A. ÚVOD

Člověk už na nejnižším stupni svého vývoje zjistil, že rostliny mohou sloužit nejen jako potrava, ale mnohé z nich jsou vhodné k léčbě chorob, jiné jsou zdraví škodlivé a některými je možno se i otrávit. Tyto poznatky byly předávány po tisíce let z generace na generaci. Bohužel s nástupem moderní techniky, rozvojem chemického průmyslu a rozšiřující se výrobou syntetických léků bylo rostlinné lékařství postupně vytlačováno moderní medicínou. Začátkem našeho století se ale zpětně dospělo k tomu, že léčba bylinami má své opodstatnění. Existuje mnoho vědeckých analýz, které umožňují izolovat z rostlin účinné látky a pojmenovat je podle jejich působení, a také zároveň studie ukazují, že tyto látky dosahují léčivých účinků u určitých onemocnění. Dnes už jsou léčivé rostliny nenahraditelnými surovinami při výrobě léků.

Mezi jednu z nejznámějších a nejdéle používaných léčivých bylin patří šalvěj lékařská *(Salvia officinalis)*. Její název je odvozen z latinského slova „*salvare*“ - spasit, vyléčit. Šalvěj byla slavnou léčivou rostlinou už u našich předků. Rčení, které vzniklo okolo roku 1300, říká: „Proč by měl člověk zemřít, když v zahradě roste šalvěj?“ Už samotný název vyjadřuje vysoké ocenění, které má tato rostlina od nepaměti[1]. Mimo její léčebné účinky se už od starověku hojně využívá jako běžné koření. Do střední Evropy se šalvěj dostala až v 9. století. V 16. století se pomocí ní stavělo krvácení z ran, používala se při křečích, třesu rukou a dokonce prý usnadňovala i početí dítěte[2]. Dnes už je šalvěj lékařská prozkoumána mnohem podrobněji a je známá především díky silným protizánětlivým, desinfekčním a antioxidačním účinkům. Silice získaná destilací z listů šalvěje má také svůj průmyslový význam, a to v potravinářství a kosmetice.

Diplomová práce je zaměřená na analýzu dvou nejvýznamnějších biologicky aktivních fenolických kyselin v šalvěji lékařské, a to kyseliny kávové a kyseliny rozmarýnové, které se v této bylině vyskytují v největším množství. Tyto látky jsou významné nejen z hlediska biologických účinků na lidský organismus, protože vykazují silné antioxidační, antibakteriální, antivirotické účinky a podporují léčbu různých nemocí, ale i z hlediska obranné funkce u rostlin, které chrání např. proti patogenům. Metoda vysoko-účinné kapalinové chromatografie (HPLC) je jedna z nejvýhodnějších a nejpoužívanějších technik pro analýzu kyseliny kávové a rozmarýnové v rostlinné matrici. Nevyžaduje derivatizaci ani složitou úpravu vzorku. Vzhledem k tomu, že fenolické kyseliny jsou schopny absorpce

záření a navíc, jsou to látky elektroaktivní, které se oxidují při velice nízkých potenciálech, je možné s výhodou využít kromě UV/VIS detekce ještě citlivější, elektrochemickou detekci.

Cílem diplomové práce je podat ucelený přehled o vlastnostech, účincích a o metodách stanovení kyseliny kávové a rozmarýnové. Metodou HPLC se simultánním záznamem UV/VIS a elektrochemické detekce dokázat přítomnost těchto fenolických kyselin a následně stanovit a navzájem porovnat jejich obsah ve vybraných vzorcích šalvěje, které budou podrobeny třem typům extrakce.

B. TEORETICKÁ ČÁST

1. Charakteristika a výskyt šalvěje lékařské

Šalvěj lékařská, lidově nazývána babské ucho, koníčky, smrtky, je u nás nejznámější a nejčastěji se vyskytující bylina z rodu Salvia. Je to vytrvalý, 1m vysoký, stálozelený polokeř. V létě kvete modrofialovými květy. Tato rostlina má silně aromatické oválné listy, které hýří směsí fialové, červené a šedé barvy. Listy mají jemnou texturu a silně svíravě nahořklou chuť[3].

Šalvěj pochází z jižní Evropy, kde se volně vyskytuje na suchých slunných stráních a skalách. Hojně roste v balkánské oblasti, ve velkém se pěstuje například v Řecku a Chorvatsku. U nás roste nejčastěji na zahradách. Není náročná na zeminu, roste i na suchých, chudých, nejlépe vápencových půdách. Sbírá se především list a nať[3].

2. Účinky šalvěje lékařské

Šalvěj lékařská se může užívat jak vnitřně tak zevně. Vnitřně se používá k uklidnění poruch zažívacího ústrojí (působí proti plynatosti**,** stimuluje trávení a funkci žlučníku, urychluje léčbu žaludečních a střevních katarů a otrav jídlem), působí proti nadměrnému pocení, které doprovází např. tuberkulózu či neurózu apod. Jsou známé její protihlístové účinky a snižuje sekreci žláz včetně sekrece mléka. Mnohem častěji se šalvěj užívá zevně, protože se vyznačuje silnými antioxidačními, desinfekčními, antibakteriálními, antivirotickými a protizánětlivými účinky. Působí proti mykóze a plísňovým onemocněním kůže, užívá se jako desinfekční prostředek ve formě kloktadla při zánětech a poraněních dutiny ústní, po zubolékařských zákrocích a jako podpůrné léčivo při bolestech v krku a nemocech z nachlazení. Pro svůj protizánětlivý a antimykotický účinek se používá také k přípravě obkladů při zánětech, k vymývání zanícených ran a výplachům při výtoku. Díky jejímu antibiotickému účinku se užívá při onemocnění močových cest a při gynekologických zánětech. Z natě se destiluje silice (Oleum salviae), která má stejné použití[4,5,6,7].

Extrakt z listů při pokusech na zvířatech prokázal snížení krevního tlaku, fungicidní, spasmolytický a antivirotický účinek - poslední dva účinky byly nalezeny i u silice. Kyselina rozmarýnová působí antioxidačně a protizánětlivě, třísloviny svíravě[8].

U silice ze šalvěje lékařské, pěstované v jižní Brazílii, jejíž složení bylo stanoveno pomocí GC-MS analýzy, byla prokázána významná bakteriostatická a baktericidní aktivita proti *Bacillus cereus, B. megatherium, B. subtilis, Aeromonas hydrophila, A. sobria*

a *Klebsiella oxytoca*. Polyfenoly (flavonoidy a fenolické kyseliny) byly podrobeny třem typům *in vitro* testů na antioxidační aktivitu (DPPH test, superoxid anion radikál-zhášecí test, fosfomolybdenová metoda). Mezi flavovoidy klesala účinnost v řadě: 6-hydroxyluteolin 7-glykosid > luteolin-7-glykosid > luteolin-3'-glykosid > apigenin glykosid. Z fenolických kyselin v provedených testech dosáhly nejvyšších hodnot antioxidační aktivity kyselina rozmarýnová a kyselina kávová[8].

V roce 2004 David Fuller provedl klinickou studii, která potvrdila pozitivní účinek za studena lisovaného oleje ze šalvěje lékařské na léčbu slabého až středního stupně Alzheimerovy choroby. Tento olej pomáhá zlepšovat paměť, která je u pacientů postupně napadena a navíc má vliv na jejich postoje a chování. Studie byla provedena 30 pacientech. Polovině pacientům bylo podáváno denně 60 kapek oleje ze šalvěje lékařské. Druhé polovině bylo podáváno placebo (slunečnicový olej). U pacientů, kteří užívali šalvěj, se zlepšily testy na Alzheimerovu chorobu o 26%. U pacientů s placebem se stav zhoršil o 22%[8,9].

Šalvěj má také negativní účinky na lidský organismus, a to kvůli thujonu, který je obsažen v silici. Ten ve vyšších dávkách a dlouhodobém použití vyvolává křeče podobné křečím epileptickým, nervozitu, zvracení, třes, pocit tepla, tachykardii i poškození ledvin. Je uváděn také jako abortifaciens (látka vyvolávající potrat) v nejnižší aktivní dávce 120 $mg.kg^{-1}$. Byl prokázán jeho denegerativní vliv na mozkové buňky. Orální letální dávka (smrtící dávka) LD_{50} u potkanů je 192 mg/kg váhy (Margaria, 1963) a 500 $mg.kg^{-1}$ tělesné hmotnosti (NLM, 1997). Intravenózní letální dávka LD_{50} u králíka je 0,031 $mg.kg^{-1}$ tělesné hmotnosti (NLM, 1997)[8,10].

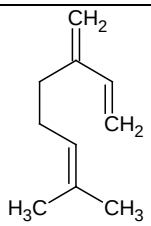
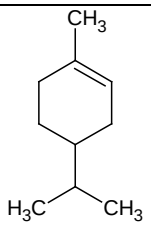
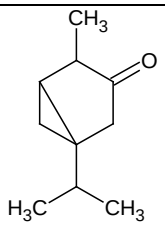
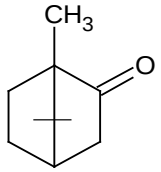
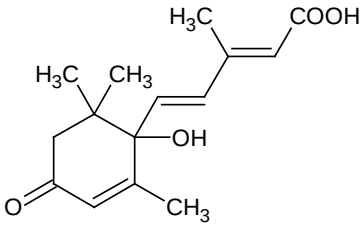
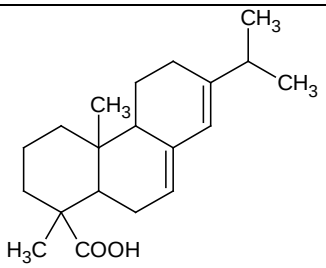
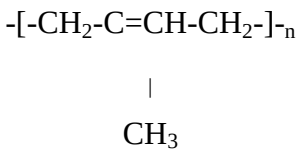
3. Hlavní obsahové látky

Šalvěj lékařská obsahuje značné množství silice složené z terpenických složek: 1,8 cineol (6–13%), kafr (3–9%), α-thujon a β-thujon (8–43%), dále humulen, karyofylen, borneol, linalool; kondenzované i hydrolyzovatelné třísloviny (3–8%); flavonoidy (glykosidy luteolinu, glykosidy apigeninu); diterpenické hořčiny (karnosol, 12-methylether deoxykarnosolu, rosmarol, 7-methylether rosmarolu); triterpeny, fenolické kyseliny (k. rozmarýnová, k. kávová, k. chlorogenová, k. ferulová); estrogenní hormony a amid kyseliny nikotinové[3,8].

3.1. Terpeny

Terpeny jsou přírodní uhlovodíky, které jsou zahrnuty do rozsáhlé skupiny rostlinných látek-isoprenoidů. Terpeny jsou odvozeny od isoprenu (2-metyl-1,3-butadien) a zahrnují vedle primárních metabolitů také více než 25000 sekundárních metabolitů. Jsou tedy metabolity některých rostlin, stromů, zejména jehličnanů. Stále není známo, proč rostliny tyto látky produkují. Předpokládá se, že je ochraňují před hmyzem a cizopasníky. Také působí jako chuťová bariéra pro býložravce[11,12,13].

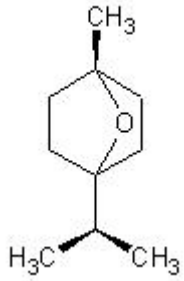
Terpeny jsou z chemického hlediska systematicky rozděleny na monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, tritepreny, tetraterpeny, sesterpeny a polyterpeny (Obr. 1). Tato označení vycházejí ze sloučenin, které obsahují dvě isoprenové jednotky (monoterpeny mají dvě isoprenové jednotky, diterpeny čtyři isoprenové jednotky atd.)[13]

Monoterpeny	**Monocyklické monoterpneny**	**Bicyklické monoterpeny**
 Myrcen	 Limonen	 Thujon  Kafr
Sekviterpeny	**Diterpeny**	**Polyterpeny**
 Kyselina abscisová	 Kyselina abietová	 Přírodní kaučuk

Obr. 1 Přehled jednotlivých typů terpenů[13]

V šalvěji lékařské se z terpenických látek vyskytuje v největším množství 1,8-cineol a thujon. 1,8-cineol*(1,3,3-trimethyl-2-oxobicyclo [2,2,2] oktan)*, $C_{10}H_{18}O$, Obr. 2, je známý jako eukalyptol a řadí se do skupiny eukalyptových olejů. Jeho molární hmotnost činí 154,25 $g.mol^{-1}$, hustota 0,92 $g.cm^{-3}$, bod varu je 1,5 °C (274,66 K)[14]. Je hlavní složkou

medicinálních silic, blokuje metabolizmus kyseliny arachidonové, a tím znemožňuje produkci cytokinů. Silice obsahující cineol se používají také jako součást dezinfekčních mýdel, inhalačních sprejů, ústních vod, kloktadel, zubních past, chladivých mastí a gelů. Využití nalézají i při léčbě lupénky. Izolovaný cineol, který dává eukalyptové silici její charakteristické aroma, je látka s mnoha dalšími zajímavými vlastnostmi. Má mírný baktericidní účinek, působí insekticidně a repelentně. Má výraznou příjemnou vůni, je málo toxický, rychle proniká tkáněmi lidského těla a funguje jako dobré rozpouštědlo pro mnoho dalších chemických látek. Díky těmto vlastnostem má široké použití i v chemickém a kosmetickém průmyslu (např. součást deodorantů, anthelmintik, insekticidů, repelentů, surfaktantů). Také se může použít jako aditivum do motorových benzínů jako prevence oddělování zbytků vody z benzínu[15].

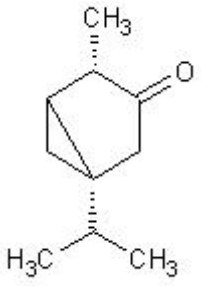


Obr. 2 1,8-cineol

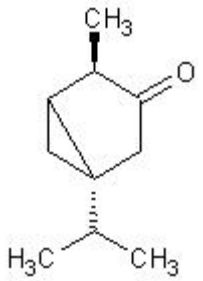
Thujon *(1-isopropyl-4-methylbicyklo [3,1,0] hexan-3-on,* ($C_{10}H_{16}O$) je v šalvěji lékařské přirozeně se vyskytující se bicyklický terpenoidní keton. Jeho molární hmotnost činí 152,23 g.mol^{-1}, hustota 0,92 g.cm^{-3}, bod varu 201 °C. Není rozpustný ve vodě, rozpouští se v ethanolu. Jsou známé jeho dvě stereoizomerní formy α(+)thujon a β(-)thujon (Obr. 3, Obr. 4). *α*-thujon je důležitou součástí mnoha silic a ve vysoké koncentraci se nachází zejména v některých druzích pelyňku a šalvěje lékařské. β-thujon lze převést na *α*-thujon a oba stereoizomery mohou být velmi dobře využity jako snadno dostupné suroviny pro enantiomerní syntézy mnoha nových látek[16].

Farmakologické a toxikologické vlastnosti α –thujonu: *α*-thujon má antinociceptivní (snižuje odezvu na bolestivý podnět), insekticidní a antihelmicidní vlastnosti, je neurotoxický. Akutní toxicita *α*-thujonu jej řadí mezi vysoce toxické látky a je v RTECS registru jedovatých látek. Je pětkrát toxičtější než β-thujon. Thujon aplikovaný nitrožilně způsobuje klonicko-tonické křeče. Opakované dávky vyvolávají trvalé poškození CNS.

