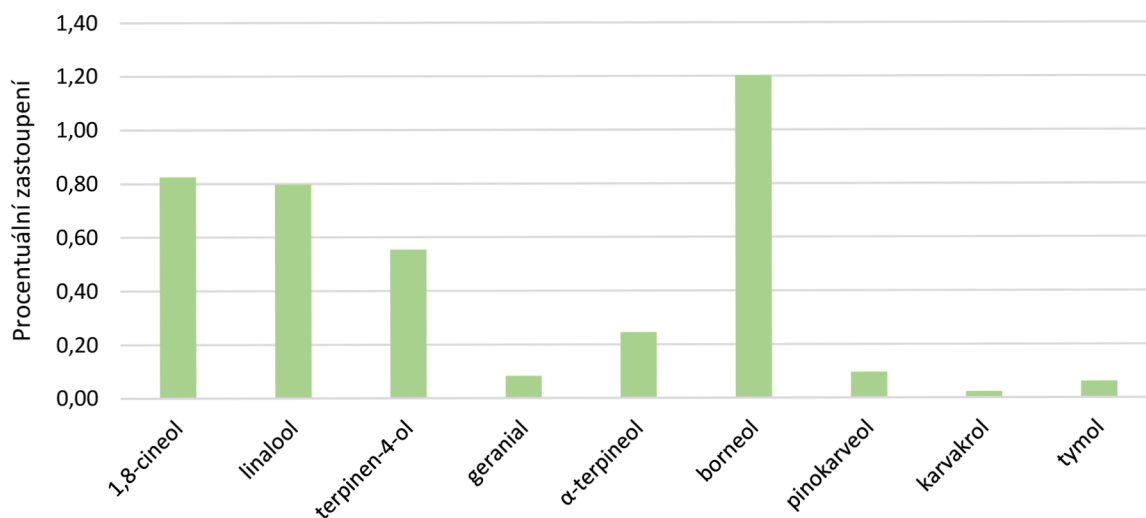


Obrázek 33.: Zastoupení (počet sloučenin) podskupin terpenů v optimálním extraktu

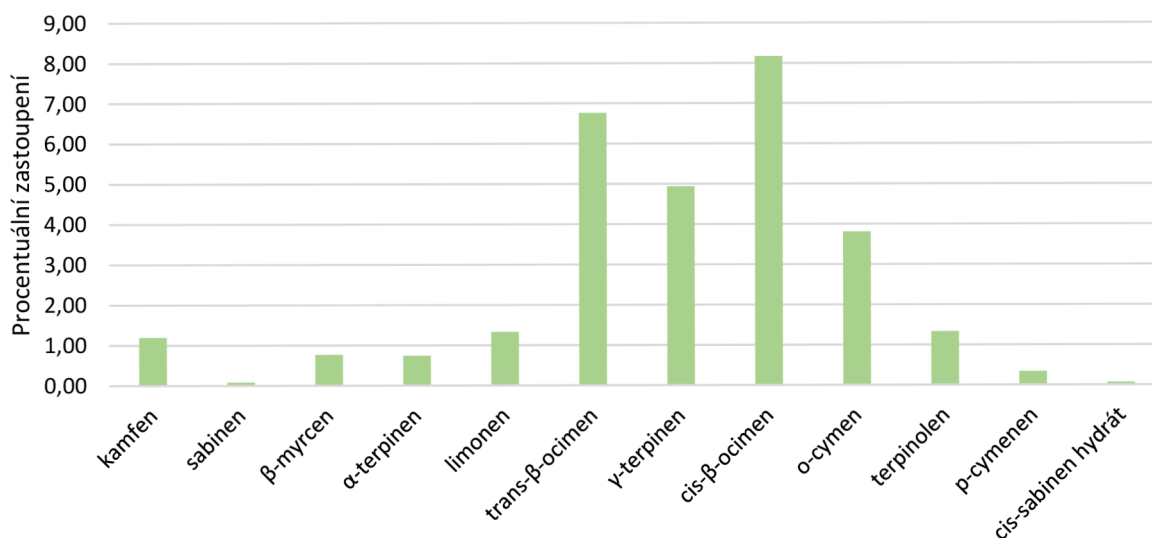




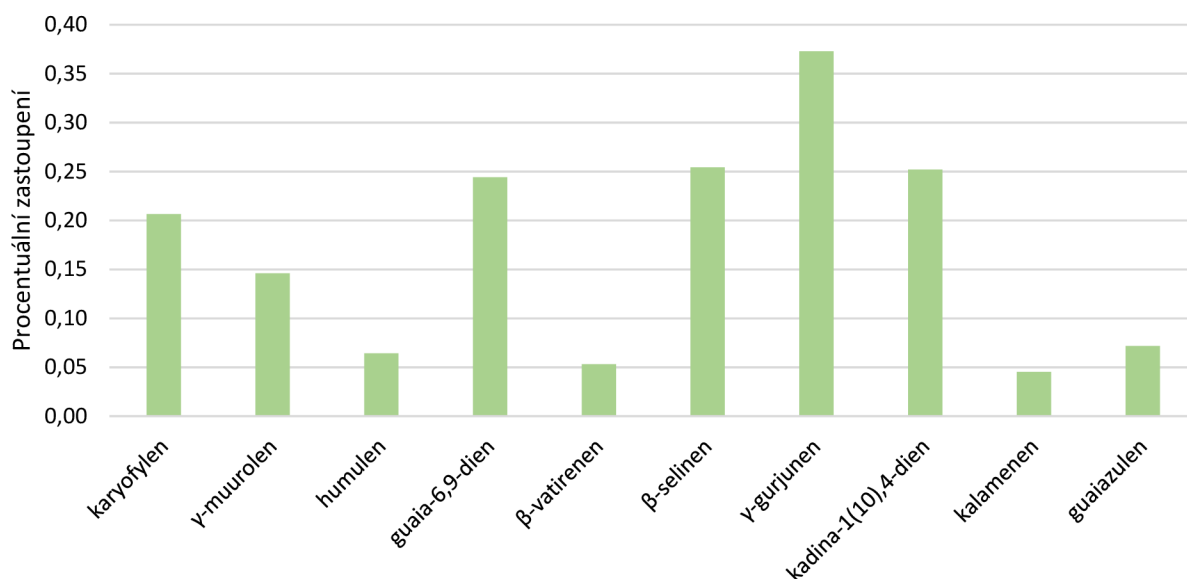
Obrázek 34.: Obsah podskupin terpenů v optimálním extraktu v procentech



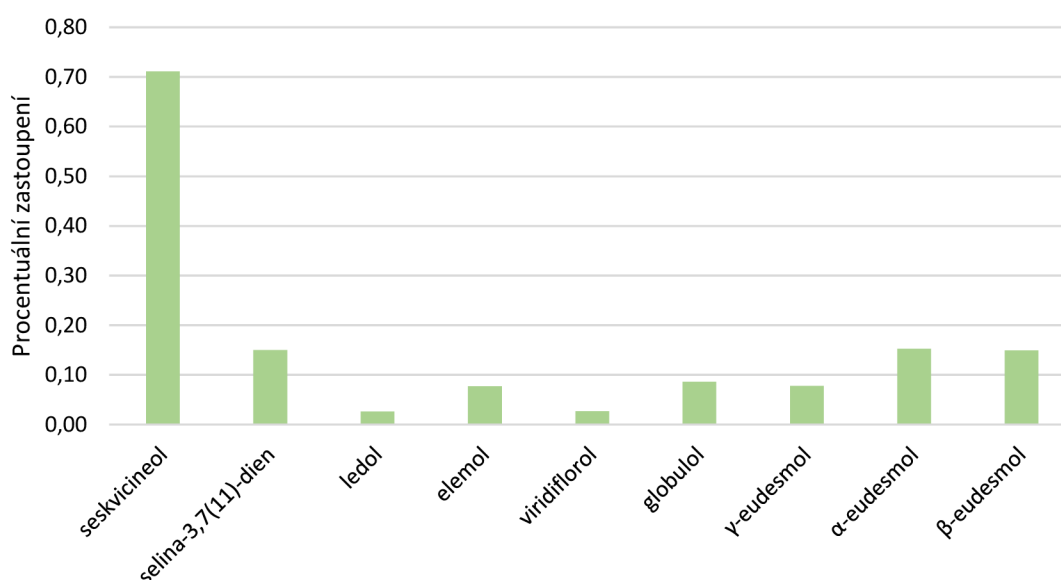
Obrázek 35.: Graf procentuálního zastoupení kyslíkatých monoterpenů v optimálním extraktu



Obrázek 36.: Graf procentuálního zastoupení monoterpenů v optimálním extraktu



Obrázek 37.: Graf procentuálního zastoupení seskviterpenů v optimálním extraktu



Obrázek 38.: Graf procentuálního zastoupení kyslíkatých seskviterpenů v optimálním extraktu

#### 4.2.2 Celkový obsah polyfenolů v optimálním extraktu

Celkový obsah polyfenolů byl stanoven spektrofotometricky metodou Folin-Ciocalteu. Všechny tři optimalizované extrakty byly proměřeny 3krát, výsledný obsah činil  $0,31 \pm 0,02 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{ml}^{-1}$ , což je rovno v přepočtu na gram rostliny  $1,52 \pm 0,11 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  (Tabulka 14.). Na Obrázku 39. lze vidět rozdíly mezi jednotlivými extrakty. Rozdíl mohl být způsoben nedostatečným promísením nakrájeného migrénovníku, kdy se obsah pokrájených listů a stonků mohl částečně v extraktech lišit.

Fernandez a kol. [100] stanovili v extraktech migrénovníku celkové polyfenoly  $181,97 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ . Obsah polyfenolů byl výrazně větší, ovšem tato dvě stanovení nelze dobře porovnávat, vzhledem k tomu, že k získání extraktu bylo použito jiné rozpouštědlo (methanol).