α-thujon je v organizmu myši, potkana i člověka rychle metabolizován jaterním mikrozomálním oxygenázovým systémem cytochromu P-450 na hydroxylované deriváty. Hlavním metabolitem je 7-hydroxy-*α*-thujon vedle dalších pěti minoritních hydroxy-derivátů thujonu. Právě tento metabolit je přítomen v mozku ve vyšší koncentraci než *α-thujon* a mohl by být zodpovědný za jeho psychotropní účinky. Psychoaktivní vlastnosti látky byli studovány v souvislosti s intoxikací označovanou jako absintismus, vznikající následkem abúzu k alkoholickému nápoji - absintu. Kontakt pokožky se silicí, obsahující thujon, způsobuje její podráždění, svědění až ekzémy. Po požití mohou vznikat zdravotní problémy doprovázené zvracením, průjmem, hypertenzí, tachykardií, krvácením žaludeční sliznice, bronchopneumonií, edémem plic, klonicko-tonickými křečemi a degenerativními změnami na játrech a ledvinách[16,17,18,19]



Obr. 3 α(+)thujon



Obr. 4 β(-)thujon

3.2. Polyfenoly

Polyfenoly jsou organické sloučeniny přírodního původu, přítomny v každé vyšší rostlině a v každém jejím orgánu jako sekundární metabolity. Do skupiny polyfenolů řadíme flavonoidy, fenolické kyseliny a ligniny. Tyto látky jsou silné přírodní antioxidanty a jejich zdrojem je zelenina, ovoce, vláknina, čaje, aromatické a léčivé rostliny. Z hlediska chemické struktury obsahují jedno nebo více aromatických jader, substituovaných hydroxylovými skupinami, tudíž jsou tyto hydroxyly kyselé povahy a tato vlastnost je dodnes využívaná pro jejich detekci, izolaci a chemickou transformaci. Obzvlášť pokud jsou hydroxyly navázané v poloze *ortho-* nebo *para-*, jsou zdrojem mnohých redoxních reakcí a základem pro tvorbu oligomerů, polymerů či konjugátů s jinými molekulami, např. taniny, ligniny. Obecně platí, čím více fenolických skupin polyfenoly mají, tím vyšší je jejich antiradikálová aktivita. Proto, aby polyfenoly měly antioxidační účinek, musí mít alespoň dvě fenolické skupiny[20,21,22].

Jak již bylo řečeno, polyfenoly řadíme mezi přírodní antioxidanty. Antioxidanty jsou molekuly, které se vyskytují ve všech částech rostlin. Ovlivňují jejich vlastnosti, barvu, vůni a chuť. Jejich důležitost spočívá v jejich schopnosti eliminovat negativní účinky volných radikálů v krvi. Zde také příznivě ovlivňují procesy regulace tlaku krve a hladiny glukosy. Jsou známé jejich protinádorové, antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Za určitých podmínek mají i prooxidační vlastnosti, které můžeme pozorovat např. u kyseliny kávové. Antioxidační schopnost závisí v největší míře na struktuře molekuly (poloha, počet hydroxylových skupin a typy přítomných substituentů). Jedinou nevýhodou přírodních antioxidantů je jejich nízká odolnost vůči kyslíku, světlu, vysokým teplotám a sušení. Obsah antioxidantů v potravinách se výrazně snižuje délkou jejich skladování[23]. Existuje mnoho metod měření antioxidační aktivity látek. Každá metoda používá jiný typ radikálu a jeho genezi. Jejich rozmanitost vyplývá ze skutečnosti, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Nejčastěji jde o přímou reakci s radikály (zhášení, vychytávání) nebo reakci s přechodnými kovy. Avšak většinou se jedná o spektrofotometrické metody, mezi které patří ABTS, DPPH, DMPD-test a také elektrochemické metody[22,24,25].

Volné radikály mohou v organismu způsobit oxidativní stres, který vzniká u rostlin působením stresových faktorů, např. útokem patogenů, přítomností herbicidů, chladem, teplem, ledem, atd. Je charakteristický prudkou tvorbou velkého množství aktivních forem kyslíku (AFK), které narušují buněčnou homeostázu, jejich koncentrace vzroste v buňce až trojnásobně a dochází k porušení rovnováhy mezi produkcí a odbouráváním AFK. Volné radikály se také podílejí na vzniku a progresi vážných onemocnění (kardiovaskulární, neurodegenerativní nemoci, rakovina), poškozují DNA, lipidy a proteiny. Zanikají převážně interakcí s přírodními i syntetickými antioxidanty. Nejdůležitější jsou reaktivní kyslíkové částice (ROS), ke kterým patří hydroxylové radikály, superoxidové anion- radikály, peroxid vodíku a další peroxidy, singletový kyslík a ozon. Podobnou roli mají reaktivní dusíkové částice (RNS), mezi které patří nitroxidové radikály, oxid dusnatý, aminové radikály a další[20,21,24,26,27,28,29].

Polyfenoly u člověka a živočichů inhibují lipoperoxidaci (neenzymovou nespecifickou peroxidaci nenasycených mastných kyselin), a tím chrání organismus před rozvojem aterosklerózy. Inhibují vazbu kancerogenů na DNA, chelatují přechodné kovy a tím tlumí oxidační stres. Indukují účinky některých enzymů. Člověk ve své stravě přijímá denně až 1 g polyfenolů, což je mnohem vyšší množství, než např. denní příjem antioxidačních vitamínů,

jako jsou tokoferoly, karoteny nebo askorbová kyselina. Hlavním místem resorpce polyfenolů je tlusté a tenké střevo, u nápojů byla také zjištěna částečná resorpce v dutině ústní. Z trávicího traktu jsou následně metabolizovány enzymy, přítomnými v tkáních člověka[20,21,22 ,30].

U rostlin mají polyfenoly hlavní funkci stavební, strukturní a ochrannou (chrání rostliny před chladem, mrazem, slunečním zářením, proti vysoušení, škůdcům či mechanických poškozením). Vědci uvádějí, že zhruba 40 % veškerého organicky vázaného uhlíku v biosféře tvoří fenolické látky[31].

3.2.1. Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny patří mezi přírodní antioxidanty, které mají významný vliv na lidské zdraví. Studiemi bylo prokázáno, že antioxidační aktivita těchto látek je mnohem vyšší, než účinek antioxidačních vitamínů, a to z důvodů přítomnosti reaktivních hydroxy-substituentů, navázaných na aromatickém jádře. Jsou schopné zničit ROS a elektrofily, zastavit nitrosaci a chelatovat ionty kovů, jsou schopné tzv. autooxidace a modulují určité aktivity buněčných enzymů. Mají významný vliv na barvu, chuť, kvalitu, nutriční vlastnosti potravin a podporují dozrávání ovoce. Tyto kyseliny tvoří zhruba třetinu celkového dietního příjmu polyfenolů[20,21,32,33,34].

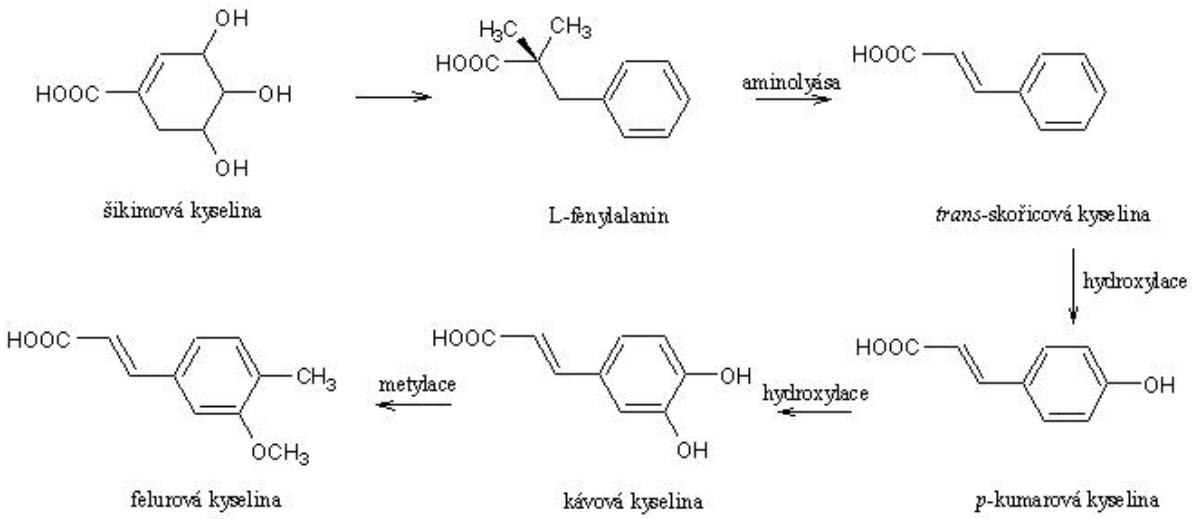
V rostlinných materiálech se volně fenolické kyseliny vyskytují jen zřídka. Většinou jsou vázané ve formě esterů, etherů nebo jsou součástí organických molekul, jako např. kyselina maleinová nebo vinná. Ve vysokých koncentracích mohou reagovat s proteiny, sacharidy a minerály. Vydatným zdrojem fenolických kyselin jsou různé druhy ovoce, zeleniny, čaj, káva, koření, vláknina atd.. Zde je můžeme nalézt v kořenech, listech, stopkách a dokonce i v semenech[34].

Fenolické kyseliny jsou rozděleny do dvou skupin: deriváty benzoové kyseliny, které jsou v potravě člověka zastoupeny spíše jako složky komplexních struktur, např.ve formě hydrolyzovatelných taninů (gallotanin v čaji) a deriváty skořicové kyseliny (*p*-kumarová, kávová, chlorogenová, ferulová a sinapová kyselina). Tyto kyseliny jsou většinou ve formě glykosylovaných derivátů nebo jako estery kyseliny chinové, šikimové nebo vinné. V naší potravě se častěji vyskytují kyseliny hydroxyskořicové, z nichž nejrozšířenější je kávová kyselina. Její obsah činí až 75% celkového obsahu hydroxyskořicových kyselin v ovoci[21,32,33,35].

Šalvěj lékařská obsahuje z fenolických kyselin největší množství kyseliny kávové a jejich derivátů (kyselina chlorogenová, rozmarýnová, ferulová a jiné). Celkový přehled o výskytu těchto kyselin a zároveň flavonoidů v různých druzích šalvěje podává práce Y. Lua. a Y.L Fooa[36].

Biosyntéza fenolických kyselin

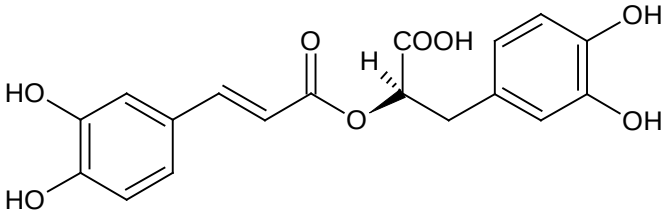
Klíčové sloučeniny k biosyntéze fenolických kyselin jsou hydroxyderiváty skořicové kyseliny (Obr. 5 Biosyntéza fenolických kyselin). Vše začíná šikimovou kyselinou, která indukuje metabolismus fenylalaninu. Fenylalanin je aminolyásou převeden na *trans*-skořicovou kyselinu, následnou hydroxylací v poloze *para* aromatického jádra dochází ke vzniku 4-hydroxyskořicové kyseliny nebo *p*-kumarové kyseliny. Další hydroxylací ve třetí poloze aromatického jádra vzniká kávová kyselina. Metylací kávové kyseliny v poloze *ortho* vzniká ferulová kyselina[37].



Obr. 5 Biosyntéza fenolických kyselin[37]

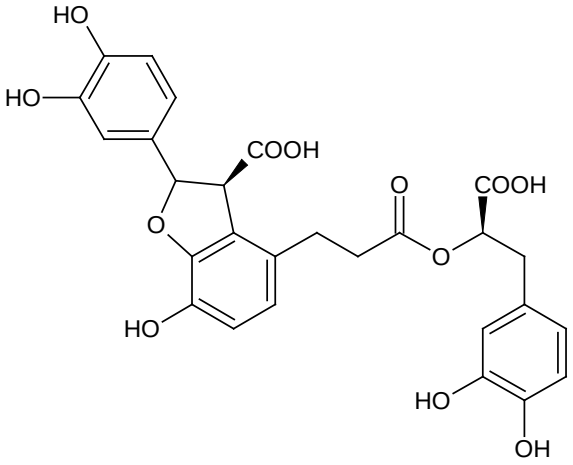
3.2.1.1. Rozmarýnová kyselina

ester kávové kyseliny a kyseliny 3,4-dihydrofenylmléčné

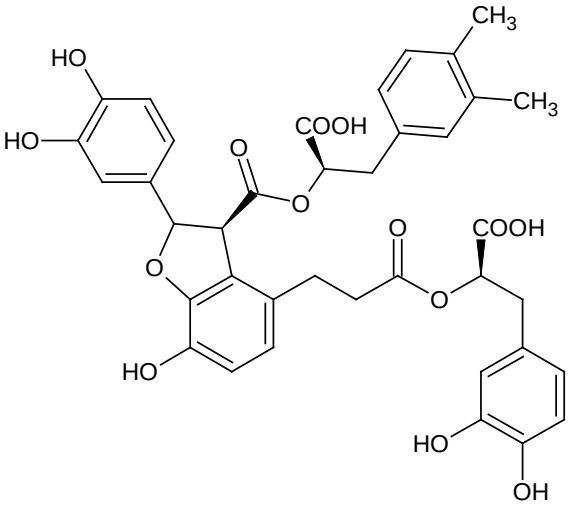


Obr.6 Rozmarýnová kyselina

Rozmarýnová kyselina, $C_{18}H_{16}O_8$, Obr.6, je přírodní polyfenolická karboxylová kyselina se silnými antioxidačními, protizánětlivými a antimikrobiálními účinky. Její molární hmotnost činí 360,31 $g.mol^{-1}$, bod varu 171-175 °C. Je to červeno-oranžový prášek, lehce rozpustný ve vodě a výborně rozpustný v organických rozpouštědlech. Vyskytuje se v čeledi Hluchavkovitých *(Lamiaceae),* a to nejčastěji v rozmarýnu, dále pak v šalvěji, oregánu, majoránce, tymiánu, mátě a v asijské zelenině perille, jejíž extrakty se používají na konzervaci jídel v Japonsku. Tato kyselina je syntetizována z aminokyseliny- fenylalaninu a thyrozinu. Rozmarýnová kyselina má také své přirozeně vyskytující se deriváty, a to kyselinu lithospermovou (Obr. 7), vzniklou konjugací kávové a rozmarýnové kyseliny. Vyskytuje se ve dvou stereoizomerních formách, z nich (-) lithospermová kyselina má protirakovinotvorný účinek. Druhým derivátem je dimer kyseliny rozmarýnové, a to kyselina lithospermová B (Obr. 8)[38,39,40,41].



Obr. 7 Lithospermová kyselina[41]



Obr. 8 Lithospermová kyselina B[41]

3.2.1.1.1. Biologické účinky

Antioxidační aktivita rozmarýnové kyseliny je mnohem silnější než u vitaminu E. Působí proti poškození buněk volnými radikály, a tím snižuje riziko vzniku rakoviny a arterioskleróz. Byly prokázány její adstringentní (stahující), antioxidativní, protizánětlivé, antimutagenní, antibakteriální a antivirové vlastnosti. Antivirové vlastnosti jsou využívané k léčení oparů. Při této léčbě se rozmarýnová kyselina obohacuje o extrakt z meduňky lékařské. Protizánětlivé vlastnosti jsou základem inhibice enzymů lipogenásy a cyklooxygenásy. Také chrání buňky proti rakovině a přispívá k antioxidačním vlastnostem rostlin, používaných v kosmetickém průmyslu. Byl prokázán pozitivní vedlejší účinek při orálním požití kyseliny rozmarýnové na alergické astma. Jiná studie prokázala potlačení zánětu synoviálních blan u myší (tyto blány tvoří tuhé vazivo v kloubních pouzdrech), což může být prospěšné pro léčbu revmatické artritidy. Na rozdíl od antihistaminů, rozmarýnová kyselina chrání proti aktivaci imunitních buněk, které mohou způsobovat otoky. Jsou známé její léčebné účinky proti vředům, kataraktu (šedému zákalu), průduškovému astma, rakovině a revmatické artritidě[41].

3.2.1.1.2. Funkce rozmarýnové kyseliny u rostlin

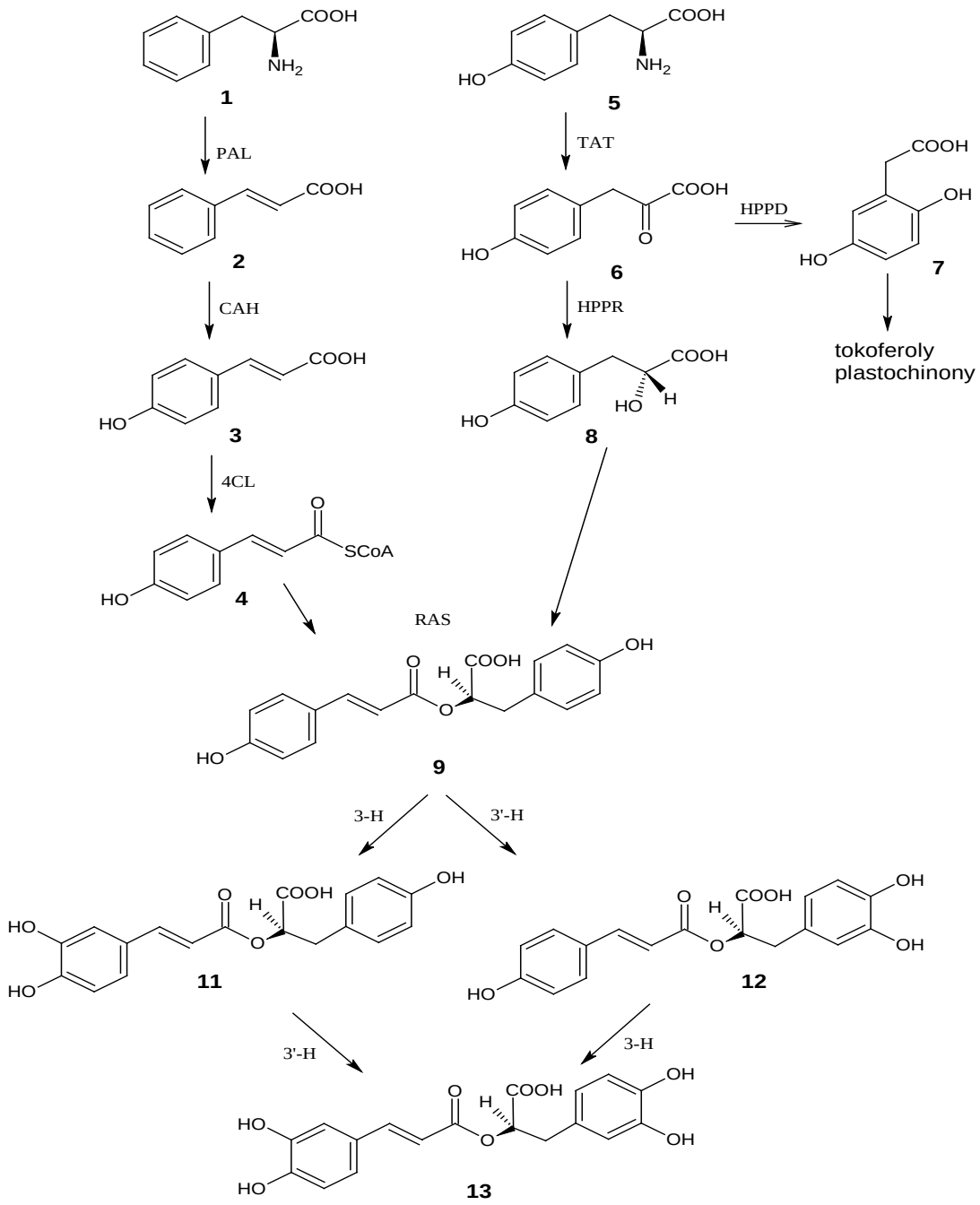
U rostlin má kyselina rozmarýnová hlavní funkci obrannou. Chrání je vůči patogenům a býložravcům. Velmi snadno se kumuluje v různých buněčných kulturách a v některých případech je zde zastoupena v mnohem vyšších koncentracích než v rostlině samotné[41].

3.2.1.1.3. Biosyntéza

Na Obr. 9 je vyobrazeno schéma biosyntézy rozmarýnové kyseliny. Prvním prekursorem je α-fenylalanin **1.** V přítomnosti enzymu PAL dochází k jeho deaminaci na *trans* skořicovou kyselinu **2**. Následnou hydroxylací *trans* skořicové kyseliny v poloze *ortho* vzniká působením cytochromu P450-trans-cinamát-4-monooxygenásy kyselina 4-kumarová **3**, která reaguje s enzymem 4CL za vzniku 4-kumaroyl CoA **4**.

Druhým prekursorem je α -tyrosin **5**. V přítomnosti enzymu TAT a 2-oxoglutarátu proběhne transaminace, jejíž výsledkem je kyselina 4-hydroxyfenylpyrohroznová **6**. Tato kyselina se může působením HPPD přeměnit na kyselinu homogentisovou **7** a dále na esenciální tokoferoly a plastochinony. Nebo může reagovat s HPPR za vzniku pravotočivé kyseliny 4-hydroxyfenyloctové **8**. Spojením produktů **4** a **8** za přítomnosti enzymu RAS

vznikne kyselina 4-kumaroyl-4´fenyloctová **9**. Tato kyselina je následně hydrolyzována v poloze 3 a 3´ aromatického jádra a rozpadá se na dva meziprodukty: kyselinu kafeoyl-4´-hydroxyfenyloctovou **10** a kyselinu 4-kumaroyl-3,4´-dihydroxyfenyl octovou **11**. Další hydroxylací meziproduktu **10** v poloze 3´ aromatického jádra a meziproduktu **11** v poloze 3 aromatického jádra a jejich spojením vzniká rozmarýnová kyselina **12**(cit.[41]).



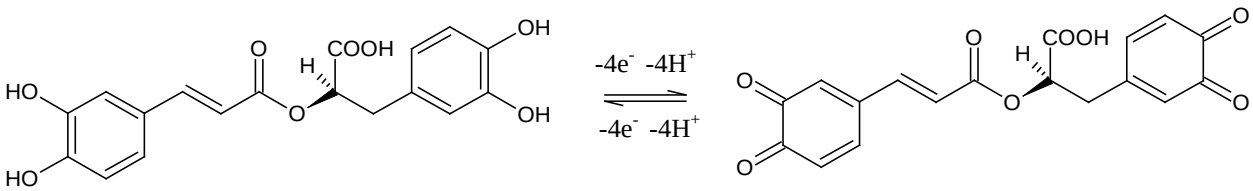
Obr. 9 Biosyntéza rozmarýnové kyseliny[41]

3.2.1.1.4. Metabolismus

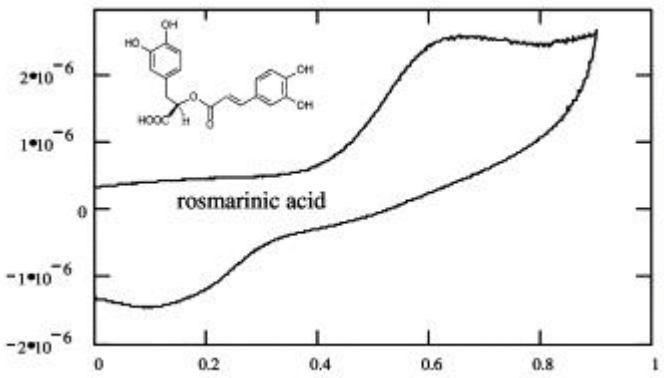
Metabolismus kyseliny rozmarýnové, popř. dalších derivátů kávové kyseliny, není dodnes zcela objasněn. Předpokládá se, že může docházet k jejich aktivaci štěpením esterových vazeb a následnému uvolnění kávové kyseliny[42].

3.2.1.1.5. Elektrochemické vlastnosti

Kyselina rozmarýnová patří mezi elektroaktivní látky. Na Obr. 10 je vyobrazeno schéma oxidace a redukce kyseliny rozmarýnové. K oxidaci dochází při potenciále +620 mV a k redukci při potenciále +130 mV (vs.Ag/AgCl), viz. Obr. 11. Za nízkou hodnotu potenciálu oxidační píku jsou zodpovědné hydroxy skupiny v poloze *ortho* na aromatických jádrech[43].



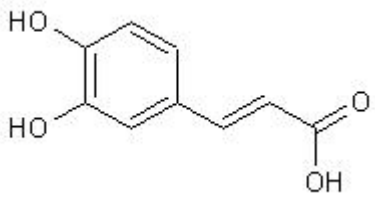
Obr. 10 Oxidace a redukce k. rozmarýnové



Obr. 11 Cyklický voltamogram k. rozmarýnové[43]

3.2.1.2. Kávová kyselina

(kyselina 3,4-dihydroxyskořicová)

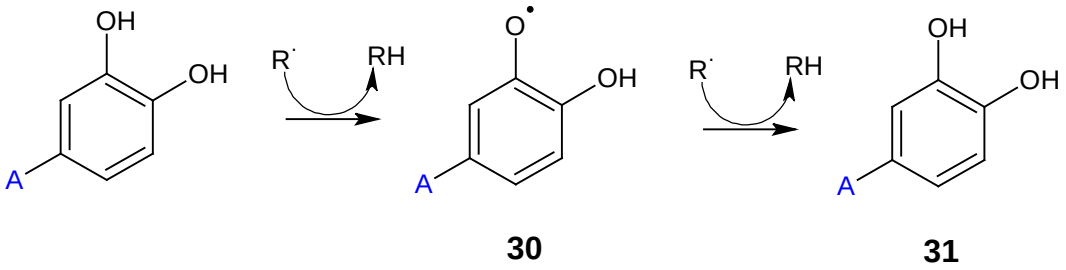


Obr. 12 Kávová kyselina

Kávová kyselina, $C_9H_8O_4$, Obr. 12, je hydroxyderivát skořicové kyseliny. Její molární hmotnost činí 180,16 $g.mol^{-1}$, bod varu 223-225 °C, hustota 1,48 $g.cm^{-3}$, je rozpustná v horké vodě a v alkoholu. Z fyzikálního hlediska se vyskytuje ve formě žlutých krystalků. V přírodě ji můžeme nalézt jak volně, tak ve formě derivátů. Nejčastěji je obsažena v rostlinách ve formě esterů, v nichž se váží karboxylem na hydroxylové skupiny organických kyselin nebo sacharidů. Dále pak v kávových zrnech, bramborách, rýži, obilí, zelenině atd. Kávovou kyselinu řadíme do skupiny přírodních *in vitro* antioxidantů a tudíž přispívá k prevenci proti kardiovaskulárním nemocem a rakovině. Jsou známé její protizánětlivé, protirakovinné a antimetastatické účinky[25,29,30,31,44].

3.2.1.2.1. Biologické účinky

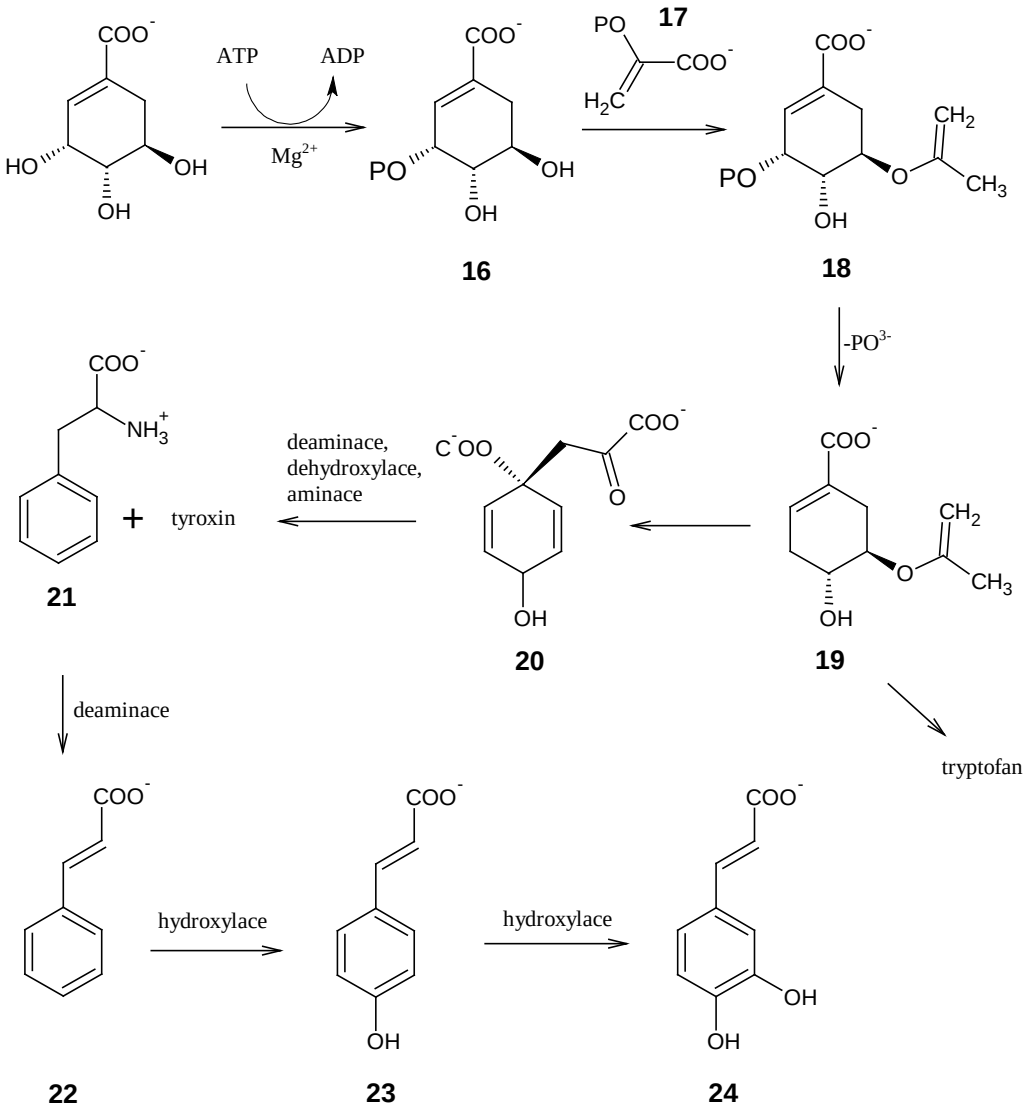
K hlavnímu biologickému účinku kávové kyseliny patří její antioxidační aktivita, dále pak vykazuje protizánětlivé, protirakovinné a antimetastatické účinky. Kávová kyselina je v přítomnosti iontů mědi poměrně silným protioxidantem. Reakcí polyfenolů a iontů mědi dochází k jejich redukci a při následné reoxidaci jsou produkovány reaktivní kyslíkové radikály. Tímto dochází k poškození DNA. Bylo zjištěno, že koncentrace iontů mědi při různých nádorových onemocněních vzrůstá, a proto za protektivní vlastnosti kávové kyseliny může spíše protioxidativní aktivita než antioxidativní. Jak bylo dříve řečeno, antioxidační schopnost závisí na struktuře sloučeniny. V případě kávové kyseliny a jejich derivátů je důležitým faktorem stabilita vzniklého antioxidantu na málo reaktivní fenoxylový radikál **30** nebo na neradikální chinoidní strukturu **31** (Obr. 13)[20,21,26].