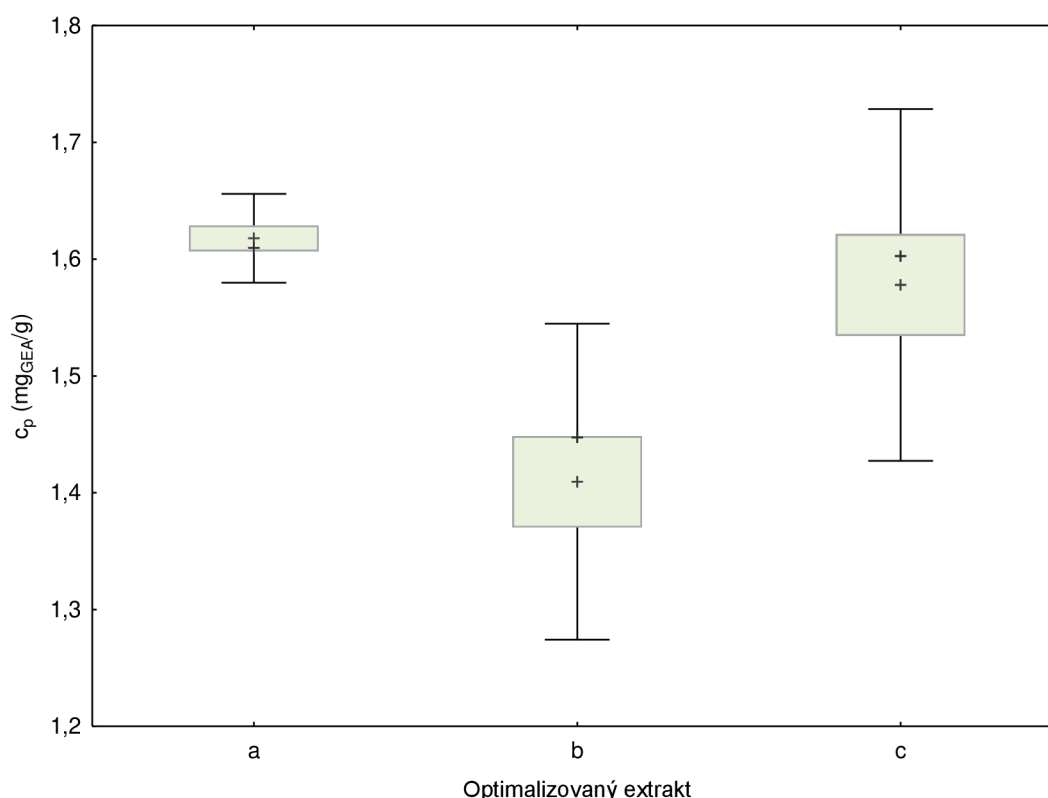
Amoo a kol. [106] stanovili obsah celkových polyfenolů na  $7,2 \pm 0,38 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  a i v tomto případě byl použit jiný způsob zisku extraktu.

Ve srovnání s publikovanými údaji je námi nalezená hodnota TPC nízká, což jen potvrzuje významný vliv použité extrakční metody.

Tabulka 14.: Celkový obsah fenolických látek v optimálním extraktu

	Průměr + SD	Min	Max
TPC ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	$0,31 \pm 0,02$	0,27	0,33
TPC ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ )	$1,52 \pm 0,11$	1,33	1,64

SD – směrodatná odchylka



Obrázek 39.: Graf obsahu celkových polyfenolů pro jednotlivá opakování optimalizované extrakce

#### 4.2.3 Antioxidační aktivita optimálního extraktu

V optimalizovaném extraktu byla kromě celkových polyfenolů stanovena také antioxidační aktivita pomocí ABTS. Antioxidační aktivita byla vyjádřena jako ekvivalent syntetického standardu (derivátu vitamínu E) pod názvem Trolox (TEAC). Přičemž samozřejmě platí, že antioxidační aktivita látek přítomných v extraktech je vyšší s vyšší hodnotou TEAC.

Měření antioxidační aktivity bylo 2krát opakováno pro každý extrakt. Pravděpodobně vzhledem k značné nestálosti radikálu ABTS byly výsledné hodnoty jednotlivých extraktů odlišné (viz. Obrázek 40.). Průměrná antioxidační aktivita činila  $417,56 \pm 32,84 \mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Zhášení radikálu  $\text{ABTS}^{*+}$  bylo rovno  $88,99 \pm 7,00 \%$  (Tabulka 15.).

Z důvodu malého množství publikací sledujících antioxidační aktivitu extraktů migrénovníku pomocí metody ABTS, nelze efektivně tuto naměřenou hodnotu porovnat s jinými studii.

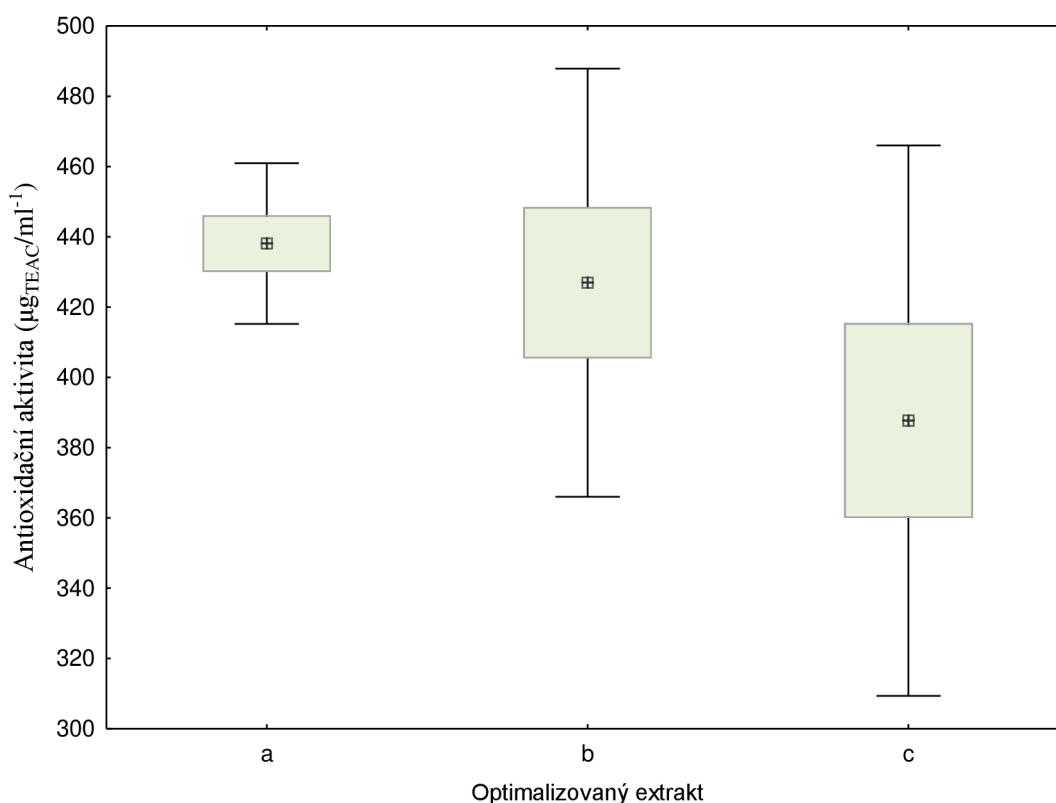
Pouze Elaka a kol. [109] stanovili antioxidační aktivitu extraktů  $11,55 \pm 3,97 \mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}$ , v tomto případě byla námi naměřená hodnota výrazně vyšší.

Na závěr byl zhodnocen vztah mezi obsahem polyfenolů a antioxidační aktivitou pomocí korelační analýzy. Spearmanův korelační koeficient byl roven 0,60. Výsledná hodnota koeficientu poukazuje na pozitivní korelační vztah mezi naměřenými hodnotami polyfenolů a antioxidační aktivity. Zjednodušeně řečeno, čím vyšší byl obsah polyfenolů ve vzorku, tím vyšší byla jeho antioxidační aktivita.

Tabulka 15.: Antioxidační aktivita a procento zhášení radikálu ABTS<sup>•+</sup>

	<b>Průměr + SD</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
<b>Antioxidační aktivita (<math>\mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}</math>)</b>	417,56 ± 32,84	360	448,46
<b>Zhášení radikálu ABTS<sup>•+</sup> (%)</b>	88,99 ± 7,00	76,72	95,57

SD – směrodatná odchylka



Obrázek 40.: Graf antioxidační aktivity pro jednotlivá opakování optimalizované extrakce

#### 4.2.4 Antimikrobiální aktivita optimálního extraktu

Antimikrobiální aktivita připravených optimálních extraktů byla sledována proti 3 zmíněným mikroorganismům (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli* a *Candida glabrata*). Pro každý extrakt byla provedena dvě opakování (miska a, miska b). Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 16. V tabulce jsou uvedeny rozměry inhibiční zóny po odečtení inhibiční zóny kontrolní jamky, ve které bylo napipetováno rozpouštědlo (40% ethanol).

Tabulka 16.: Výsledky ověření antimikrobiální aktivity extraktů migrénovníku

MO	Extrakt	Inhibiční zóna (mm)						ø (mm)
		Miska a			Miska b			
<i>B. cereus</i>	1	x	x	x	2,0	0,2	1,0	1,07 ± 0,90
	2	2,0	3,0	3,0	5,0	3,0	3,0	3,17 ± 0,98
	3	4,0	4,0	3,0	4,0	4,0	1,0	3,33 ± 1,21
<i>E. coli</i>	1	x	x	x	x	x	x	x
	2	x	x	x	x	x	x	x
	3	x	x	x	x	x	x	x
<i>C. glabrata</i>	1	x	x	x	x	x	x	x
	2	x	x	x	x	x	x	x
	3	x	x	x	x	x	x	x

MO – mikroorganismus, ø – průměr

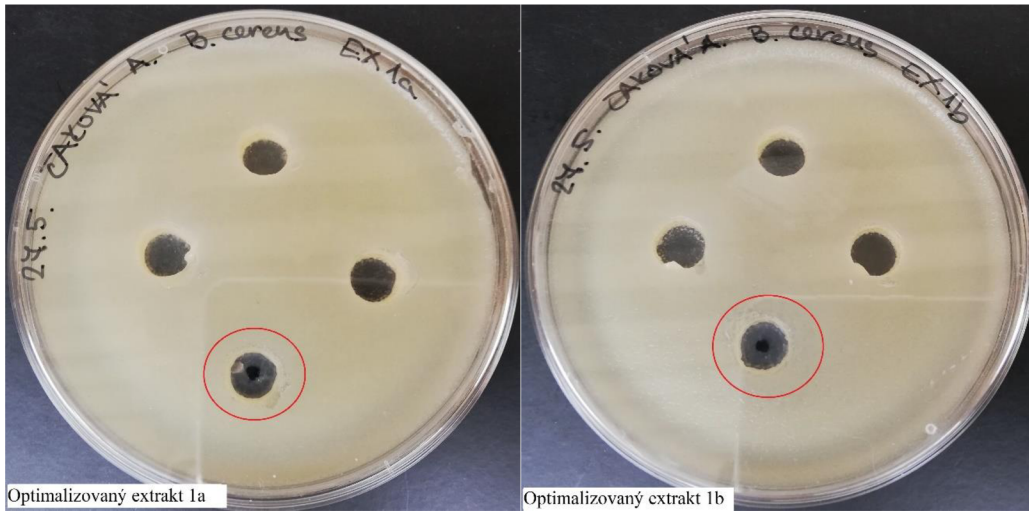
Z Tabulky 16. je patrné, že extrakty vykazovaly slabou antimikrobiální aktivitu pouze vůči bakterii *Bacillus cereus* (viz Obrázek 41.). Z důvodu podobného zbarvení kultivačního média a kolonií bakterie na něm rostoucí, nejsou inhibiční zóny na Obrázku 41. navíc dobře znatelné. Ngule a kol. [102] stanovili antimikrobiální aktivitu vůči *B. cereus* podstatně vyšší (inhibiční zóny  $18,00 \pm 0,58$  mm). Tato dvě stanovení však opět nelze dobře porovnat, jelikož Ngule a kol. připravovali extrakt jiným způsobem (vaření ve vodě po dobu 20 minut, následné odpaření a rozpuštění v DMSO).