Obr. 13 Stabilizace kávové kyseliny a jejích derivátů

3.2.1.2.2. Biosyntéza kávové kyseliny

Výchozími látkami pro biosyntézu kávové kyseliny (Obr. 14) jsou aminokyseliny tryptofan, tyrozin a fenylalanin. Hlavním metabolitem pro syntézu těchto aminokyselin je kyselina šikimová, resp. její fosforylovaný anion **16**. Dochází ke kondenzaci aniontu s fosfoenulpyruvátem **17** za vzniku 3-fosfo-5-enolpyruvylšikimátu **18**, ze kterého se odštěpí fosfát za vzniku chorsimátu **19**. Chlorsimát se může štěpit na tryptofan nebo vzniká meziprodukt **20**, který dekarboxylací, aminací a dehydroxylací poskytuje tyroxin a fenylalanin **21**. Deaminací fenylalaninu vzniká anion kyseliny skořicové **22** a jeho postupnou hydroxylací přes *para*-kumarát **23** vzniká anion kyseliny kávové **24** (cit[42,45,46]).



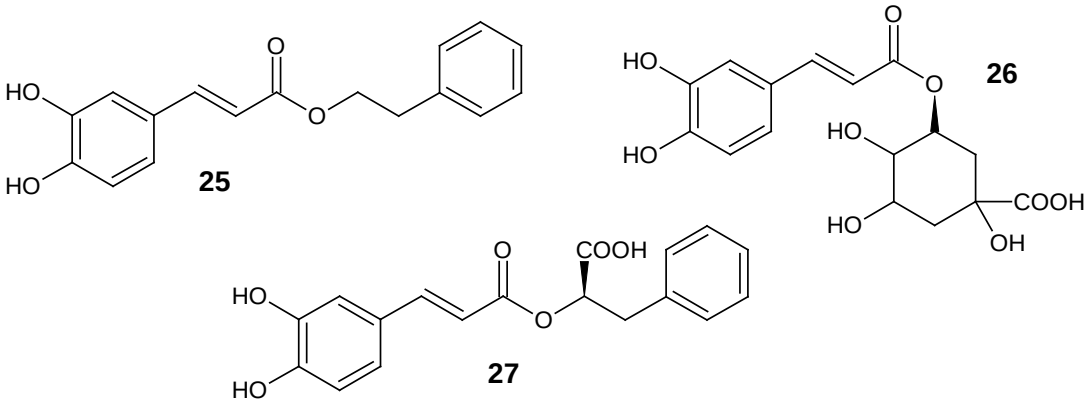
Obr. 14 Biosyntéza kávové kyseliny[42]

3.2.1.2.3. Metabolismus

Metabolismus kyseliny kávové se v lidských tkáních podobá metabolismu léčiv, u kterých, podobně jako u této kyseliny, látky podléhají metylaci. Podrobný přehled všech metabolitů a jejich přeměn jsou uvedeny v práci Brancové P.[42].

3.2.1.2.4. Deriváty

Kávová kyselina se v přírodě vyskytuje jak ve volné formě, tak ve formě derivátů (Obr. 15). Záleží na tom, kolik molekul kávové kyseliny se v jednotlivých derivátech vyskytuje. Mezi deriváty s jednou molekulou patří např. fenylethylester kávové kyseliny (CAPE) **25** nebo chlorogenová kyselina **26**, kondenzací dvou molekul vzniká rozmarýnová kyselina **27**(cit.42).

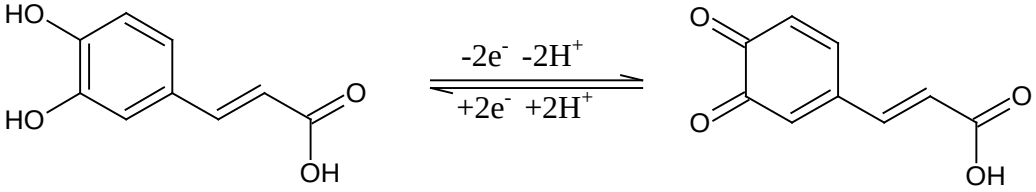


Obr. 15 Deriváty kávové kyseliny[42]

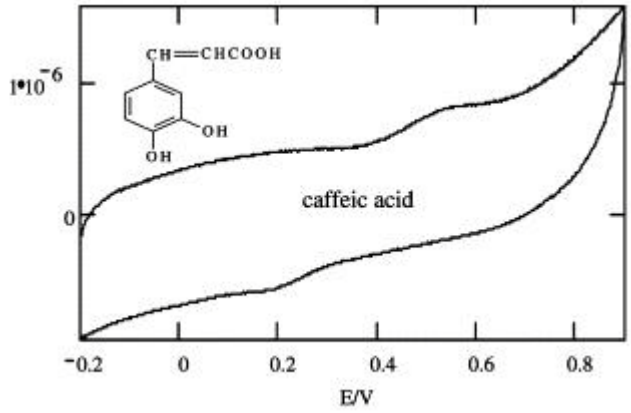
Hlavním derivátem kyseliny kávové je kyselina chlorogenová, přesněji kyselina 5-*O*-kafeoylchinová (5-CQA) **26**. Stejně jako kyselina kávová a rozmarýnová se vyznačuje antioxidačními účinky, i když poněkud slabšími, jak uvádí práce Marinove E. a kol.[47]. Malé množství kyseliny chlorogenové můžeme nalézt v čajových lístcích, kávě, kakaových bobech, ovoci a zelenině a také v šalvěji lékařské[48,49].

3.2.1.2.5. Elektrochemické vlastnosti

Kyselina kávová, stejně jako kyselina rozmarýnová, patří mezi elektroaktivní látky. Na Obr. 16 je vyobrazeno schéma oxidace, která vede ke vzniku *o*-chinon kávové kyseliny a redukce kávové kyseliny. Oxiduje se při potenciále +540mV a redukuje se při potenciále +180 mV (vs.Ag/AgCl), viz. Obr. 17. Za nízkou hodnotu potenciálu oxidační píku jsou zodpovědné hydroxy skupiny v poloze *ortho* na aromatických jádrech[43]. Podrobný přehled z hlediska elektrochemického chování kyseliny kávové je popsán v práci S. K. Trabelsiho a kol.[50].



Obr. 16 Oxidace a redukce k. kávové



Obr. 17 Cyklický voltamogram k. kávové[43]

3.2.1.3. Metody stanovení fenolických kyselin

Vzhledem ke skutečnosti, že výše diskutované fenolické kyseliny mají velice podobné chemické i fyzikální vlastnosti, stanovují se v rostlinném materiále nejčastěji společně. Mezi dnes nejpoužívanější metody pro jejich stanovení patří separační metody[29], a to chromatografie na tenké vrstvě, plynová chromatografie s plamenoionizačním nebo hmotnostním detektorem, kapalinová chromatografie s UV/VIS, hmotnostním nebo elektrochemickým detektorem a elektromigrační techniky s UV/VIS, hmotnostním nebo elektrochemickým detektorem. Kromě metod separačních a elektromigračních se mohou také využívat metody elektrochemické, a to voltametrie nebo biosenzory[51,52,53,54] i metody molekulové spektrometrie, jako NMR[55,56], IR[57]. Nemůžeme opomenout metody enzymatické[58], které jsou ale oproti separačním využívané jen zřídka, a vzhledem k zaměření diplomové práce nebudou dále diskutovány.

Elektroanalytické metody

Voltametrie

Cyklická voltametrie patří do skupiny potenciodynamických experimentálních metod, které doznaly v posledních desetiletích rychlého rozvoje a velkého rozšíření do laboratorní praxe. Bylo publikováno několik voltmetrických metod pro stanovení fenolických kyselin v rostlinném materiále[59,60,61]. Voltametrie se ale nemusí používat jen pro stanovení obsahu analytů v různých matricích, ale také k hodnocení antioxidační aktivity např. kyseliny rozmarýnové a kávové a dalších kyselin v suchých bylinách, jak popisuje práce M.S. Cosia, S. Burattiho, S. Mannina a S. Benedetta. Nejprve byla provedena cyklická voltametrie s pufrem o složení 70% metanol, 28% 0,1mol.l^{-1} octanu sodného pH 4, 2% a monohydrátu chloristanu sodného. Standardní roztoky fenolických sloučenin (kávová, rozmarýnová, kumarová, ferulová a carsoová kyselina, kaemferol, quercetin a hesperitin) byly zředěny na koncentraci $3{,}2.10^{-5}$ mol.l^{-1}. Zapojení cely bylo tří-elektrodové a sestávalo z uhlíkaté skleněné pracovní elektrody, platinové pomocné elektrody a Ag/AgCl referentní elektrody. Rychlost skenu byla 100 mV. s^{-1}. Z cyklického voltamogramu autoři zjistili, že zkoumané analyty se chovají reverzibilně, vykazují velice nízké hodnoty oxidačních potenciálů, což má spojitost se strukturou sloučenin a tudíž všechny vykazují antioxidační účinky. Pro zhodnocení velikosti tohoto účinku byl sestrojen hydrodynamický voltamogram v rozmezí potenciálu od +0,1 do +0,8 V (vs.Ag/AgCl). Následně byl vybrán potenciál +0,5 V, při kterém sledovali odezvy

analytů a z nich posoudili navzájem velikost antioxidační aktivity mezi analyty. Ta klesala v řadě od k.carnosoová > quercetin > k.rozmarýnová > kaemferol > k.kávová. Kyselina kumarová, ferulová a hesperitin jevili minimální antioxidační antioxidační aktivitu[43].

Separační metody

Chromatografie na tenké vrstvě

Metoda tenkovrstevné chromatografie (TLC) patří k jedné z nejstarším separačním metodám. Její princip je znám už přes sto let a od 30. let je jednou z nejpoužívanějších chromatografických technik. Je jednoduchá, levná a rychlá. Nejčastěji se používá pro detekci látek v přírodních extraktech. M. Petersen ve své práci identifikoval rozmarýnovou kyselinu metodou TLC. Jako mobilní fáze sloužila směs EtOAc/$CHCl_3$/HCO_2H (50:40:10). Vysušený papír byl postříkán směsí metanolu a polyethylenglykolu a k identifikaci využil UV detekci při 254 a 312 nm (cit. 41). Další publikace jsou uvedeny v cit.[62,63,64,65].

Elektromigrační techniky

Tyto techniky vynikají především velice malou spotřebou vzorku a činidel, velkou účinností a rychlostí separace a krátkou dobu potřebnou na optimalizaci podmínek. Dnes elektromigrační metody dosahují účinnosti několik stovek tisíc až milionů teoretických pater Jsou považovány za jedny z nejúčinnějších, nejcitlivějších a nejperspektivnějších analytických separačních technik. Bylo napsáno mnoho publikací pro stanovení fenolických kyselin v rostlinném matriále metodu kapilární elektroforézy s různými typy detekce, a to s UV/VIS[66,67,68,69], hmotnostní[70,71,72] a elektrochemické, jak uvádí např. práce Y. Penga a kol., kteří separovali rozmarýnovou kyselinu z extraktu rozmarýnu. Použili pracovní uhlíkovou elektrodu s potenciálem +0,9 V (vs.SCE), borátový pufr o pH 9 a 75 cm kapilára. Detekční limit pro rozmarýnovou kyselinu byl 1.10^{-9} $mol.l^{-1}$ (cit.[73]).

Plynová chromatografie

Metoda plynové chromatografie (GC) je jedna z nejrozšířenějších analytických metod, používaná pro analýzu těkavých sloučenin. Důvodem je její vysoká separační účinnost a velká citlivost. Dovoluje nám pracovat s minimálním množstvím vzorku (pg). Jestli-že bychom chtěli analyzovat fenolické kyseliny plynovou chromatografií, je nutné je převést na těkavé trimetylsilyl deriváty, např. hexametyldisilazanem s přídavkem trifluoroctové kyseliny, jak je

popsáno v práci Füzfaie a Molnár-Perla[48]. V dnešní době se pro lepší objasnění povahy složek složitých směsí nejčastěji spojuje s vysoce výkonnou hmotnostní detekcí. Bohužel nevýhodou této detekce jsou vysoké pořizovací náklady. Této kombinace využil M. A. Hossain pro separaci rozmarýnové kyseliny z různých odrůd jablek. K analýze si připravil metanolický extrakt vzorku (1:100 v/v), jako nosný plyn sloužilo helium a separace probíhala na křemenných kapilárách při nástřiku vzorku 0,2 µl. U hmotnostní detekce byla využita ionizace elektronem. Detekční limit pro rozmarýnovou kyselinu činil 2.10^{-9} $g.l^{-1}$(cit[74]).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jedna z nejpopulárnějších separačních metod, která se může kombinovat s několika detekčními systémy, a to s: UV/VIS, popř. detektorem diodového pole (DAD), elektrochemickým (ECD), fluorescenčním[75,76] (FD) a hmotnostním[77,78,79,80] (MS) detektorem. Nejčastěji se pracuje v systému reverzních fází, ve kterých je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární. Tato technika je pro stanovení fenolických kyselin nejpoužívanější.

Wang H., Provan G.J., Helliwell K. ve své práci srovnávali použití mobilních fází a extrakcí pro kyselinu kávovou a rozmarýnovou. Autoři uvádějí, že nejlepší separace probíhala při složení mobilní fáze methanol/0,1 % kyselina fosforečná a po extrakci reálné matrice v etanolu nebo metanolu. Tyto extrakce poskytovaly přibližně stejné výtěžky. Vlnová délka byla nastavena na 330 nm, průtok na 1 ml/ml, separace probíhala na koloně Kingsorb 5 µm. Byl použit gradient mobilní fáze. Detekční limit pro kyselinu kávovou byl $1,5.10^{-1}$ $g.l^{-1}$, pro kyselinu rozmarýnovou $7,1.10^{-1}$ $g.l^{-1}$(cit.[81]). Některé z mnoha další publikací, využívající spektrofotometrickou detekci jsou uvedeny v cit.[82,83,84,85,86].

Elektrochemická detekce je až o řád citlivější, než UV/VIS detekce. Dokonce někteří autoři uvádějí, že pro fenolické kyseliny je tento detektor nejcitlivější ze všech. Podmínkou pro jeho použití je, že analyzovaná látka musí být elektroaktivní a mobilní fáze vodivá, což se zajistí přídavkem soli do vodné fáze. Tento detektor má jedinou nevýhodu, a to je jeho úzká linearita kalibrační přímky v koncentračním rozmezí. Dnes se nejčastěji využívá Coulochem, jak uvádí práce V. Škeříkové., L. Grynové a P. Jandery, pro stanovení antioxidantů v pivě. Zároveň ho porovnávali s osmikanálovým detektorem CoulArray a s fluorescenčním detektorem. Separace probíhala na koloně Zorbax SB-C18. Mobilní fáze byla složena s 5 mM octanu amonného pH 3,15 s acetonitrilem v gradientu. Výsledkem bylo, že nejcitlivějším

detektorem, až o 3 řády, byl detektor fluorescenční, bohužel ne všechny látky fluoreskují a většina z nich se tedy nedala stanovit bez komplikované derivatizace[87]. Další využití coulometrického detektoru pro separaci fenolických kyselin v rostlinném materiále jsou uvedeno v cit.[88,89].

Kromě coulochemického detektoru je často využíván o něco méně citlivý detektor ampérometrický[90]. Vanbeneden N. a kol. analyzovali fenolické kyseliny v pivě za použití ampérometrického detektoru ED40 s pracovní uhlíkovou a referentní Ag/AgCl elektrodou. Citlivost byla nastavena na 100 nA. Chromatografická analýza probíhala v systému reverzní fáze na koloně 250 mm × 4 mm Nucleosil 100-10 C18 s guard kolonou 8 mm × 4 mm Nucleosil 100-10 C18. Mobilní fáze byla složena z $H_2O/CH_3OH/H_3PO_4$ (745/245/10; v/v) s průtokem 0,1 ml/min.(cit. 90).

3.2.1.4. Metody používané při analýze fenolických kyselin

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v posledních letech jednou z neperspektivnějších separačních technik v analýze přírodních látek. Je založena na rozdílné distribuci složek analytu mezi stacionární a mobilní fází. S*tacionární fází* je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. Stacionární fáze může být jak polární tak nepolární. Dnes se nejčastěji pracuje v systému reversních fází, kde na silikagel chemicky vázané alkylové řetězce (nejčastěji $C_{18}H_{37}$) slouží jako stacionární fáze (nepolární) a voda s přídavkem organických rozpouštědel jako fáze mobilní (polární), které zvyšují rozpustnost a stabilitu některých analytů. *Mobilní fáze* není inertní a významně se podílí na separačním procesu. Máme prakticky neomezené možnosti jejího složení a můžeme ji ovlivňovat změnami ve složení rozpouštědel, pH, iontové síly atd. Mobilní fáze je charakterizována hlavně polaritou a selektivitou[91,92].

Výhodou kapalinové chromatografie je její spojení s různými typy detektorů. V dnešní době je obecně jeden z nejpoužívanějších detektor spektrofotometrický, založený na schopnosti látek absorbovat záření. Avšak ve srovnání s jinými detektory je poměrně málo citlivý. Jeho detekční limity se pohybují mezi 10^{-5} až 10^{-6} mol.l^{-1}. Jedním z nejcitlivějších detektorů ve spojení s HPLC detektor elektrochemický, u něhož je možné dosáhnout detekčních limitů až 10^{-9} mol.l^{-1} a tím bez problémů konkuruje detektoru fluorescenčnímu[93].

Vzhledem k těmto poznatkům je v analýze přírodních antioxidantů poslední dobou využívána právě vysoce citlivá a selektivní elektrochemická detekce. Mezi ni řadíme ampérometrii a coulometrii. Obě tyto detekční techniky jsou použitelné pro systém reverzních fází, a to nejčastěji na kolonách C18. Na rozdíl od jiných detektorů, je u elektrochemické detekce podmínkou vodivost mobilní fáze. Ta se zajišťuje přídavkem soli do vodné složky. Organická složka je tvořena stejnými rozpouštědly, jako u ostatních typů detekce, avšak nejčastěji je využíván methanol nebo acetonitril. Další, velice důležitou podmínkou je používání vysoce čistých chemikálií a dokonalého odvzdušnění, aby bylo dosaženo stabilní základní linie a reprodukovatelnosti výsledků. Elektrodový systém je nejčastěji tříelektrodový. Jako pracovní elektrody se používají různé formy uhlíku nebo ušlechtilý kov, jako referentní slouží např. argentchloridová, kalomelová nebo hydrogen-paládiová a jako pomocná elektroda je nejčastěji využívaná platina ve formě drátku či plíšku[94].

Ampérometrická detekce je založená na měření proudu, který protéká pracovní elektrodou, v závislosti na čase. Velikost tohoto proudu v přítomnosti analytu je potom přímo

úměrný jeho koncentraci. Na pracovní elektrodu se vkládá konstantní napětí a hodnota tohoto vloženého potenciálu je volena zpravidla tak, aby elektrodou tekl v přítomnosti analytu limitní proud. I když je z ekonomického hlediska ampérometrická detekce finančně nejméně nenáročná, není v dnešní době moc využívaná. Důvodem jsou problémy s nestabilitou základní linie, rychlou pasivací pracovní elektrody, která vede v průběhu měření ke snižování odezvy detektoru, nelinearitou kalibrační křivky a také není kompatibilní s gradientovou elucí. Většina problémů je dnes minimalizována, popř. nahrazováno použitím detekce coulometrické.

Coulometrická detekce je založená na kvantitativní přeměně analytu v elektrochemické cele a ten je potom stanoven z velikosti náboje prošlého elektrodou. Jako detekční technika je citlivější než ampérometrie a jeho základní linie je stabilnější. Výhodou také je, že se může využít zapojení více detekčních cel v sérii. Na každou celu je možné nastavit různé hodnoty potenciálu a tím sledovat např. oxidaci a redukci látek v jednom záznamu. Další výhodou coulometrické detekce je možnost použití tzv. „guard“ cely, čili ochranné cely, na kterou se vkládá potenciál o 30 mV vyšší, než je největší vkládaný potenciál na pracovní elektrodu. Tato cela slouží k odstranění elektroaktivních nečistot z mobilní fáze před vstupem do injektoru, kolony a analytické cely, které mohou interferovat při stanovení. Bohužel, ve většině případů není možné coulemtrický detektor použít s gradientovou elucí, a proto se tento zásadní problém řeší použitím multikanálového CoulArray detektoru se 4-mi, 8-mi, 12-ti nebo 16-ti elektrochemickými celami[94], zapojenými v sérii. Ten kromě jiného vykazuje reprodukovatelnější odezvu, než předchozí, výše diskutované detektory.

C. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. Přístrojové vybavení

HPLC systém sestával z kapalinového chromatogramu Agilent 1100 Series, vybavený autosamplerem a online vakuovým degasérem, vše od firmy Agilent Technologies (Canada, USA), isokratické pumpy s tlumičem pulzů model 582 a ampérometrické cely 5040 (ESA Inc., MA Chelmsford). K simultánnímu záznamu při 245 nm byl použit UV-detektor značky Pye Unicam PU 4025 (PYE UNICAM, Cambridge, UK). K separaci byla využita chromatografická kolona Puropher Star RP-18 (5 μm) 250 x 4 mm s předkolonkou (Merck, Darmstadt, Německo). Nástřikované množství pomocí autosampleru bylo nastaveno na 5 μl.

Pro coulometrickou detekci byla použita guard cela model 5020 a coulometrický detektor Coulochem III s dvoukanálovou analytickou celou (model 5010A), vše vyrobeno firmou ESA Inc., MA Chelmsford. Vzorky byly nastřikované 25μl skleněnou stříkačkou (Hamilton, Reno, USA) pomocí dávkovacího ventilu s 20 μl smyčkou (Rheodyne, Cotati, USA).

Pro kontinuální záznam analýzy a vyhodnocení chromatogramu byl použit software Clarity (DataApex, Praha, ČR). Výsledky byly zpracovány statistickým software QC Expert 2.5 (Trilobite Statistical Software s.r.o., Pardubice, ČR).

5. Chemikálie a vzorky

Pro analýzu byly použity standardy kyseliny chlorogenové, kávové a rozmarýnové (Fluka, Chemie AD, Buchs, Švýcarsko), kyselina fosforečná a dihydrogenfosforečnan sodný, obě v kvalitě Trace Select (Fluka Chemie AD, Buchs, Švýcarsko), organická rozpouštědla acetonitril a methanol od firmy Merck (Darmstadt, Německo), octan etylnatý (Lachema, Brno, ČR), deionizovaná voda (Millipore), reálný vzorek šalvěje lékařské, komerční čaj ze šalvěje lékařské (Dr.Popov, Planá, ČR), propylen-gylokolový extrakt šalvěje lékařské, výhradně používaný v kosmetickém průmyslu (Plantapharm, Němčcko).

6. Pracovní postup

Mobilní fáze, standardy, kalibrační standardy, popř. reálné vzorky byly ředěny deonizovanou vodou, přefiltrovanou před mikrofiltr s membránou o porozitě 0,2 μm od firmy Merci (Brno, ČR).

6.1. Příprava mobilní fáze

K analýze byla použita mobilní fáze o složení 50 mmol.l^{-1} fosfát sodný (pH 3) - acetonitril (80:20 v/v). 50 mmol.l^{-1} vodný roztok fosfátu sodného byl připraven ředěním deionizovanou vodou a úprava na pH 3 byla provedena titrací roztokem kyseliny fosforečné, zředěné deionizovanou vodou v poměru 1:1. Mobilní fáze byla následně přefiltrována přes mikrofiltr s membránou o porozitě 0,2 μm a odplyněna pod vakuem.

6.2. Příprava standardů fenolických kyselin

Ze zakoupených standardů kyseliny chlorogenové, kávové a rozmarýnové byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 1 mg.ml^{-1} rozpuštěním navážky v methanolu. Zásobní roztoky byl uchovávány při -18 °C. Z těchto zásobních roztoků byly následně připraveny pracovní roztoky o koncentraci 0,1 mg.ml^{-1} rozpuštěním navážky v deionizované vodě. Roztok byl důkladně homogenizován po dobu jedné minuty na třepačce. Takto připravený roztok byl použit k přímé analýze. Pracovní roztoky byly uchovávány v lednici při +2 °C.

6.3. Příprava kalibračních standardů fenolických kyselin

Pro stanovení kyseliny chlorogenové, kávové a rozmarýnové byla připravena osmibodová kalibrační řada v koncentračním rozmezí od 1.10^{-1} do 1.10^{-4} mg.ml^{-1}, postupným ředěním deionizovanou vodou ze zásobního roztoku o koncentraci 1 mg.ml^{-1}. Vzorky byly uchovávány v lednici při +2 °C.

6.4. Příprava vzorků

Extrakce fenolických kyselin z komerčního propylen-glykolového extraktu

100 μl extraktu bylo okyseleno 10 μl 50% H_3PO_4 a k němu bylo přidáno 200 μl octanu ethylnatého, jako organického extrakčního činidla. Roztok byl po dobu 5 min. homogenizován na třepačce a následně centrifugován (10 000 G, 5 min.). Organická vrstva byla odebrána a odpařena pod dusíkem. Takto zakoncertovaný extrakt byl zředěn 250 μl methanolu a 250 μl 0,1% H_3PO_4 a analyzován.

Pro coulometrickou detekci byl jako jediný vzorek použitý propylen-glykolový extrakt, který byl 100krát zředěný mobilní fází.

Extrakce fenolických kyselin z komerčního čaje

Čajová infúze: 3 g komerčního čaje šalvěje lékařské byly zředěny 250 ml vroucí deionizovanou vodou. Takto připravený roztok byl po dobu 15 min. ponechán vyluhování a následně zfiltrován přes mikrofiltr s membránou o porozitě 0,2 μm. Z vyluhovaného roztoku byl odebrán 1 ml k centrifugaci (10 000 G, 5 min.). Tímto došlo k dokonalému oddělení dřeně od roztoku a takto připravený roztok byl použit k přímé analýze.

Methanolický výluh: 3 g komerčního čaje šalvěje lékařské bylo zředěno 250 ml methanolu okyseleném 1 % kyselinou octovou. Roztok byl vložen do ultrazvukové lázně na 10 min. a následně zfiltrován přes mikrofiltr s membránou o porozitě 0,2 μm. Z roztoku byl odebrán 1 ml k centrifugaci (10 000 G, 5 min.). Tímto došlo k dokonalému oddělení dřeně od roztoku a takto připravený roztok byl použit k přímé analýze.

Soxhletova extrakce: 0,36 g komerčního čaje šalvěje lékařské bylo vloženo do extrakční patrony Soxhletova extraktoru. Do varné baňky bylo nalito 90 ml octanu ethylnatého a baňka byla vložena do topného hnízda. Na varnou baňku byla nasazena extrakční patrona se vzorkem a na ni chladič. Vzorek byl extrahován po dobu 4 hodin. Získaný extrakt byl přelitý do 100 ml odměrné baňky a po rysku doplněn octanem ethylnatým. Alikvotní podíl (1 ml) byl odpařen pod dusíkem, zředěn 200 μl mobilní fáze a centrifugován po dobu 5 min. (10 000 G). Tímto došlo k dokonalému oddělení dřeně od roztoku a takto připravený roztok byl použit k přímé analýze.

Extrakce fenolických kyselin z čerstvých a sušených listů

Čerstvé a sušené listy byly rozdrceny a extrahovány stejným způsobem jako komerční čaj ze šalvěje lékařské.

6.5. Chromatografické podmínky

Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min., jemuž odpovídal tlak 175 barů. Měření probíhalo při vlnové délce 245 nm a při konstantním potenciále pracovní Pt-elektrody 230 mV s nastavenou citlivostí na 50 nA. K dávkování všech standardů a vzorků byl použit autosampler, objem nástřiku byl nastaven na 5 µl.

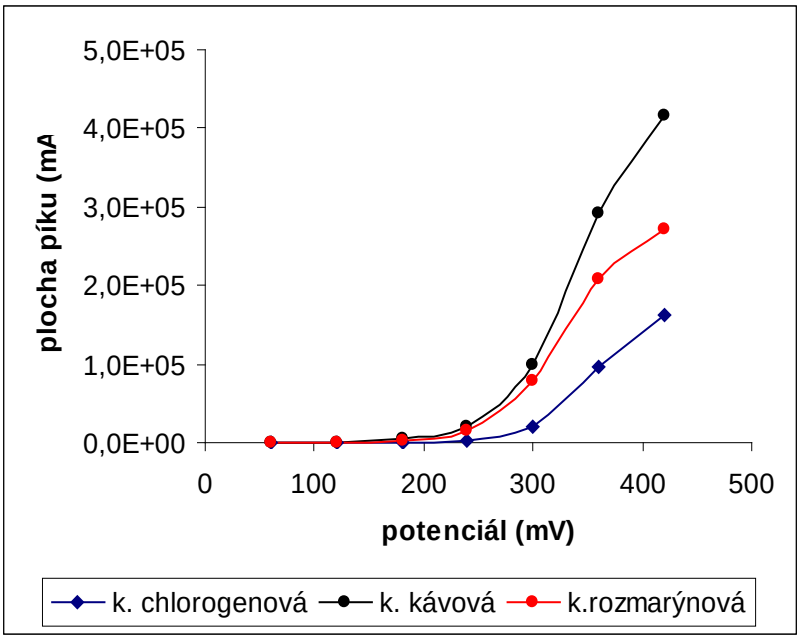
Pro coulometrickou detekci byl nastaven stejný průtok mobilní fáze, jemuž odpovídal tlak 112 barů. Měření probíhalo s analytickou celou se dvěmi coulemtrickými čidly, na které se nastavoval potenciál dle potřeby. Potenciál na guard cele byl nastaven vždy o 30 mV vyšší, než nejvyšší potenciál na čidlech. Citlivost coulometrického detektoru byla nastavena na 5 µA.