Vůči bakterii *Escherichia coli* v našem případě nevykazoval extrakt žádnou inhibici (viz Obrázek 42.). Ndiku a Ngule [105] však naměřili inhibiční zóny u *E. coli*  $13,33 \pm 0,887$  mm.

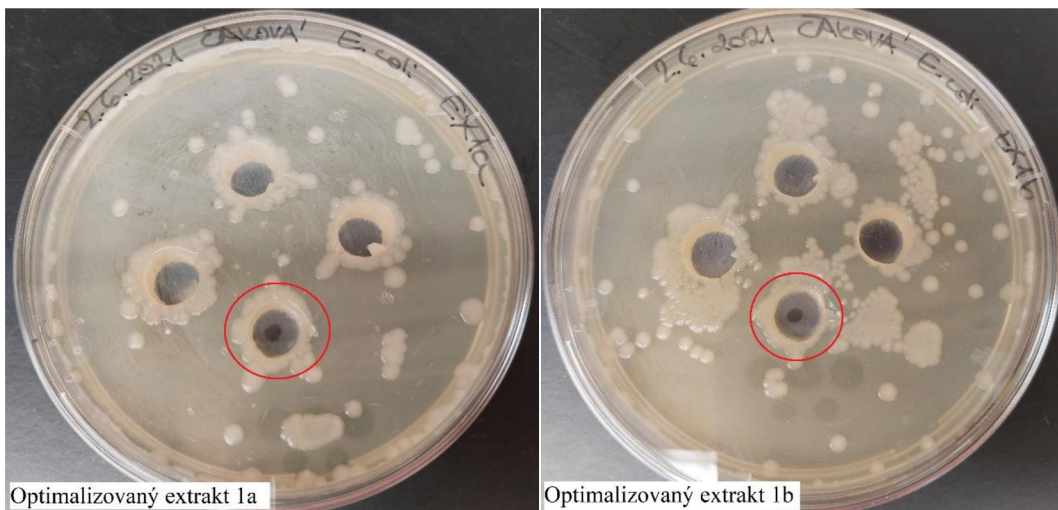
Rozdíl mezi odolností těchto dvou bakterií pravděpodobně vyplývá také z jejich buněčné struktury. *B. cereus* jako grampozitivní bakterie postrádá vnější membránu a má nízký obsah lipidů a lipoproteinů a je tak méně odolný vůči antimikrobiálním látkám. Naproti tomu *E. coli* jako bakterie gramnegativní má pouze tenkou peptidoglykanovou vrstvu, ale navíc má také vnější membránu a s ní i vyšší obsah lipidů a lipoproteinů, které zajišťují buňce větší odolnost vůči antimikrobiálním látkám. Optimalizovaný extrakt tedy vykazoval slabou antimikrobiální aktivitu vůči *B. cereus*, avšak na inhibici *E. coli* již nebyl dostatečně silný.

Vůči kvasince *Candida glabrata* nevykazoval optimální extrakt také žádnou inhibici (viz Obrázek 43.). V rámci rešerše nebyla bohužel nalezena studie sledující inhibiční účinky extraktu migrénovníku vůči této kvasince. Costa a kol. [96] sledovali inhibiční účinky extraktů migrénovníku pomocí diluční metody vůči *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* a *Candida tropicalis*. U prvních dvou zmíněných pozorovali inhibiční aktivitu. Vůči *C. tropicalis* nebyl připravený extrakt účinný.

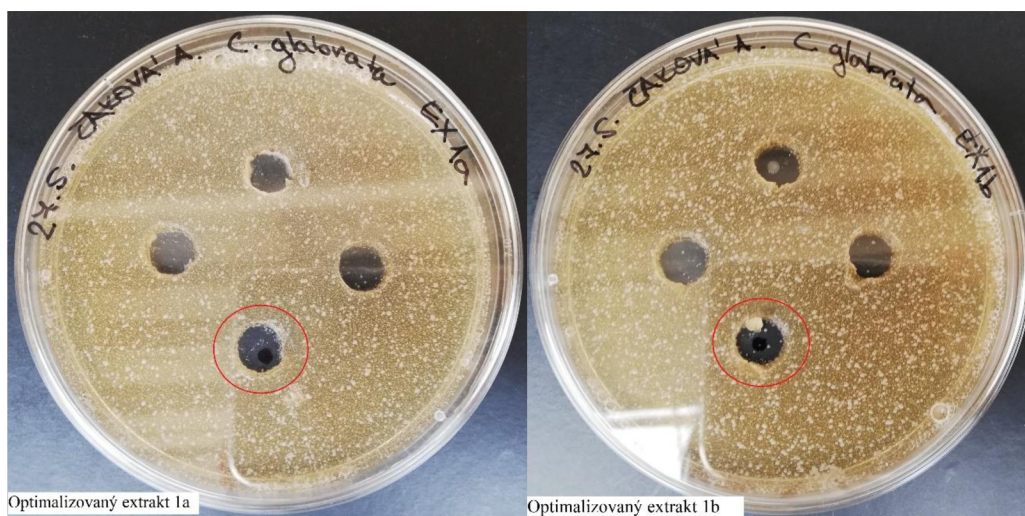




Obrázek 41.: Výsledky jamkové difúzní metody optimálního extraktu vůči *Bacillus cereus* (červeně označená kontrolní jamka)



Obrázek 42.: Výsledky jamkové difúzní metody optimálního extraktu vůči *Escherichia coli* (červeně označená kontrolní jamka)



Obrázek 43.: Výsledky jamkové difúzní metody optimálního extraktu vůči *Candida glabrata* (červeně označená kontrolní jamka)

### 4.3 Aplikace vyrobeného extraktu

Ze zpracované rešerše vyplývá, že extrakty bylin v potravinářství a kosmetice nachází stále více uplatnění pro jejich antioxidační a antimikrobiální účinky. Velkou výhodou oproti syntetickým látkám se stejným účinkem je jejich přírodní povaha, která se v současné době stále více cení. I z tohoto důvodu lze nalézt rostoucí množství studií, které se zabývají studiem antioxidačního a antimikrobiálního potenciálu nejrůznějších bylin a možností využití tohoto potenciálu právě v potravinářství nebo kosmetice. Na druhou stranu by mohly extrakty bylin představovat potenciální nebezpečí; jedná se zejména o chemickou a mikrobiální kontaminaci, která by se mohla do extraktů dostat např. z půdy nebo ovzduší. Řešení tohoto problému spočívá ve využívání pokud možno co nejmenšího množství chemických postřiků, ideálně žádných, k ošetření rostoucích bylin. Mikrobiální kontaminaci lze řešit vhodným ošetřením extraktů, jako je např. vyšší teplota, s rizikem ztráty některých termolabilních biologicky aktivních látek.

Původním záměrem této práce bylo aplikovat vyrobený extrakt do vhodného potravinového produktu, to však v této fázi nebylo možné. Množství rostliny potřebné k provedení extrakce a zahuštění extraktu na požadovanou koncentraci vhodnou pro využití k ochucení potravin nebylo dostatečné a sehnání dalších rostlin bylo časově náročné. Toto tedy bude náplní pro další navazující práce.

Pro zajímavost zde uvedu studii Dunkel a kol. [118], kteří sledovali antimikrobiální účinky listů *Tetradenia riparia* při skladování fazolí a jejich potenciál ochránit potravinu před nežádoucími mikroorganismy. Fazole skladované s *Tetradenia riparia* poté podrobili senzorickému hodnocení vyškoleným panelem. Panel zhodnotil fazole skladované s *Tetradenia riparia* stejně přijatelné jako fazole skladované za konvenčních metod, které využívají 1% přípravek Actellic.



## 5. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá problematikou získávání bylinných extraktů, konkrétně z migrénovníku (*Tetradenia* spp.).

Na přípravu extraktů byly využity čerstvé listy a stonky rostlinek migrénovníku; jako hlavní charakterizující parametry extraktů byly sledovány: celkový obsah polyfenolů metodou Folin-Ciocalteu, těkavé látky pomocí HS-SPME-GC-MS, antioxidační aktivita metodou TEAC a antimikrobiální aktivita jamkovou difúzní metodou.

Hlavním cílem práce bylo optimalizovat vybranou metodu extrakce, maceraci, z pohledu maximálního zisku biologicky aktivních látek. Při optimalizaci byl sledován vliv různých faktorů, konkrétně teploty a doby macerace, typu rozpouštědla, poměru navážka ku rozpouštědlu na obsah celkových fenolických a těkavých látek.

Z výsledků bylo patrné, že významný vliv na zisk celkových polyfenolů měly teplota a doba macerace a typ rozpouštědla. Poměr navážky ku rozpouštědlu naopak nebyl ze statistického hlediska významný. Vliv na obsah těkavých látek nebyl statisticky významný u žádného ze sledovaných faktorů. Pro zjištění podrobnějšího vlivu těchto faktorů na zisk biologicky aktivních látek by bylo ideální porovnat více hodnot jednotlivých faktorů, aby byl získán detailnější přehled.

Na základě vyhodnocení výsledků optimalizace byly vybrány pro přípravu optimálního extraktu následující podmínky: doba 40 minut, rozpouštědlo 40% ethanol, poměr navážka/rozpouštědlo 1:5 a teplota 60 °C. V optimálním extraktu bylo celkem identifikováno 63 aromaticky aktivních sloučenin. Největší zastoupení představovaly terpeny (88,60 %), z nich pak zejména kyslíkaté monoterpeny (55,65 %) a monoterpeny (29,52 %). Nejvíce zastoupen byl kafr (51,76 %), *cis*- $\beta$ -ocimen (8,17 %), 3-oktanol acetát (7,71 %), *trans*- $\beta$ -ocimen (6,76 %),  $\gamma$ -terpinen (4,93 %), o-cymen (3,81 %), terpinolen (1,33 %), limonen (1,33 %), kamfen (1,19 %) a borneol (1,20 %).