D. VÝSLEDKY A DISKUSE

7. Volba experimentálních podmínek

7.1. Hydrodynamický voltamogram

Pro zjištění oxidačního potenciálu kyseliny chlorogenové, kávové a rozmarýnové byl sestrojen hydrodynamický voltamogram (HDV). HDV je tedy závislost protékajícího proudu měrnou celou na vkládaném napětí, nebo se může místo hodnoty protékajícího proudu do grafu vynášet odpovídající plocha píků.



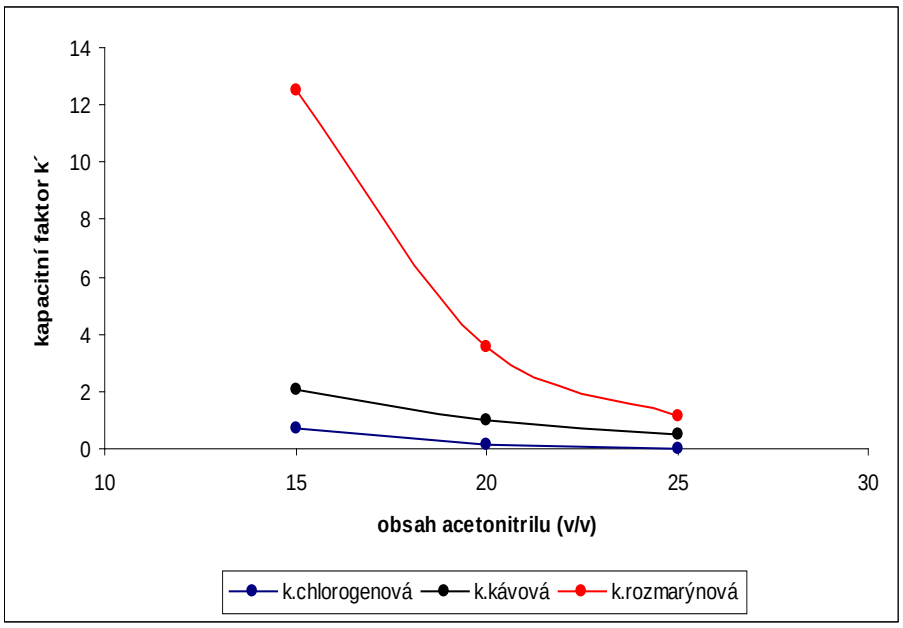
Obr. 18 Hydrodynamický voltamogram fenolických kyselin

Na Obr. 18 lze vyčíst hodnoty oxidačních potenciálů fenolických kyselin. Kyselina kávová a rozmarýnová se oxidují při velice nízkém potenciále 180 mV, kyselina chlorogenová při 230 mV. Z teoretického hlediska by experimentální měření mělo probíhat při limitním protékajícím proudu, při kterém je plocha píku konstantní. Pro naše účely byl zvolen potenciál 230 mV, abychom zajistili co největší selektivitu stanovení těchto kyselin, protože je jen velmi málo látek, které se oxidují při takto nízkých potenciálech.

7.2. Složení a poměr složek v mobilní fázi

Byly provedeny analýzy standardů fenolických kyselin ve dvou typech mobilní fáze, a to o složení fosfát sodný/methanol (50:50 v/v) a fosfát sodný/ACN (80:20 v/v). Příprava fosfátu sodného je popsána v oddíle 6.1. Mobilní fáze s obsahem methanolu byla nepoužitelná pro naše měření, protože se z elektrochemického detektoru nepovedlo získat žádné data. To mohlo být způsobeno tím, že detektor nebyl delší dobu používán a při použití methanolu nebyla elektroda dostatečně zaktivovaná.

Pro zjištění ideálního poměru 50 mmol.l^{-1} fosfátu sodného o pH 3 a ACN v mobilní fázi na retenci fenolických kyselin byly vyzkoušeny tři poměry, a to 85:15, 80:20 a 75:25 (v/v). Do grafu je vynesena závislost kapacitního (neboli retenčního) faktoru k´, který je dán poměrem redukovaného retenčního času t_R´a mrtvého času t_M, na obsahu ACN.



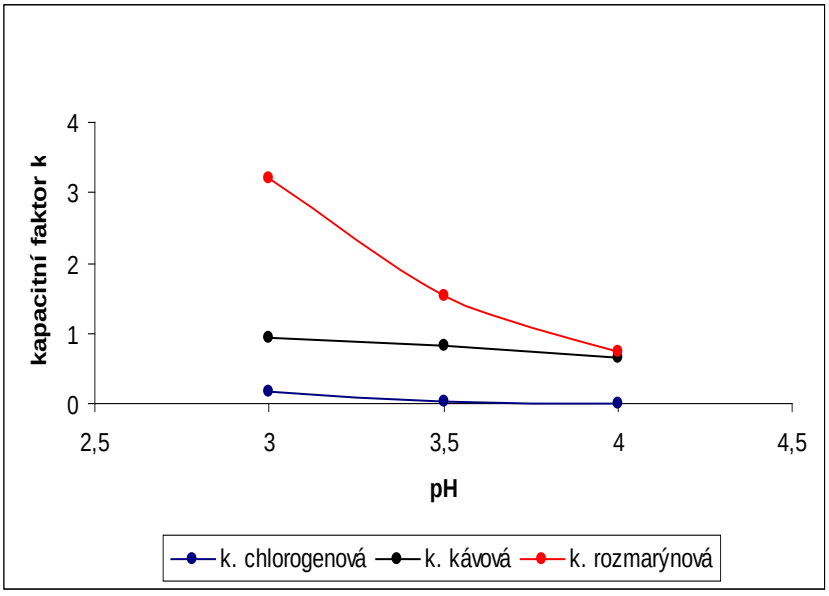
Obr. 19 Závislost kapacitního faktoru k´na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi

Z obrázku 19 je patrné, že poměr vodné a organické složky v mobilní fázi má výrazný vliv na retenci fenolických kyselin. Se zvyšujícím se objemem organické fáze dochází k poklesu kapacitních poměru fenolických kyselin. Kyselina chlorogenová má nulový kapacitní faktor při poměru 75:25 (v/v), tudíž se eluuje s mrtvým časem, v koloně není zadržována a proto tento poměr nemůže být zvolen. Na druhou stranu, při poměru 85:15 (v/v), má kyselina chlorogenová dostatečný kapacitní faktor, ale u kyseliny rozmarýnové nabývá vysokých

hodnot (eluuje se v 74-té minutě), což je pro měření nepraktické. Proto pro naše účely byla zvolena mobilní fáze z fosfátu sodného o pH 3 a acetonitrilu v poměru 80:20 (v/v). Hlavním důvodem je, že pracujeme s izokratickou elucí, a proto je nutné zvolit kompromis mezi retenčním časem a kapacitním faktorem.

7.3. pH mobilní fáze

Pro zvolení ideálního pH mobilní fáze na retenci fenolických kyselin byly vyzkoušeny tři hodnoty pH, a to 3, 3,5 a 4.

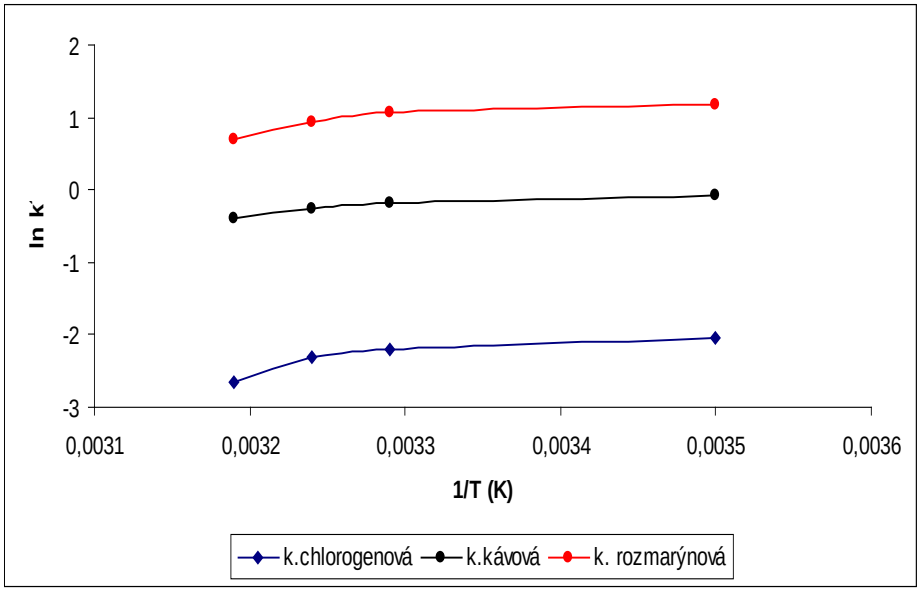


Obr. 20 Závislost kapacitního faktoru k´ na pH fosfátu sodného

Z obrázku 20 vyplývá, že se zvyšující se hodnotou pH klesá kapacitní faktor fenolických kyselin. Jedná se o slabé kyseliny, u kterých se snižující se hodnotou pH dochází k potlačení jejich disociace a tím ke zvýšení retence. Kyselina chlorogenová se v pH 3,5 eluuje téměř s mrtvým časem a v pH 4 je její kapacitní faktor nulový. Z toho důvodu bylo zvoleno pro fosfát sodný pH 3, při kterém jsou kapacitní faktory všech fenolických kyselin dostatečné.

7.4. Teplota kolony

Pro volbu vhodné teploty kolony na retenci fenolických kyselin byly proměřeny 4 její hodnoty, a to 25, 30, 35 a 45 °C. Vzhledem k tomu, že teplota má vztah s termodynamikou chromatografického děje, uvádí se do grafu závislost ln kapacitního faktoru k´na reciproké hodnotě termodynamické teploty T.



Obr. 21 Závislost ln kapacitního faktoru k´ na teplotě kolony

Jak již bylo nastíněno, teplota má vliv na termodynamiku i na kinetiku chromatografické separace. Z termodynamického hlediska vyplývá, že změna teploty je nepřímo úměrná hodnotě kapacitního poměru. Tudíž se vzrůstající teplotou dochází ke snížení kapacitního poměru fenolických kyselin. Jestli-že budeme usuzovat hledisko kinetické, tak se vzrůstající teplotou bude chromatografický systém účinnější. V našem případě změna teploty nemá výraznější vliv na hodnotu kapacitního poměru fenolických kyselin, ani na účinnost chromatografického děje (viz. Obr. 21), a proto všechny separace byly prováděny při laboratorní teplotě.

8. Kvalitativní analýza

V tabulce (Tab. I) jsou uvedeny průměrné retenční časy kyseliny fenolických kyselin pro UV/VIS a elektrochemický detektor (ECD), ve tvaru průměrný retenční čas (min.) ± směrodatná odchylka.

Tab. I Průměrné retenční časy fenolických kyselin

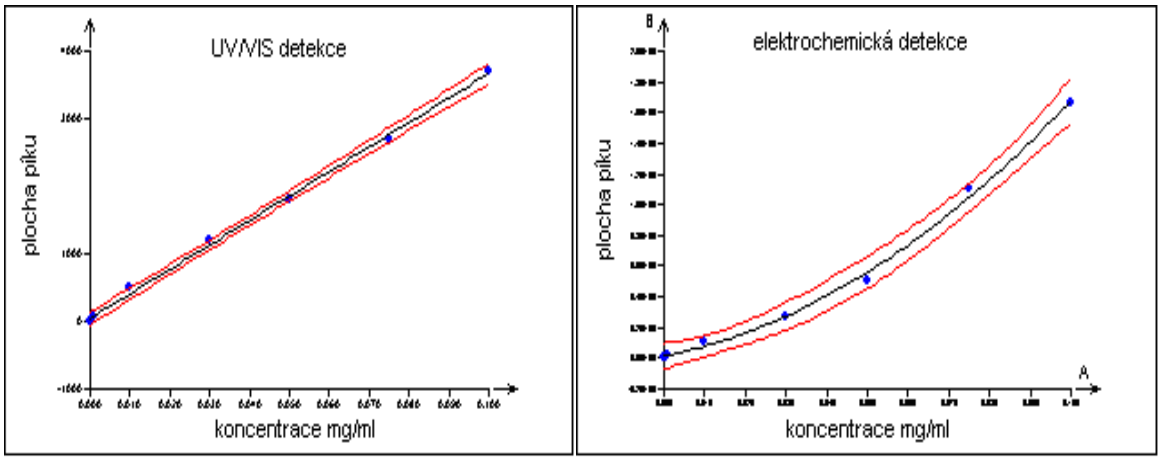
Kyselina	*UV/VIS*	*ECD*
Chlorogenová	6,37 ± 0,03	6,27 ± 0,03
Kávová	10,49 ± 0,08	10,39 ± 0,08
Rozmarýnová	27,42 ± 0,43	27,32 ± 0,43

9. Kvantitativní analýza

9.1. Kalibrace

Koncentrace standardů fenolických kyselin pro sestrojení kalibrační přímky byla namíchána v rozmezí od 1.10^{-1} $mg.ml^{-1}$ do 1.10^{-4} $mg.ml^{-1}$. Ve statistickém programu QC Expert 2.5 byla vytvořena osmibodová kalibrační přímka, tedy závislost ploch píků na koncentraci jednotlivých kyselin. Výsledky jsou vyhodnoceny v grafech I-III.