Celkový obsah polyfenolů byl roven  $0,31 \pm 0,02 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{ml}^{-1}$ , což v přepočtu na gram rostliny odpovídá  $1,52 \pm 0,11 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ . Antioxidační aktivita činila  $417,56 \pm 32,84 \text{ } \mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}$  a procento zhášení radikálu ABTS<sup>•+</sup>  $88,99 \pm 7,00 \%$ .

Extrakt vykazoval slabou antimikrobiální aktivitu pouze vůči bakterii *Bacillus cereus*, ostatní testované mikroorganismy (*Escherichia coli* a *Candida glabrata*) byly vůči extraktu rezistentní.

Metoda využitá v experimentální části práce k zisku extraktu skýtá mnoho výhod, zejména je to pak jednoduchost a cenová dostupnost. Její asi největší limitací je čas potřebný pro zisk extraktu. Jako metoda je macerace schopná konkurovat většině jiných extrakčních metod, které sice zkrátí dobu potřebnou k extrakci pomocí vyšších teplot a tlaků, avšak často na úkor látek, které nejsou dostatečně tepelně odolné.

Výsledky této práce umožňují navázat dalšími stanoveními a optimalizacemi. Optimalizaci lze rozšířit o více hodnot jednotlivých faktorů, případně o další samotné faktory, např. extrakce sušených vs. čerstvých bylin, jemnější homogenizace materiálu aj. Dále by bylo možné optimalizaci rozšířit o sledování vlivu faktorů na potenciální antimikrobiální účinek, a rozšířit výběr testovaných mikroorganismů.

Každopádně získané výsledky potvrzují, že migrénovník obsahuje řadu zajímavých aromaticky aktivních látek, vykazuje antioxidační i antimikrobiální aktivitu a má tak dobrý

potenciál pro využití jako přírodní zdroj nutričně i sensoricky cenných látek např. do různých potravin a pochutin.

## 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 231/2012 ze dne 9. března 2012 o stanovení specifikace pro potravinářské přídatné látky uvedené v přílohách II a III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008. Úřední věstník Evropské unie L 83, 22. 3. 2012, 295 s. [online]. [cit. 2020-11-14]. Dostupné z <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/cs/TXT/?uri=CELEX%3A32012R0231>
- [2] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002 o stanovení obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanovení postupů týkajících se bezpečnosti potravin. Úřední věstník Evropské unie L 31, 1. 2. 2002, 24 s. [online]. [cit. 2020-11-15]. Dostupné z <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX%3A32002R0178>
- [3] Vyhláška č. 253/2018 Sb. ze dne 9. listopadu 2018 o požadavcích na extrakční rozpouštědla používaná při výrobě potravin. In: *Sbírka zákonů České republiky*, 2018, částka 128, s. 4593. [online]. [cit. 2020-11-15]. Dostupné z <https://www.psp.cz/sqw/sbirka.sqw?cz=253&r=2018>
- [4] KOSALEC, Ivan, Josipa CVEK a Siniša TOMIĆ. Contaminants of Medicinal Herbs and Herbal Products. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, [online]. 2009, **60**(4), 485-501 [cit. 2021-01-18]. ISSN 0004-1254. DOI: 10.2478/10004-1254-60-2009-2005. Dostupné z: <https://content.sciendo.com/view/journals/aiht/60/4/article-p485.xml?language=en>
- [5] FREITAS ARAUJO, Marcelo Gonzaga de a Tais MARIA. Microbial Quality of Medicinal Plant Materials. Latest Research into Quality Control. *InTech*, [online]. 2012, [cit. 2021-01-18]. ISBN 978-953-51-0868-9. DOI: 10.5772/51072. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/latest-research-into-quality-control/microbial-quality-of-medicinal-plant-materials>
- [6] BROWN, JOSEPH C. a XIUPING JIANG. Prevalence of Antibiotic-Resistant Bacteria in Herbal Products. *Journal of Food Protection*, [online]. 2008, 71(7), 1486-1490 [cit. 2021-01-18]. ISSN 0362-028X. DOI: 10.4315/0362-028X-71.7.1486. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18680952/>
- [7] VITULLO, M., G. RIPABELLI, I. FANELLI, M. TAMBURRO, S. DELFINE a M.L. SAMMARCO. Microbiological and toxicological quality of dried herbs. *Letters in Applied Microbiology*, [online]. 2011, **52**(6), 573-580 [cit. 2021-01-19]. ISSN 02668254. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03040.x. Dostupné z: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1472-765X.2011.03040.x>
- [8] MARTÍNEZ-GRACIÁ, Carmen, Carlos Alberto GONZÁLEZ-BERMÚDEZ, Ana María CABELLERO-VALCÁRCEL, Marina SANTAELLA-PASCUAL a Carmen FRONTELA-SASETA. Use of herbs and spices for food preservation: advantages and limitations. *Current Opinion in Food Science*, [online]. 2015, **6**, 38-43 [cit. 2021-01-17]. ISSN 22147993. DOI: 10.1016/j.cofs.2015.11.011. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221479931500140X>
- [9] PEREIRA, Eliana, Amílcar L. ANTONIO, João C.M. BARREIRA, Lillian BARROS, Albino BENTO a Isabel C.F.R. FERREIRA. Gamma irradiation as a practical

- alternative to preserve the chemical and bioactive wholesomeness of widely used aromatic plants. *Food Research International*, [online]. 2015, **67**(4), 338-348 [cit. 2021-01-19]. ISSN 09639969. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.11.047. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914007613>
- [10] SAGOO, S, C LITTLE, M GREENWOOD, V MITHANI, K GRANT, J MCLAUHLIN, E DEPINNA a E THRELFALL. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. *Food Microbiology*, [online]. 2009, **26**(1), 39-43 [cit. 2021-01-18]. ISSN 07400020. DOI: 10.1016/j.fm.2008.07.005. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19028303/>
- [11] SOSPEDRA, Isabel, Jose M. SORIANO a Jordi MAÑES. Assessment of the Microbiological Safety of Dried Spices and Herbs Commercialized in Spain. *Plant Foods for Human Nutrition*, [online]. 2010, **65**(4), 364-368 [cit. 2021-01-18]. ISSN 0921-9668. DOI: 10.1007/s11130-010-0186-0. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11130-010-0186-0>
- [12] Atanassova, M., Georgieva, S., & Ivancheva, K. Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology & Metallurgy*, [online]. 2011, **46**(1), 81-88 [cit. 2021-01-27]. Dostupné z: [https://dl.uctm.edu/journal/node/j2011-1/12\\_Maria\\_Atanassova.pdf](https://dl.uctm.edu/journal/node/j2011-1/12_Maria_Atanassova.pdf)
- [13] BURSOVÁ, Šárka, DUŠKOVÁ, Marta, NECIDOVÁ, Lenka, KARPÍŠKOVÁ Renáta a MYŠKOVÁ, Petra. *Mikrobiologické laboratorní metody*. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. [online]. 2014, [cit. 2020-05-12]. ISBN 978-80-7305-676-6. Dostupné z: [https://fvhe.vfu.cz/files/cela-skripta-bursova-a-kol\\_mlm-elektronicka-verze\\_upraveny-logolink.pdf](https://fvhe.vfu.cz/files/cela-skripta-bursova-a-kol_mlm-elektronicka-verze_upraveny-logolink.pdf)
- [14] KOPECKÁ, Jana a ROTKOVÁ, Gabriela. *Skripta ke cvičení: z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií*. 1. Brno: Masarykova univerzita. [online]. 2017, [cit. 2020-05-12]. ISBN 978-80-210-8787-3. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni\\_mikrobiologie/web/docs/Mikrobiologie.pdf](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/docs/Mikrobiologie.pdf)
- [15] LEDINA, Tijana, BULAJIĆ, Snežana a ĐORĐEVIĆ, Jasna. METHODS FOR THE ANTIBIOTIC RESISTANCE DETECTION IN MICROORGANISMS ISOLATED FROM FOOD. *BETTERIHAПCKИ ЖУРНАЛ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ*, [online]. 2018, **18**(1) [cit. 2020-05-13]. ISSN 2303-4475. DOI: 10.7251/VETJEN1801208L. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/325787620\\_METHODS\\_FOR\\_THE\\_ANTI\\_BIOTIC\\_RESISTANCE\\_DETECTION\\_IN\\_MICROORGANISMS\\_ISOLATED\\_FROM\\_FOOD](https://www.researchgate.net/publication/325787620_METHODS_FOR_THE_ANTI_BIOTIC_RESISTANCE_DETECTION_IN_MICROORGANISMS_ISOLATED_FROM_FOOD)
- [16] ÖZTAŞKIN, Necla, KAYA, Rüya, MARAŞ, Ahmet, ŞAHİN, Ertan, GÜLCİN, İlhami a GÖKSU, Süleyman. Synthesis and characterization of novel bromophenols: Determination of their anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities. *Bioorganic Chemistry*, [online]. 2019, **87**, 91-102 [cit. 2020-05-17]. ISSN 00452068. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.03.010. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206819301646>

- [17] PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ, H., TÁBORSKÁ, E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chem. listy*, [online]. 2004, 98, p. 174-179 [cit. 2020-05-17]. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004\\_04\\_03.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf)
- [18] AMORATI, Riccardo a VALGIMIGLI, Luca. Methods To Measure the Antioxidant Activity of Phytochemicals and Plant Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [online]. 2018, 66(13), 3324-3329 [cit. 2020-05-18]. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b01079. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/DOI/10.1021/acs.jafc.8b01079>
- [19] MSAGATI, A., TITUS A.M. Chemistry of Food Additives and Preservation. *Oxford: Wiley-Blackwell*. 2013, 1-2, 15-18 s. ISBN 978-1-118-27414-9.
- [20] LACHMAN, Jaromír a ŠULC, Miloslav. Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické listy*, [online]. 2007, 101, s. 584-591 [cit. 2021-01-15]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1776/1776>
- [21] SHAHIDI, F. Handbook of Antioxidants for Food Preservation. *Cambridge: Elsevier*. 2015, 514 s., ISBN: 978-1-7842-097-2.
- [22] Cadenas, E. and Packer, L. Handbook of Antioxidants. 2nd Edition, 2002, *Marcel Dekker, Inc.*, New York.
- [23] AZWANIDA, NN. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal and Aromatic Plants*, [online]. 2015, 04(03) [cit. 2021-06-01]. ISSN 21670412. DOI: 10.4172/2167-0412.1000196. Dostupné z: <https://www.longdom.org/open-access/a-review-on-the-extraction-methods-use-in-medicinal-plants-principle-strength-and-limitation-2167-0412-1000196.pdf>
- [24] WANG, Lijun, a WELLER, Curtis L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. [online]. 2006, 17(6), 300-312 [cit. 2021-05-31]. ISSN 09242244. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.12.004. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224405003559>
- [25] AMEER, Kashif, SHAHBAZ, Hafiz Muhammad a KWON, Joong-Ho. Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, [online]. 2017, 16(2), 295-315 [cit. 2021-05-31]. ISSN 15414337. DOI: 10.1111/1541-4337.12253. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12253>
- [26] ZHANG, Qing-Wen, LIN, Li-Gen a YE, Wen-Cai. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, [online]. 2018, 13(1) [cit. 2021-05-31]. ISSN 1749-8546. DOI: 10.1186/s13020-018-0177-x. Dostupné z: <https://cmjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13020-018-0177-x>
- [27] AZMIR, J., I.S.M. ZAIDUL, M.M. RAHMAN, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, [online]. 2013, 117(4), 426-436 [cit. 2021-05-31]. ISSN 02608774. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877413000277?via%3Dihub>

- [28] MOHAMMAD AZMIN, Siti Nuurul Huda, ABDUL MANAN, Zainuddin, WAN ALWI, Sharifah Rafidah, CHUA, Lee Suan, MUSTAFFA, Azizul Azri a YUNUS, Nor Alafiza. Herbal Processing and Extraction Technologies: *Separation and Purification Reviews*, [online]. 2016, **45**(4), 305-320 [cit. 2021-05-31]. ISSN 1542-2119. DOI: 10.1080/15422119.2016.1145395. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/toc/lSpr20/current>
- [29] BALOUIRI, Mounyr, SADIKI, Moulay a IBNSOUDA, Saad Koraichi. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, [online]. 2016, **6**(2), 71-79 [cit. 2021-01-23]. ISSN 20951779. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177915300150>
- [30] ČAKOVÁ, Adriana. *Suroviny na bázi stříbra pro kosmetické účely*. Brno, 2019. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jana Zemanová. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113970>
- [31] Guideline 2.1. — Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing. [online] [cit. 2020-05-13]. Dostupné z: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/GUIDE\\_2.1\\_ANTIMICROBIAL.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/GUIDE_2.1_ANTIMICROBIAL.pdf)
- [32] Karabin M., Dostálek P., Hofta P. PŘEHLED METOD PRO STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY V PIVOVARSTVÍ. *Chem. Listy*, [online]. 2006, **100**, 184-189 [cit. 2020-05-19]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006\\_03\\_184-189.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_03_184-189.pdf)
- [33] MILLER, Nicholas J., Catherine RICE-EVANS, Michael J. DAVIES, Vimala GOPINATHAN a Anthony MILNER. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clinical Science*, [online]. 1993, **84**(4), 407-412 [cit. 2020-05-19]. ISSN 0143-5221. DOI: 10.1042/cs0840407. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8482045/>
- [34] AMORATI, R. a L. VALGIMIGLI. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research*, [online]. 2015, **49**(5), 633-649 [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.3109/10715762.2014.996146. ISSN 1071-5762. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/DOI/full/10.3109/10715762.2014.996146>
- [35] ŠTÍPEK, Stanislav. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-716-9704-4
- [36] Folin, O.; Ciocalteu, V. Tyrosine and tryptophan determinations proteins *J. Biol. Chem*, [online]. 1927, **73**, 627 [cit. 2021-01-28]. Dostupné z: [https://developmentalbiology.wustl.edu/wp-content/uploads/2018/10/Folin\\_1927-2553row.pdf](https://developmentalbiology.wustl.edu/wp-content/uploads/2018/10/Folin_1927-2553row.pdf)
- [37] Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, [online]. 1999, **299**, 152-178 [cit. 2021-01-28]. DOI: 10.1016/S0076-

- 6879(99)99017-1. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687999990171>
- [38] Stevanato, R.; Fabris, S.; Momo, F. Enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *J. Agric. Food Chem.*, [online]. 2004, **52**, 6287-6293 [cit. 2021-01-28]. DOI: 10.1021/jf049898s. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf049898s>
- [39] HUANG, Dejian, Boxin OU, Ronald L. PRIOR, Vimala GOPINATHAN a Anthony MILNER. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [online]. 2005, **53**(6), 1841-1856 [cit. 2021-01-28]. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf030723c. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15769103/>
- [40] Apak, R., Capanoglu, E. & Shahidi, F. Measurement of antioxidant activity & capacity: Recent trends and applications. *John Wiley & Sons, Hoboken*. 2018, 352 s. ISBN: 978-1-119-13535-7.
- [41] CAMPBELL, William, David GAMMON, Peter SMITH, Meryl ABRAHAMS a Tertia PURVES. Composition and Antimalarial Activity in Vitro of the Essential Oil of *Tetradenia riparia*. *Planta Medica*, [online]. 1997, **63**(03), 270-272 [cit. 2021-01-26]. ISSN 0032-0943. DOI: 10.1055/s-2006-957672. Dostupné z: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-957672>
- [42] BLYTHE, Eugene K., Nurhayat TABANCA, Betul DEMIRCI a Paul E. KENDRA. Chemical Composition of Essential Oil From *Tetradenia riparia* and Its Attractant Activity for Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata*. *Natural Product Communications*, [online]. 2020, **15**(9) [cit. 2021-01-26]. ISSN 1934-578X. DOI: 10.1177/1934578X20953955. Dostupné z: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X20953955>
- [43] Cai, X., Mai, R., Zou, J. et al. Analysis of aroma-active compounds in three sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans*) cultivars by GC-olfactometry and GC-MS. *Journal of Zhejiang University Science* [online]. 2014, **15**, 638–648 [cit. 2021-02-07]. DOI: 10.1631/jzus.B1400058. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1631/jzus.B1400058>
- [44] Sonmezdag, A.S., Kelebek, H. & Selli, S. Characterization of aroma-active and phenolic profiles of wild thyme (*Thymus serpyllum*) by GC-MS-Olfactometry and LC-ESI-MS/MS. *Journal of Food Science and Technology*, [online]. 2016, **53**, 1957-1965 [cit. 2021-02-07]. DOI: 10.1007/s13197-015-2144-1, Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-015-2144-1>
- [45] HÖGNADÓTTIR, Áslaug a Russell L. ROUSEFF. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, [online]. 2003, **998**(1-2), 201-211 [cit. 2021-02-07]. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00524-7. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967303005247>
- [46] JAMES, A. T. a A. J. P. MARTIN. Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic



- acid. *Biochemical Journal*. [online]. 1952, **50**(5), 679-690 [cit. 2021-02-07]. ISSN 0306-3283. DOI: 10.1042/bj0500679. Dostupné z: <https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/50/5/679/47119/Gas-liquid-partition-chromatography-the-separation?redirectedFrom=fulltext>
- [47] SPARKMAN, O. David, Zelda PENTON a Fulton KITSON. Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. 2nd Edition. *Academic Press*, [online]. 2011, 632 s [cit. 2021-02-07]. ISBN 978-0-12-373628-4. DOI: 10.1016/C2009-0-17039-3. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/book/9780123736284/gas-chromatography-and-mass-spectrometry>
- [48] ARTHUR, Catherine L. a Janusz. PAWLISZYN. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, [online]. 1990, **62**(19), 2145-2148 [cit. 2021-02-07]. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac00218a019, Dostupné z: <https://pubs.acs.org/DOI/10.1021/ac00218a019>
- [49] LORD, Heather a Janusz PAWLISZYN. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A.*, [online]. 2000, **885**(1-2), 153-193 [cit. 2021-02-08]. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00535-5, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300005355?via%3Dihub>
- [50] ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A.*, [online]. 2000, **902**(1), 167-194 [cit. 2021-02-08]. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00934-1. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300009341?via%3Dihub>
- [51] SCHMIDT, Kamila a Ian PODMORE. Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer. *Journal of Biomarkers*. [online]. 2015, 1-16 [cit. 2021-02-09]. ISSN 2090-8660. DOI: 10.1155/2015/981458. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jbm/2015/981458/>
- [52] GROSS, Jürgen H. Mass spectrometry: a textbook. 2nd ed. Berlin: Springer. [online]. 2011, [cit. 2021-02-08]. ISBN 978-3-642-10709-2. DOI: 10.1007/978-3-642-10711-5. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1431/podzim2014/F7100/um/52107671/gross\\_mass-spectrometry\\_second-edition.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/podzim2014/F7100/um/52107671/gross_mass-spectrometry_second-edition.pdf)
- [53] ZAIKIN, V. G. Chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, [online]. 2011, **66**(11), 1090-1094 [cit. 2021-02-09]. ISSN 1061-9348. DOI: 10.1134/S1061934811110177. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1134/S1061934811110177>
- [54] EMWAS, Abdul-Hamid M., Zeyad A. AL-TALLA, Yang YANG a Najeh M. KHARBATIA. Gas Chromatography–Mass Spectrometry of Biofluids and Extracts. *Metabonomics*. 2015, New York, NY: Springer New York, 2015-1-27, 91-112. Methods in Molecular Biology. [online]. [cit. 2021-02-09]. ISBN 978-1-4939-2376-2. DOI: 10.1007/978-1-4939-2377-9\_8. Dostupné z: [https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-2377-9\\_8](https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-2377-9_8)
- [55] ZACHAŘ, P.; SÝKORA, D. Plynová chromatografie. [online]. [cit. 2021-02-09]. Dostupné z: [www.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf](http://www.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf)
- [56] Flame ionization detector (FID) [online]. [cit. 2021-02-09]. Dostupné z: <https://aavos.eu/glossary/flame-ionization-detector-fid/>