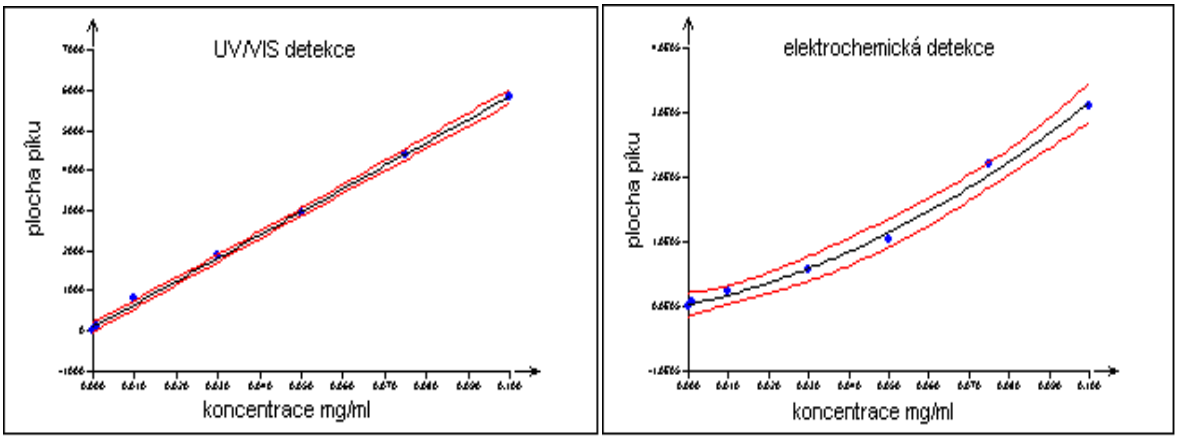
Graf I: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kyseliny chlorogenové pro UV/VIS a elektrochemickou detekci



Rovnice kalibrační křivky : **y =36233,810x** **y =11460027,3x^2 + 517341,423x**

Korelační koeficient: R^2 = 0,999 R^2 = 0,998

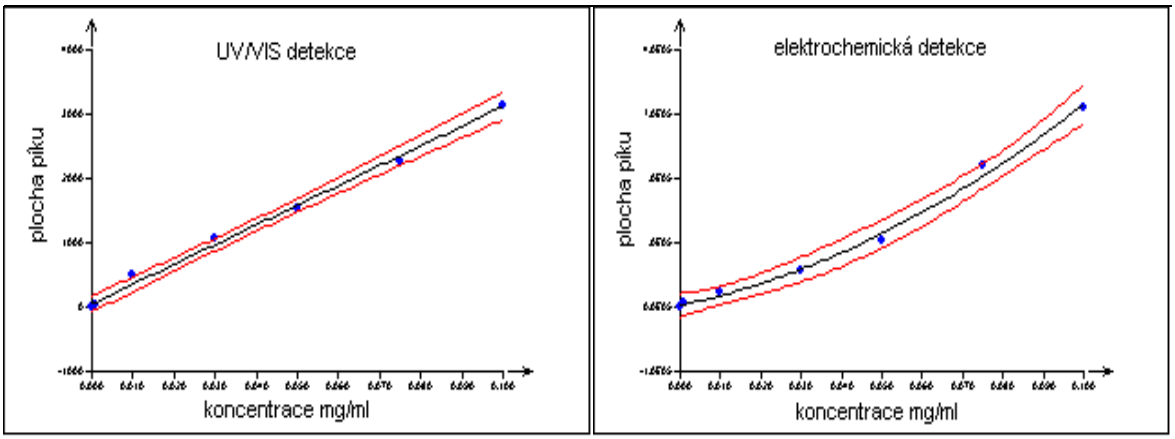
Graf II: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kyseliny kávové pro UV/VIS a elektrochemickou detekci



Rovnice kalibrační křivky: **y =57416,830x** **y = 18143391,83x^2 + 1307445,665x**

Korelační koeficient: R^2 = 0,999 R^2 = 0,998

Graf III: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci kyseliny rozmarýnové pro UV/VIS a elektrochemickou detekci



Rovnice kalibrační křivky: **y =30669,534x** **y = 30945416x^2 + 99803,498x**

Korelační koeficient: R^2 = 0,998 R^2 = 0,997

9.2. Limit detekce, limit kvantifikace

Ke kalibračním závislostem byly zjištěny limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ), jako trojnásobek, resp. desetinásobek výšky šumu, podle vzorce 1. Limity jsou pro srovnání vypočítané zvlášť pro UV/VIS a elektrochemickou detekci a jsou uvedeny v tabulce (Tab. 2)

Vzorec 1: LOD = (3.h)/m

LOQ = (10.h)/m

h = výška šumu

m = směrnice kalibrační přímky

Tab. I Hodnoty LOD a LOQ ($mol.l^{-1}$) fenolických kyselin pro UV/VIS a elektrochemickou detekci

	UV/VIS		ECD	
Kyselina	*LOD*	*LOQ*	*LOD*	*LOQ*
Chlorogenová	$5{,}6.10^{-6}$	$1{,}8.10^{-5}$	$5{,}1.10^{-7}$	$1{,}7.10^{-6}$
Kávová	1.10^{-5}	$3{,}3.10^{-5}$	$6{,}7.10^{-7}$	$2{,}2.10^{-6}$
Rozmarýnová	$1{,}4.10^{-5}$	$4{,}8.10^{-5}$	$6{,}0.10^{-6}$	$2{,}0.10^{-5}$

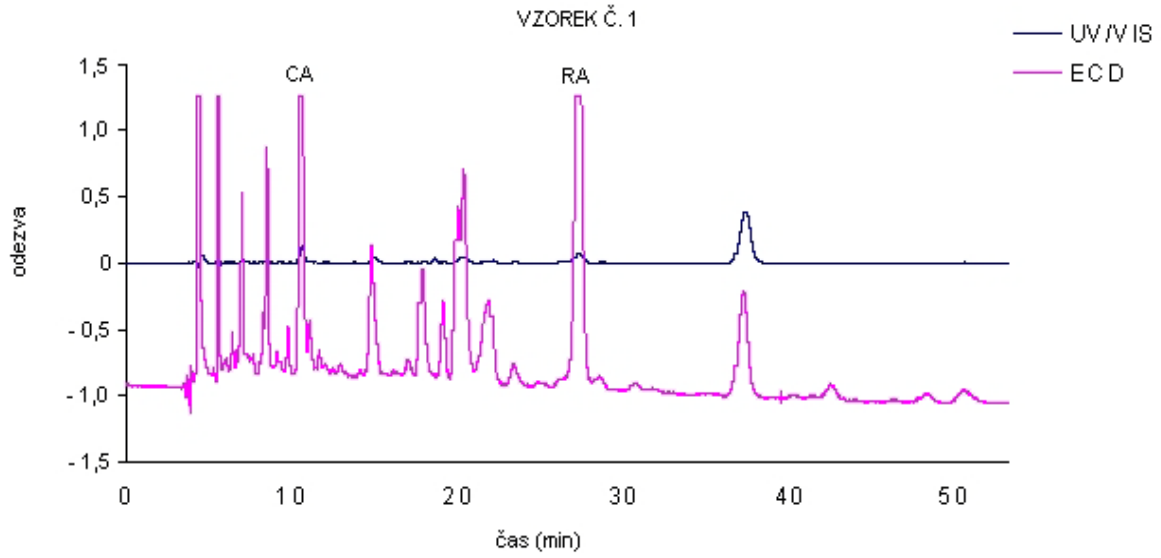
10. Analýza fenolických kyselin v šalvěji lékařské

10.1. HPLC s ampérometrickou detekcí

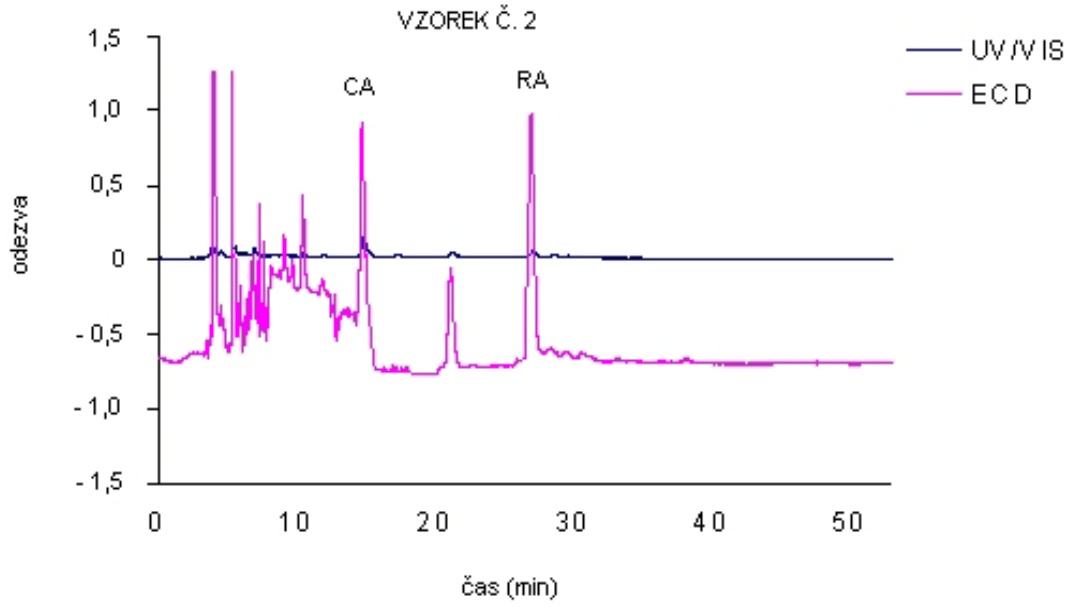
Byla provedena analýza kyseliny chlorogenové, kávové a rozmarýnové v reálných vzorcích šalvěje lékařské. Přítomnost těchto kyselin byla zjištěna metodou vysoko-účinné kapalinové chromatografie se simultánním záznamem UV/VIS detekce a ampérometrické detekce. K tomuto experimentu byly použity celkem 4 vzorky šalvěje:

vzorek č. 1: komerční propylen-glykolový extrakt (Plantapharm)
vzorek č. 2: komerční čaj (Dr.Popov)
vzorek č. 3: čerstvé listy (Florcentrum Olomouc)
vzorek č. 4: sušené listy (Florcentrum Olomouc, sušené volně)

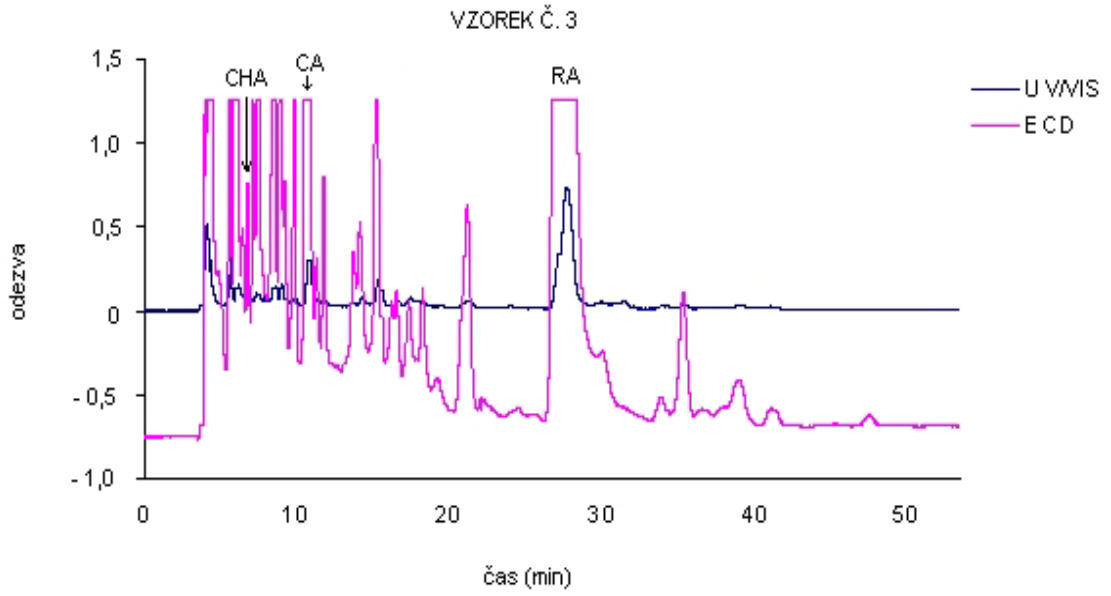
Na níže uvedeném **Obr. 22** je vyobrazen chromatogram komerčního propylen-glykolového extraktu ze šalvěje lékařské. Tento extrakt se používá výhradně v kosmetickém průmyslu kvůli antioxidačním, protizánětlivým a antibakteriálním účinkům přítomné kyseliny kávové (CA) a rozmarýnové (RA). Výrobci uvádějí, že tyto kyseliny se v extraktu šalvěje vyskytují v největším množství, a to z důvodu dosažení žádaných účinků, což také bylo prokázáno. **Obr. 23** demonstruje čajovou infúzi komerčního čaje ze šalvěje lékařské. Ze všech tří extrakcí u komerčního čaje se čajovou infuzí vyextrahovalo největší množství CA a RA. Experimentem bylo zjištěno, že délka luhování nemá na výtěžek vliv. Spektrum látek i jejich množství bylo stejné jak po 15 min., tak po 24 hod. výluhu. Chromatografický záznam na **Obr. 24** ukazuje Soxhletovu extrakci čerstvého listí ze šalvěje lékařské. V případě této extrakce octanem ethylnatým bylo očekáváno, že se vyextrahuje zcela odlišné a velice bohaté spektrum látek ve srovnání s ostatními extrakcemi a také, že výtěžky u čerstvých listů budou největší. Všechny tyto předpoklady byly potvrzeny. Je to dáno hlavně jinou polaritou extrakčního činidla a s tím spojenou extrakční silou, která je selektivní pro mnoho dalších látek, které se vodou nebo methanolem nevyextrahují. Na **Obr. 25** je zobrazena Soxhletova extrakce sušeného listí ze šalvěje lékařské. Ze všech provedených extrakcí u sušených listů byly výtěžky u Soxhletovy extrakce nejvyšší, stejně jako u čerstvých listů, i když ve srovnání s čerstvými listy jsou obsahy kyselin mnohonásobně menší.



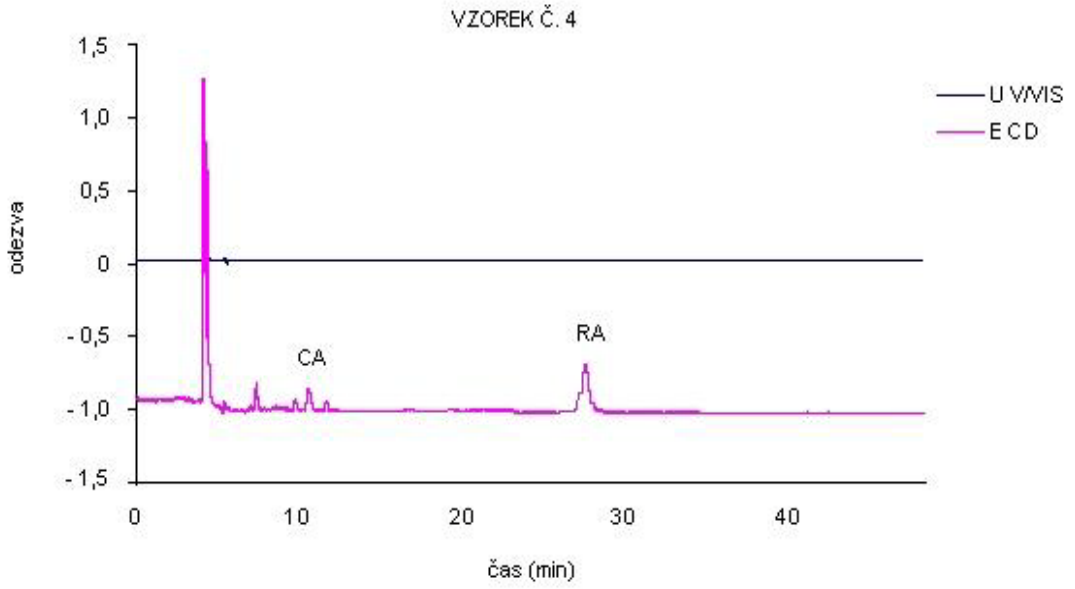
Obr. 22 Chromatografická separace komerčního propylen-glykolového extraktu ze šalvěje lékařské.



Obr. 23 Chromatografická separace čajové infúze komerčního čaje ze šalvěje lékařské.