- [57] RAZAFINTSALAMA, V.E., S.T. RALAMBONIRINA RASOARIVELO, F. RANDRIAMIALINORO, L. RANARIVELO, S.R. RAKOTONANDRASANA, T. PETIT a S. SARTER. Antibacterial activities of fourteen medicinal plants from the endemic plant diversity of Madagascar. *South African Journal of Botany*, [online]. 2017, **112**, 303-306 [cit. 2021-01-19]. ISSN 02546299. DOI: 10.1016/j.sajb.2017.06.006. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629916340121>
- [58] VIEITEZ, I., L. MACEIRAS, I. JACHMANIÁN a S. ALBORÉS. Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, [online]. 2018, **133**, 58-64 [cit. 2021-01-19]. ISSN 08968446. DOI: 10.1016/j.supflu.2017.09.025. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844617305430>
- [59] ZAZHARSKYI, V. V., P. O. DAVYDENKO, O. M. KULISHENKO, I. V. BOROVIK a V. V. BRYGADYRENKO. Antimicrobial activity of 50 plant extracts. *Biosystems Diversity*, [online]. 2019, **27**(2), 163-169 [cit. 2021-01-19]. ISSN 2520-2529. DOI: 10.15421/011922. Dostupné z: <https://ecology.dp.ua/index.php/ECO/article/view/987>
- [60] SEWANI-RUSIKE, CR a M MAMMEN. Medicinal Plants Used as Home Remedies: A Family Survey by First Year Medical Students. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, [online]. 2014, **11**(5), 67-72 [cit. 2021-01-19]. ISSN 0189-6016. DOI: 10.4314/ajtcam.v11i5.11. Dostupné z: <https://www.ajol.info/index.php/ajtcam/article/view/109166>
- [61] NEGI, Pradeep Singh. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, [online]. 2012, **156**(1), 7-17 [cit. 2021-01-22]. ISSN 01681605. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160512001250>
- [62] ARSHAD, Muhammad Sajid a Syeda Ayesha BATOOL. Natural Antimicrobials, their Sources and Food Safety. *Food Additives, InTech*, [online]. 2017, [cit. 2021-01-22]. ISBN 978-953-51-3489-3. DOI: 10.5772/intechopen.70197. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/food-additives/natural-antimicrobials-their-sources-and-food-safety>
- [63] TAJKARIMI, M.M., S.A. IBRAHIM a D.O. CLIVER. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, [online]. 2010, **21**(9), 1199-1218 [cit. 2021-01-22]. ISSN 09567135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713510000459>
- [64] NIETO, Gema. Biological Activities of Three Essential Oils of the *Lamiaceae* Family. *Medicines*, [online]. 2017, **4**(3) [cit. 2021-01-22]. ISSN 2305-6320. DOI: 10.3390/medicines4030063. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28930277/>
- [65] RIBEIRO-SANTOS, Regiane, Mariana ANDRADE, Ana SANCHES-SILVA a Nathália Ramos DE MELO. Essential Oils for Food Application: Natural Substances with Established Biological Activities. *Food and Bioprocess Technology*, [online]. 2018, **11**(1), 43-71 [cit. 2021-01-22]. ISSN 1935-5130. DOI: 10.1007/s11947-017-1948-6. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-017-1948-6>
- [66] ESPITIA, Paula Judith Perez, Nilda de Fátima Ferreira SOARES, Laura Costa Moreira BOTTI, Nathália Ramos de MELO, Olinto Liparini PEREIRA a Washington Azevêdo

- da SILVA. Assessment of the efficiency of essential oils in the preservation of postharvest papaya in an antimicrobial packaging system. *Brazilian Journal of Food Technol.*, [online]. 2012, **15**(4), 333-342 [cit. 2021-01-24]. ISSN 1981-6723. DOI: 10.1590/S1981-67232012005000027. Dostupné z: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1981-67232012000400005&lng=en&tlng=en](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232012000400005&lng=en&tlng=en)
- [67] AGUILAR-GONZÁLEZ, Ana Elena, Enrique PALOU a Aurelio LÓPEZ-MALO. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. [online]. 2015, **32**, 181-185 [cit. 2021-01-24]. ISSN 14668564. DOI: 10.1016/j.ifset.2015.09.003. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856415001654>
- [68] HYUN, Jeong-Eun, Young-Min BAE, Jae-Hyun YOON a Sun-Young LEE. Preservative effectiveness of essential oils in vapor phase combined with modified atmosphere packaging against spoilage bacteria on fresh cabbage. *Food Control*, [online]. 2015, **51**, 307-313 [cit. 2021-01-24]. ISSN 09567135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.11.030. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514006732>
- [69] GÓMEZ-ESTACA, J., A. LÓPEZ DE LACEY, M.E. LÓPEZ-CABALLERO, M.C. GÓMEZ-GUILLÉN a P. MONTERO. Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, [online]. 2010, **27**(7), 889-896 [cit. 2021-01-24]. ISSN 07400020. DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.012. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002010001036>
- [70] SALGADO, Pablo R., M. Elvira LÓPEZ-CABALLERO, M. Carmen GÓMEZ-GUILLÉN, Adriana N. MAURI a M. Pilar MONTERO. Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids*, [online]. 2013, **33**(1), 74-84 [cit. 2021-01-24]. ISSN 0268005X. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2013.02.008. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X1300057X>
- [71] PETRETTO, Giacomo Luigi, Francesco FANCELLO, Severino ZARA, et al. Antimicrobial Activity against Beneficial Microorganisms and Chemical Composition of Essential Oil of *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* Grown in Sardinia. *Journal of Food Science*, [online]. 2014, **79**(3), M369-M377 [cit. 2021-01-24]. ISSN 00221147. DOI: 10.1111/1750-3841.12343. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24506214/>
- [72] FERNÁNDEZ-PAN, Idoya, Ximena CARRIÓN-GRANDA a Juan I. MATÉ. Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. *Food Control*, [online]. 2014, **36**(1), 69-75 [cit. 2021-01-24]. ISSN 09567135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.07.032. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513003800>
- [73] GAIO, Iloir, Adriana G. SAGGIORATO, Helen TREICHEL, et al. Antibacterial activity of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) in Italian-type sausage. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, [online]. 2015, **10**(4), 323-329 [cit.

- 2021-01-24]. ISSN 1661-5751. DOI: 10.1007/s00003-015-0936-x. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00003-015-0936-x>
- [74] OTERO, Verónica, Raquel BECERRIL, Jesús A. SANTOS, José M. RODRÍGUEZ-CALLEJA, Cristina NERÍN a María-Luisa GARCÍA-LÓPEZ. Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157: H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). *Food Control*, [online]. 2014, **42**, 296-302 [cit. 2021-01-24]. ISSN 09567135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.02.022. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514000917>
- [75] LIU, Deng-Cheng, Rwei-Tsz TSAU, Yen-Chih LIN, Shyh-Shyan JAN a Fa-Jui TAN. Effect of various levels of rosemary or Chinese mahogany on the quality of fresh chicken sausage during refrigerated storage. *Food Chemistry*, [online]. 2009, **117**(1), 106-113 [cit. 2021-01-22]. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.03.083. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609004063>
- [76] BOUARAB CHIBANE, Lynda, Pascal DEGRAEVE, Hicham FERHOUT, Jalloul BOUJILA a Nadia OULAHAL. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, [online]. 2019, **99**(4), 1457-1474 [cit. 2021-01-23]. ISSN 00225142. DOI: 10.1002/jsfa.9357. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.9357>
- [77] GOMEZ-ESTACA, J, P MONTERO, B GIMENEZ a M GOMEZGUILLEN. Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, [online]. 2007, **105**(2), 511-520 [cit. 2021-01-23]. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.04.006. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607003421>
- [78] KRAŚNIEWSKA, Karolina, Małgorzata GNIEWOSZ, Alicja SYNOWIEC, Jarosław L. PRZYBYŁ, Katarzyna BĄCZEK a Zenon WĘGLARZ. The use of pullulan coating enriched with plant extracts from *Satureja hortensis* L. to maintain pepper and apple quality and safety. *Postharvest Biology and Technology*, [online]. 2014, **90**, 63-72 [cit. 2021-01-23]. ISSN 09255214. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2013.12.010. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092552141300361X?via%3Dihub>
- [79] TESFAY, S.Z., L.S. MAGWAZA, A. MDITSHWA a N. MBILI. Carboxyl methylcellulose (CMC) incorporated with moringa leaf and seed extracts as new postharvest organic edible coating for avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Acta Horticulturae*, [online]. 2018, (1201), 161-168 [cit. 2021-01-23]. ISSN 0567-7572. DOI: 10.17660/ActaHortic.2018.1201.22. Dostupné z: [https://www.actahort.org/books/1201/1201\\_22.htm](https://www.actahort.org/books/1201/1201_22.htm)
- [80] HERMAN, Anna, Andrzej Przemysław HERMAN, Beata Wanda DOMAGALSKA a Andrzej MŁYNARCZYK. Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. *Indian Journal of Microbiology*, [online]. 2013, **53**(2), 232-237 [cit. 2020-11-19]. ISSN 0046-8991. DOI: 10.1007/s12088-012-0329-0. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12088-012-0329-0>
- [81] RIBEIRO, Ana, Marilene ESTANQUEIRO, M. OLIVEIRA a José SOUSA LOBO. Main Benefits and Applicability of Plant Extracts in Skin Care Products. *Cosmetics*,

- [online]. 2015, **2**(2), 48-65 [cit. 2020-11-19]. ISSN 2079-9284. DOI: 10.3390/cosmetics2020048. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2079-9284/2/2/48>
- [82] ABURJAI, Talal a Feda M. NATSHEH. Plants used in cosmetics. *Phytotherapy Research*, [online]. 2003, **17**(9), 987-1000 [cit. 2020-11-19]. ISSN 0951-418X. DOI: 10.1002/ptr.1363. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.1363>
- [83] RAJA, R. Ramasubramania. Medicinally Potential Plants of *Labiatae (Lamiaceae)* Family: An Overview. *Research Journal of Medicinal Plant*, [online]. 2012, **6**(3), 203-213. ISSN 18193455. [cit. 2020-11-15]. DOI: 10.3923/rjmp.2012.203.213. Dostupné z: <https://scialert.net/abstract/?doi=rjmp.2012.203.213>
- [84] MAMADALIEVA, Nilufar, Davlat AKRAMOV, Elisa OVIDI, Antonio TIEZZI, Lutfun NAHAR, Shahnoz AZIMOVA a Satyajit SARKER. Aromatic Medicinal Plants of the *Lamiaceae* Family from Uzbekistan: Ethnopharmacology, Essential Oils Composition, and Biological Activities. *Medicines*, [online]. 2017, **4**(1) [cit. 2020-11-15]. ISSN 2305-6320. DOI: 10.3390/medicines4010008. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5597069/>
- [85] FATIH, Brahmi, Khodir MADANI, Mohamed CHIBANE, Pierre DUEZ, Lutfun NAHAR, Shahnoz AZIMOVA a Satyajit SARKER. Chemical Composition and Biological Activities of *Mentha* Species: Ethnopharmacology, Essential Oils Composition, and Biological Activities. *Aromatic and Medicinal Plants - Back to Nature. InTech*, [online]. 2017, **4**(1) [cit. 2020-11-15]. ISBN 978-953-51-2977-6. ISSN 2305-6320. DOI: 10.5772/67291. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/aromatic-and-medicinal-plants-back-to-nature/chemical-composition-and-biological-activities-of-mentha-species>
- [86] Lamiaceae Martinov. *Plants of the World Online* [Online]. 2021, The Royal Botanic Gardens, Kew [cit. 2021-01-25]. Dostupné z <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30000097-2>
- [87] TAMOKOU, J.D.D., A.T. MBAVENG a V. KUETE. Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, [online]. 2017, 207-237 [cit. 2021-01-25]. ISBN 9780128092866. DOI: 10.1016/B978-0-12-809286-6.00008-X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012809286600008X>
- [88] ZIAKOVÁ, Alica a Eva BRANDŠTETEROVÁ. Validation of HPLC Determination of Phenolic Acids Present in Some *Lamiaceae* Family Plants. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, [online]. 2007, **26**(3), 443-453 [cit. 2021-01-24]. ISSN 1082-6076. DOI: 10.1081/JLC-120017181. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/JLC-120017181>
- [89] Směrnice Komise 2010/67/EU ze dne 20. října 2010 o stanovení specifických kritérií pro čistotu potravinářských přídatných látek jiných než barviva a náhradní sladidla. Úřední věstník Evropské unie L 277, 21. 10. 2010, 17-26 s. [online]. [cit. 2020-11-14]. Dostupné z <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32010L0067>

- [90] KOT, Barbara, Kamila WIERZCHOWSKA, Małgorzata PIECHOTA, Paweł CZERNIEWICZ a Grzegorz CHRZANOWSKI. Antimicrobial activity of five essential oils from *Lamiaceae* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Natural Product Research*, [online]. 2019, **33**(24), 3587-3591 [cit. 2021-01-24]. ISSN 1478-6419. DOI: 10.1080/14786419.2018.1486314. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2018.1486314>
- [91] KARPÍŃSKI, Tomasz M. Essential Oils of *Lamiaceae* Family Plants as Antifungals. *Biomolecules*, [online]. 2020, **10**(1) [cit. 2021-01-24]. ISSN 2218-273X. DOI: 10.3390/biom10010103. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/1/103>
- [92] *Tetradenia* Benth. *Plants of the World Online* [online]. 2020, The Royal Botanic Gardens, Kew [cit. 2020-11-01]. Dostupné z: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:21261-1>
- [93] Phillipson P. B. & Steyn C. F. *Tetradenia* (*Lamiaceae*) in Africa: new species and new combinations. *Adansonia*, [online]. 2008, sér. 3, **30**(1): 177-196 [cit. 2020-11-05]. Dostupné z: <https://sciencepress.mnhn.fr/sites/default/files/articles/pdf/a2008n1a13.pdf>
- [94] CODD, L. E. *Lamiaceae*. Flora of Southern Africa. South Africa: *Department of Agricultural Technical Services*, [online]. 1985, **28**(4), 240 [cit. 2020-10-31]. Dostupné z: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/51375236#page/129/mode/1up>
- [95] CODD, L.E. The genus *Tetradenia* Benth. (*Lamiaceae*): I. African species. *Bothalia*, [online]. 1983, **14**(2), 177-183 [cit. 2020-11-06]. ISSN 2311-9284. DOI: 10.4102/abc.v14i2.1156. Dostupné z: <https://journals.abcjournal.aosis.co.za/index.php/abc/article/view/1156>
- [96] Costa G. M., Endo E. H., Cortez D. A. G., Ueda-Nakamura T., Nakamura C. V., Filho B. P. D. Effect of plant extracts on planktonic growth and biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, [online]. 2015, **4**(6), 908-917 [cit. 2021-01-28]. Dostupné z: <https://www.ijcmas.com/vol-4-6/Gustavo%20Meireles%20Costa,%20et%20al.pdf>
- [97] KHUZWAYO, Joyce Khethiwe. Essential oil composition and some biological activities of *Tetradenia riparia*. Jižní Afrika. Dizertační práce. UNIVERSITY OF ZULULAND. Vedoucí práce Prof. A. O. Oyedeji. [online]. 2011, [cit. 2021-01-28]. Dostupné z: <http://uzspace.unizulu.ac.za/handle/10530/1094?show=full>
- [98] NJAU, Efrem-Fred, Jane-Mary ALCORN, Joram BUZA, Manuel CHIRINO-TREJO a Patrick NDAKIDEMI. Antimicrobial Activity of *Tetradenia riparia* (Hochst.) *Lamiaceae*, a Medicinal Plant from Tanzania. *European Journal of Medicinal Plants*, [online]. 2014, **4**(12), 1462-1478 [cit. 2021-01-29]. ISSN 22310894. DOI: 10.9734/EJMP/2014/11370. Dostupné z: <http://www.sciencedomain.org/abstract/5686>
- [99] MELO, Nathalya Isabel de, Carlos Eduardo de CARVALHO, Leticia FRACAROLLI, Wilson Roberto CUNHA, Rodrigo Cassio Sola VENEZIANI, Carlos Henrique Gomes MARTINS a Antônio Eduardo Miller CROTTI. Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. (*Lamiaceae*) against cariogenic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, [online]. 2015, **46**(2), 519-525 [cit. 2021-01-29]. ISSN 1678-4405. DOI: 10.1590/S1517-838246246220140649. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26273268/>

- [100] FERNANDEZ, Ana Claudia A. M., Maurício F. ROSA, Carla M. M. FERNANDEZ, et al. Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Extract and Fractions of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd (*Lamiaceae*) Leaves from Brazil. *Current Microbiology*, [online]. 2017, **74**(12), 1453-1460 [cit. 2021-01-29]. ISSN 0343-8651. DOI: 10.1007/s00284-017-1340-9. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28840299/>
- [101] KAKANDE, Taufik, Yonah BATUNGE, Emmanuel EILU, et al. Prevalence of Dermatophytosis and Antifungal Activity of Ethanolic Crude Leaf Extract of *Tetradenia riparia* against Dermatophytes Isolated from Patients Attending Kampala International University Teaching Hospital, Uganda. *Dermatology Research and Practice*, [online]. 2019, 1-13 [cit. 2021-01-29]. ISSN 1687-6105. DOI: 10.1155/2019/9328621. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/drpr/2019/9328621/>
- [102] Ngule, M. E. et. al. Preliminary Phytochemical and Antibacterial Screening of Fresh *Tetradenia riparia* Leaves Water Extract against Selected Pathogenic Microorganisms. *International Journal of Bioassay*, [online]. 2014, **3**(10), 3413-3418 [cit. 2021-01-29]. ISSN 2278-778X. Dostupné z: <https://www.ijbio.com/articles/preliminary-phytochemical-and-antibacterial-screening-of-fresh-tetradenia-riparialeaves-water-extract-against-selected-p.pdf>
- [103] GAZIM, Zilda Cristiani, Ana Carolina L. AMORIM, Ana Maria C. HOVELL, Claudia Moraes REZENDE, Izalina Ansilheiro NASCIMENTO, Gilberto Alves FERREIRA a Diógenes Aparício Garcia CORTEZ. Seasonal Variation, Chemical Composition, and Analgesic and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from Leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in Southern Brazil. *Molecules*, [online]. 2010, **15**(8), 5509-5524 [cit. 2021-01-26]. ISSN 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules15085509. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/15/8/5509>
- [104] BALDIN, Vanessa Pietrowski, Regiane Bertin de Lima SCODRO, Mariana Aparecida LOPES-ORTIZ, et al. Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of essential oil and 6,7-dehydroroyleanone isolated from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd (*Lamiaceae*). *Phytomedicine*, [online]. 2018, **47**, 34-39 [cit. 2021-01-30]. ISSN 09447113. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.04.043. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711318301430>
- [105] M. H. Ndiku and M. C. Ngule. Antibacterial activity and Preliminary phytochemical screening of hot-aqua extract of *Tetradenia riparia* leaves. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, [online]. 2014, **5**(8), 3780-3786 [cit. 2021-01-30]. ISSN 0976-7126. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/265598480\\_Antibacterial\\_activity\\_and\\_Preliminary\\_phytochemical\\_screening\\_of\\_hot-aqua\\_extract\\_of\\_Tetradenia\\_riparia\\_leaves](https://www.researchgate.net/publication/265598480_Antibacterial_activity_and_Preliminary_phytochemical_screening_of_hot-aqua_extract_of_Tetradenia_riparia_leaves)
- [106] Amoo, S.O., Aremu, A.O., Moyo, M. et al. Antioxidant and acetylcholinesterase-inhibitory properties of long-term stored medicinal plants. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, [online]. 2012, **12**(87) [cit. 2021-01-30]. DOI: 10.1186/1472-6882-12-87. Dostupné z: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-12-87>



- [107] Singleton VL, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, [online]. 1965, **16**(3), 144-158 [cit. 2021-01-31]. Dostupné z: <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144.article-info>
- [108] Viuda-Martos M, Navajas YR, Zapata ES, Fernández-lópez J, Pérez-Álvarez JA. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*, [online]. 2010, **25**(1), 13-19 [cit. 2021-01-31]. ISSN 08825734. DOI: 10.1002/ffj.1951. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ffj.1951>
- [109] ELAKA, Isaac Kaba, Paulin Mutwale KAPEPULA, Nadège Kabamba NGOMBE, et al. Microscopic Features, Antioxidant and Antibacterial Capacities of Plants of the Congolese Cosmetopoeia, Raw Materials of Cosmeceuticals. *Journal of Biosciences and Medicines*, [online]. 2020, **8**(9), 149-166 [cit. 2021-01-31]. ISSN 2327-5081. DOI: 10.4236/jbm.2020.89013. Dostupné z: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=102910>
- [110] PubChem. National Library of Medicine. [online]. [cit. 2021-01-26]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [111] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. 2. vyd., ve VP 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-71-6.
- [112] DROBNIEWSKI, F A. Bacillus cereus and related species. *Clinical Microbiology Reviews*, [online]. 1993, **6**(4), 324-338 [cit. 2021-06-17]. ISSN 0893-8512. DOI: 10.1128/CMR.6.4.324. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.6.4.324>
- [113] EL-ARABI, Tarek F. a Mansel W. GRIFFITHS. Bacillus cereus. *Foodborne Infections and Intoxications*, [online]. Elsevier, 2013, 401-407 [cit. 2021-06-17]. ISBN 9780124160415. DOI: 10.1016/B978-0-12-416041-5.00029-9. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124160415000299?via%3Dihub>
- [114] FIDEL, Paul L., Jose A. VAZQUEZ a Jack D. SOBEL. Candida glabrata: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to C. albicans. *Clinical Microbiology Reviews*, [online]. 1999, **12**(1), 80-96 [cit. 2021-06-17]. ISSN 0893-8512. DOI: 10.1128/CMR.12.1.80. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.12.1.80>
- [115] RODRIGUES, C. F., S. SILVA a M. HENRIQUES. *Candida glabrata: a review of its features and resistance*, [online]. 2014, **33**(5), 673-688 [cit. 2021-06-17]. ISSN 0934-9723. DOI: 10.1007/s10096-013-2009-3. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-013-2009-3>
- [116] KUMAR, Kundan, Fizza ASKARI, Mahima SAHU a Rupinder KAUR. Candida glabrata: A Lot More Than Meets the Eye. *Microorganisms*, [online]. 2019, **7**(2), [cit. 2021-06-17]. ISSN 2076-2607. DOI: 10.3390/microorganisms7020039. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/2/39>
- [117] MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ, 2006. *Kompendium statistického zpracování dat: metody a řešené úlohy*. Vyd. 2., přeprac. a rozš. Praha: Academia, 982 s. ISBN 80-200-1396-2.

- [118] DUNKEL, Florence, David WEAVER, Luc Van PUYVELDE, James L. CUSKER a Aussumani SERUGEND. POPULATION SUPPRESSION EFFECTS OF RWANDAN MEDICINAL PLANT, TETRADENIA RIPARIA (HOCHST.) CODD (LAMIACEAE) ON STORED GRAIN AND BEAN INSECTS. *Entomology Research Laboratory*, [online]. 1992, 1609-1618 [cit. 2021-06-21]. Montana State University. Dostupné z: <http://bru.gmprc.ksu.edu/proj/iwcspp/pdf2/5/1609.pdf>

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAL	Aromatické aktivní látky
ABTS	2,2.-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
ANOVA	Analýza rozptylu (Analysis of Variance)
Benth.	Zkratka používaná při citaci botanického jména, odvozeno od botanika George Bentham (1800-1884)
BHT	Butylhydroxytoluen (Butylhydroxytoluene)
Codd.	Zkratka používaná při citaci botanického jména, odvozeno od botanika Leslie Codd (1908-1999)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
DPPH	Difenylpikrylhydrazyl (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl)
DPPH-H	Difenylpikrylhydrazin
EC <sub>50</sub>	Koncentrace extraktu (Extract Concentration)
ESR	Elektronová spinová rezonance (Electron Spin Resonance)
F-C	Folin-Ciocalteu
FRAP	Antioxidační potenciál redukce železnatých kationtů (Ferric Reducing Antioxidant Potential)
GAE	Ekvivalent kyseliny gallové (Gallic Acid Equivalent)
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GC-FID	Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (Gas Chromatography-Flame Ionization Detector)
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HS	Prostor nad vzorkem (Head Space)
IC <sub>50</sub>	Inhibiční koncentrace (Inhibition Concentration)
MAE	Mikrovlnná extrakce (Microwave-Assisted Extraction)
MIC	Minimální inhibiční koncentrace (Minimal Inhibition Concentration)
<i>m/z</i>	Poměr hmotnosti k náboji (Mass to Charge Ratio)
N.E.Br	Zkratka používaná při citaci botanického jména, odvozeno od Nicholas Edward Brown (1849-1934)
NMR	Nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance)
ORAC	Kapacita absorpce kyslíkových radikálů (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
PSE	Vysokotlaká extrakce rozpouštědel (Pressurised Solvent Extraction)
ROO·	Peroxylový radikál (Peroxyl Radical)
RNS	Dusíkový radikál (Reactive Nitrogen Species)
ROS	Kyslíkové radikály (Reactive Oxygen Species)
SD	Směrodatná odchylka
SF	Superkritická kapalina (Supercritical Fluid)
SFE	Superkritická fluidní extrakce (Supercritical Fluid Extraction)
SPME	Mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Micro Extraction)
spp.	Druhy (Species)

TEAC	Antioxidační kapacita Troloxu (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity)
TLC	Tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
TPC	Celkový obsah polyfenolů (Total Phenolic Content)
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová kyselina
UAE	Ultrazvuková extrakce (Ultrasound-Assisted Extraction)
UV	Ultrafialové (Ultraviolet)
VIS	Viditelné (Visible)

## 8. PŘÍLOHY

Tabulka 17.: Naměřené hodnoty celkových polyfenolů při optimalizaci doby extrakce

Doba extrakce (min)	extrakt A			extrakt B			extrakt A			extrakt B		
	c (mg <sub>GEA</sub> ·ml <sup>-1</sup> )			c (mg <sub>GEA</sub> ·ml <sup>-1</sup> )			c (mg <sub>GEA</sub> ·g <sup>-1</sup> )			c (mg <sub>GEA</sub> ·g <sup>-1</sup> )		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
20	0,05	0,06	0,05	0,07	0,06	0,07	0,51	0,57	0,49	0,65	0,61	0,68
40	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,09	0,89	0,9	0,83	0,9	0,92	0,92
60	0,04	0,05	0,04	0,08	0,08	0,09	0,38	0,46	0,41	0,76	0,82	0,86

Tabulka 18.: Naměřené hodnoty celkových polyfenolů při optimalizaci koncentrace rozpouštědla

Koncentrace rozpouštědla (%)	extrakt A			extrakt B			extrakt A			extrakt B		
	c (mg <sub>GEA</sub> ·ml <sup>-1</sup> )			c (mg <sub>GEA</sub> ·ml <sup>-1</sup> )			c (mg <sub>GEA</sub> ·g <sup>-1</sup> )			c (mg <sub>GEA</sub> ·g <sup>-1</sup> )		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	0,02	0,02	0,02	0,05	0,05	0,06	0,22	0,23	0,24	0,54	0,54	0,63
40	0,05	0,05	0,05	0,14	0,13	0,13	0,49	0,49	0,51	1,36	1,33	1,32
80	0,06	0,06	0,06	0,15	0,14	0,14	0,58	0,6	0,59	1,45	1,36	1,37

Tabulka 19.: Naměřené hodnoty celkových polyfenolů při optimalizaci poměru navážka/rozpuštědlo

Navážka/rozpuštědlo	extrakt A			extrakt B			extrakt A			extrakt B		
	c (mg <sub>GEA</sub> ·ml <sup>-1</sup> )			c (mg <sub>GEA</sub> ·ml <sup>-1</sup> )			c (mg <sub>GEA</sub> ·g <sup>-1</sup> )			c (mg <sub>GEA</sub> ·g <sup>-1</sup> )		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1:10	0,11	0,1	0,13	0,13	0,1	0,1	1,07	1,03	1,27	1,27	1,05	0,96
1:5	0,23	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	1,15	1,11	1,1	1,1	1,12	1,09
1:3,33	0,29	0,3	0,28	0,3	0,31	0,31	0,96	1,01	0,95	1,01	1,03	1,04

Tabulka 20.: Naměřené hodnoty celkových polyfenolů při optimalizaci teploty

Teplota (°C)	extrakt A			extrakt B			extrakt A			extrakt B		
	c (mg <sub>GEA</sub> ·ml <sup>-1</sup> )			c (mg <sub>GEA</sub> ·ml <sup>-1</sup> )			c (mg <sub>GEA</sub> ·g <sup>-1</sup> )			c (mg <sub>GEA</sub> ·g <sup>-1</sup> )		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
20	0,11	0,12	0,13	0,09	0,11	0,12	1,14	1,2	1,27	0,92	1,07	1,17
40	0,23	0,25	0,25	0,25	0,26	0,26	2,31	2,49	2,49	2,49	2,56	2,65
60	0,58	0,64	0,64	0,64	0,51	0,64	5,82	6,4	6,43	6,43	5,06	6,45

Tabulka 21.: Naměřené hodnoty celkových polyfenolů u optimálního extraktu

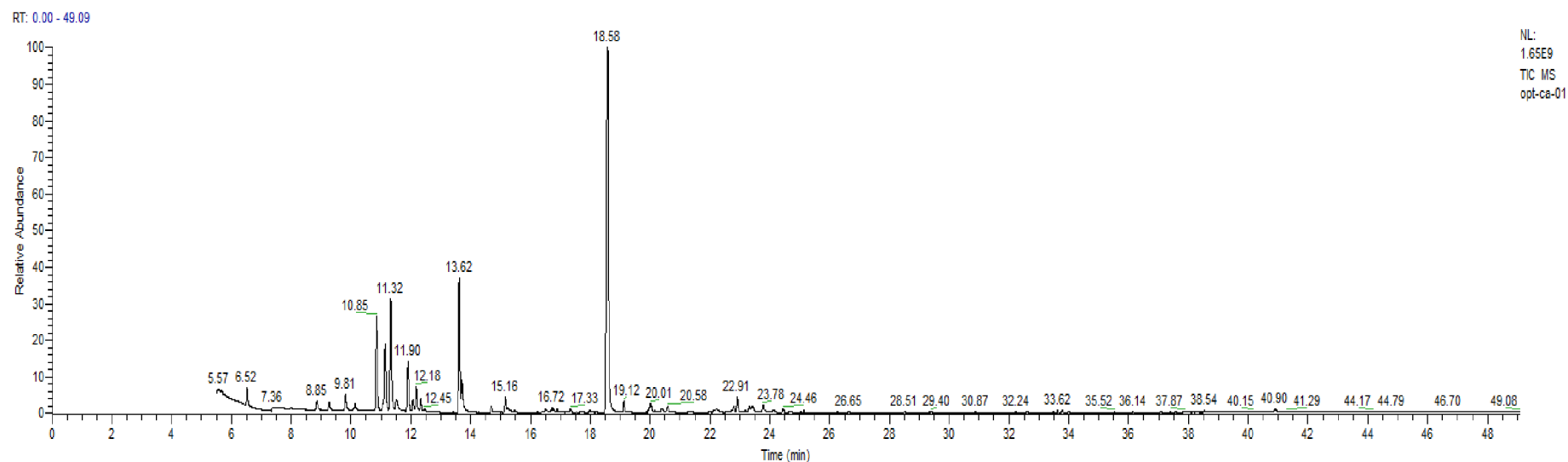
Extrakt	c (mg <sub>GEA</sub> ·ml <sup>-1</sup> )			c (mg <sub>GEA</sub> ·g <sup>-1</sup> )		
	1	2	3	1	2	3
1	0,33	0,32	0,32	1,64	1,6	1,61
2	0,29	0,29	0,27	1,45	1,45	1,33
3	0,33	0,32	0,3	1,64	1,6	1,49

Tabulka 22.: Naměřené hodnoty antioxidační aktivity a vypočtené zhášení radikálu ABTS<sup>•+</sup>

Extrakt	Opakování	c ( $\mu\text{g}_{\text{TEAC}}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Zhášení radikálu ABTS <sup>•+</sup> (%)
1	a	430	91,64
	b	446,2	95,08
2	a	448,5	95,57
	b	405,4	86,39
3	a	415,4	88,52
	b	360	76,72

C:\Vitova\Data\Cakovalopt-ca-01

05/18/21 12:47:54



Obrázek 44.: Ukázka chromatogramu těkavých látek optimálního extraktu migrénovníku (*Tetradenia* spp.), identifikace na základě retenčních časů viz Tabulka 13.