Obr. 24 Chromatografická separace Soxhletova extraktu čerstvého listí ze šalvěje lékařské.

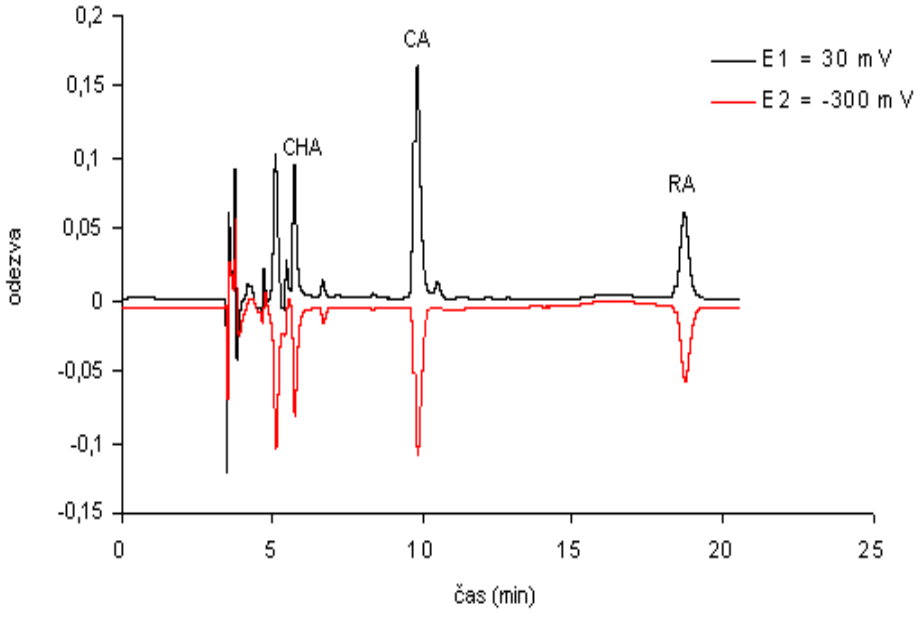


Obr. 25 Chromatografická separace Soxhletova extraktu sušeného listí ze šalvěje lékařské.

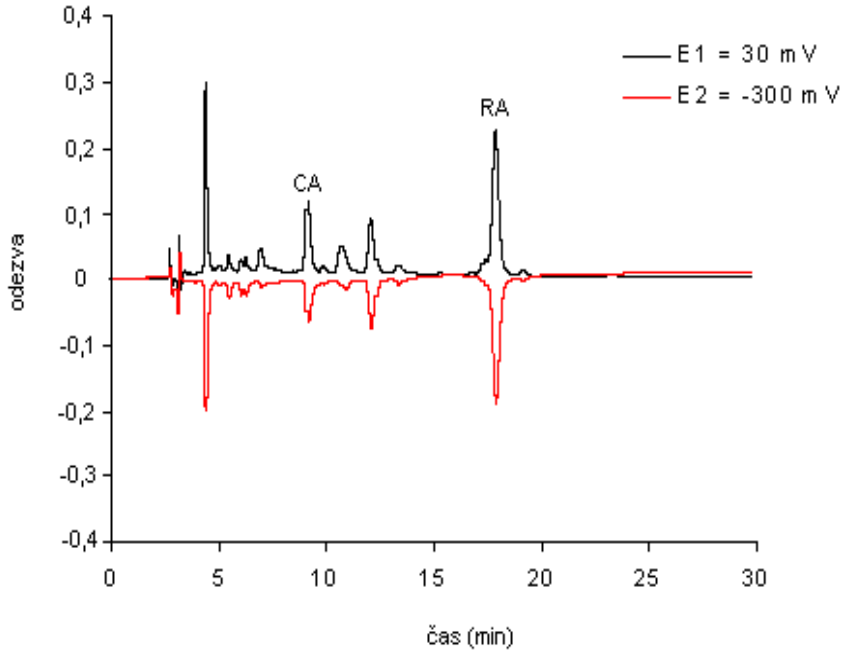
10.2. HPLC s coulometrickou detekcí

Coulometrická duální detekce byla využita pouze jako srovnávací metoda k ampérometrii z hlediska citlivosti, a také pro sledování oxidačně-redukčního chování fenolických kyselin. Experimentu byly podrobeny standardy fenolických kyselin a propylen-glykolový extrakt ze šalvěje lékařské.

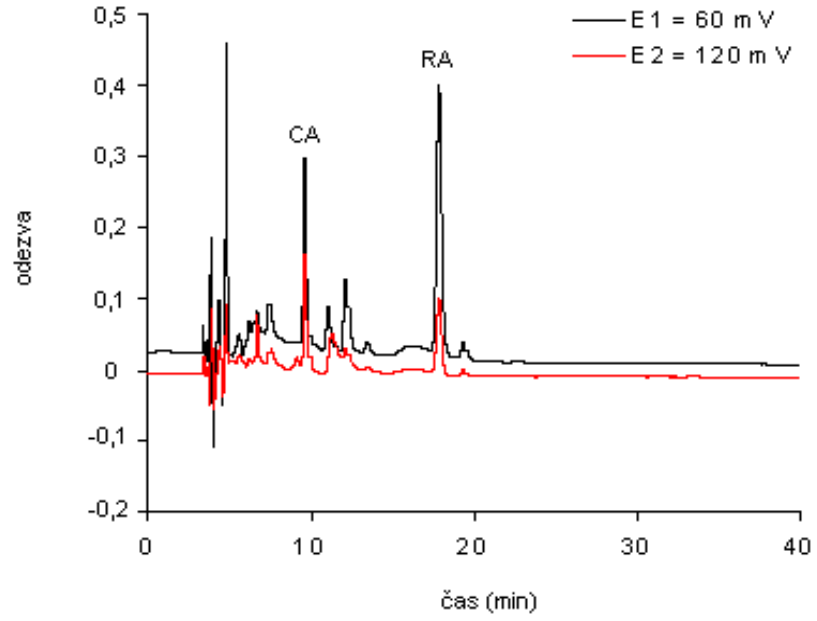
Na níže uvedeném **Obr. 26** je vyobrazen záznam duální coulometrické detekce standardů fenolických kyselin o koncentraci 0,01 mg/ml. Na první elektrodu byl vložený kladný oxidační potenciál E1: + 30 mV, na druhou záporný redukční potenciál E2: -300 mV (vs. Pd) a guard cela +60 mV (vs. Pd). Natřikovaný objem činil 5 µl. Tímto experimentem bylo potvrzeno, že u fenolických kyselin dochází nejen k oxidaci, ale i k jejich redukci. Za stejných podmínek byl analýze podroben propylen-glykolový extrakt ze šalvěje lékařské, viz. **Obr. 27.** U propylen-glykolového extraktu byla také provedena pouze oxidace (viz **Obr. 28)**, a to při potenciálech + 60 mV a + 120 mV (vs. Pd), guard cela byla nastavená na +150 mV (vs. Pd), nastřikované množství činilo 10 µl.



Obr. 26 Chromatografická separace s duální coulometrickou detekcí standardů fenolických kyselin, s vkládanými potenciály pro sledování oxidace a redukce



Obr. 27 Chromatografická separace s duální coulometrickou detekcí propylen-glykolového extraktu ze šalvěje lékařské, s potenciály pro sledování oxidace a redukce



Obr. 28 Chromatografická separace s duální coulometrickou detekcí propylen-glykolového extraktu ze šalvěje lékařské, s různými vkládanými oxidačními potenciály

Ve srovnání s ampérometrickou detekcí lze u coulometrické detekce, jak již bylo dříve řečeno, zapojit do série dvě a více elektrochemických cel. V našem případě byl k dispozici Coulochem III s dvoukanálovou analytickou celou flow-through, a tímto bylo umožněno pracovat v tzv. „screen“ módu, kdy na jedné elektrochemické cele dochází k oxidaci redukovadel, jakými jsou fenolické kyseliny a současně na druhé cele dochází k redukci. Ampérometrický detektor neumožňuje analýzu ve „screen“ módu. Podmínky je možné nastavit pouze pro oxidaci nebo redukci analyzovaných látek.

Coulometrický detektor také zaznamenal odezvu fenolických kyselin už při vloženém oxidačním potenciále + 30 mV (viz. Obr. 25), zatímco ampérometrický detektor až při 120 mV. Důvodem vyšší citlivosti je možnost použití coulometrické porézní grafitové elektrody, která má daleko větší povrch a oxidačně-redukční reakci na povrchu elektrody podléhá více jak 90 % analytu. Je tedy mnohem účinnější, stabilnější a selektivnější oproti elektrodám používaným v ampérometrii, u kterých oxidačně-redukčním dějům podléhá pouze 10-15 % analytu.

11. Stanovení obsahu fenolických kyselin v šalvěji lékařské

Obsah vybraných fenolických kyselin byl vypočten z rovnice kalibrační přímky pomocí statistického software QC Expert 2.5. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2-5.

Tab. II Obsah fenolických kyselin v komerčním propylen-glykolovém extraktu šalvěje lékařské (mg/g)

Kyselina	*Ředění mobilní fází*
Chlorogenová	-
Kávová	$7{,}98.10^{-3}$
Rozmarýnová	0,014

Tab. III Obsah fenolických kyselin v komerčním čaji šalvěje lékařské (mg/g)

Kyselina	*Čajová infúze*	*Soxhlet*	*Methanol*
Chlorogenová	-	$3{,}3.10^{-5}$	-
Kávová	$2{,}83.10^{-3}$	$5{,}9.10^{-4}$	1.10^{-4}
Rozmarýnová	0,015	$1{,}96.10^{-3}$	$7{,}3.10^{-3}$

Tab. IV Obsah fenolických kyselin v čerstvých listech šalvěje lékařské (mg/g)

Kyselina	*Čajová infúze*	*Soxhlet*	*Methanol*
Chlorogenová	-	$7{,}1.10^{-5}$	-
Kávová	-	$4{,}76.10^{-3}$	$1{,}2.10^{-3}$
Rozmarýnová	0,07	0,39	0,03

Tab. V Obsah fenolických kyselin v sušených listech šalvěje lékařské (mg/g)

Kyselina	*Čajová infúze*	*Soxhlet*	*Methanol*
Chlorogenová	-	-	-
Kávová	-	$1{,}39.10^{-3}$	$1{,}6.10^{-4}$
Rozmarýnová	-	$5{,}16.10^{-3}$	$3{,}1.\ 10^{-3}$

Při analýze komerčního čaje ze šalvěje lékařské, podrobeného třem typům extrakce, bylo nalezeno největší množství kyseliny kávové a rozmarýnové v čajové infúzi, následně v methanolickém výluhu a nejmenší množství při extrakci Soxhletem. Důvodem může být, že šalvějový čaj se používá pouze k přípravě čajů a vzhledem k tomu, že právě tyto kyseliny vykazují nejsilnější antioxidační a protizánětlivé účinky, měly by zde být zastoupeny v největším množství, což se potvrdilo. Na druhou stranu, jestli-že se srovnají výtěžky z čajové infúze u sušených listů, měl by být logicky obsah kyselin přibližně stejný. Tato logická úvaha ale neodpovídá realitě, kdy u sušených listů bylo množství kyselin pod mezí detekce, čili minimálně o tři hmotnostní řády méně. Tímto se potvrzují informace, že komerční čaj je sušený jiným způsobem než volným sušením, a to bez přístupu vzduchu a světla. Je totiž známo, že fenolické kyseliny při působení světla a vzdušného kyslíku velmi snadno podléhají rozkladným reakcím. Ale i přes zohlednění jiného procesu sušení jsou výtěžky tak malé, že se s velkou pravděpodobností potvrzuje nepsané pravidlo odborníků, a to takové, že komerční čaje jsou obohacovány právě výše uvedenými látkami s antioxidačními účinky. Při použití průmyslové technologie výroby je jejich případná ztráta eliminovaná doplněním těchto látek na hodnoty použitelné a schválené pro volný prodej. Komerční čaj má tímto zajištěnou vlastnost podpůrného léčebného prostředku pro uživatele.

Největší výtěžky fenolických kyselin (0,36 g RA a 0,03 g CA) u čerstvých listů přinesla očekávaně Soxhletova extrakce. Důvodů je hned několik. Jedná se totiž o zcela jiný mechanismus extrakce a také, že fenolické kyseliny jsou mnohem lépe rozpustné v organických rozpouštědlech než ve vodných. Jako extrakční činidlo byl zvolen octan ethylnatý, který se svou polaritou nejvíce blíží k polaritě fenolických kyselin a ty pak mají větší snahu do něho přejít, a proto je i účinnější než methanol. A nejen výtěžky kyseliny

kávové a rozmarýnové byly největší, ale také se jako u jediného typu extrakce vyextrahovalo malé množství kyseliny chlorogenové a dalších mnoho jiných látek. To hlavně z důvodu již dříve zmiňované podobné polarity a zcela jiné extrakční síly octanu ethylnatého ve srovnání s vodou a methanolem.

Podobný závěr je možné usoudit u sušených listů, jen s rozdílem, že výtěžky se pohybovaly o 1 – 2 hmotnostní řády méně, což může být způsobeno volným sušením na vzduchu a následným rozkladným reakcím fenolických kyselin.

Avšak ke vzájemnému srovnávání obsahu fenolických kyselin mezi jednotlivými vzorky je potřebné si uvědomit výchozí stav reálného vzorku. Jestli-že tedy chceme provést takovéto vzájemné srovnání, bylo by nutné vše přepočítat na stejnou matrici, čili na suché listy, což ale kvůli malému množství vypěstované šalvěje lékařské nebylo možné. Jestli-že budeme uvažovat, že čerstvé listí obsahuje přibližně 60 - 70 % vody, tak veškeré obsažené látky v čerstvých listech jsou tímto procentem zředěny a koncové množství obsahu kyselin by bylo o 60 - 70 % větší. Z toho plyne závěr, že čerstvé listy obsahují několikanásobně větší množství kyseliny rozmarýnové a kávové než komerční čaj, a proto by měl mít čaj z čerstvě natrhaných listů silnější antioxidační a protizánětlivé účinky a výrazně lépe by měl podporovat léčbu nemocí.

E. ZÁVĚR

Cílem teoretické části diplomové práce bylo podat podrobný přehled o vlastnostech, účincích a metodách stanovení fenolických kyselin, a to kyseliny rozmarýnové a kávové. Praktická část byla zaměřena na analýzu těchto kyselin v šalvěji lékařské, která je dodnes jednou z nejvyužívanějších léčivých bylin. A to nejen z důvodů jejich silných antioxidačních a protizánětlivých účinků, ale také jako velmi efektivní podpůrné léčivo nejrůznějších nemocí.

Byla vyvinutá rychlá, spolehlivá a citlivá metoda HPLC se simultánním záznamem UV/VIS a elektrochemické (ampérometrické) detekce pro stanovení fenolických kyselin v šalvěji lékařské. Výhodou této metody je jednoduchá a nenáročná úprava vzorků. Analyzovány byly čtyři reálné vzorky šalvěje lékařské, které byly navíc podrobeny třem vybraným typům extrakce. Obsahy kyselin v závislosti na typu extrakce byly porovnány a diskutovány. Čajová infúze poskytla největší výtěžky fenolických kyselin u komerčního čaje, Soxhletova extrakce u čerstvých a sušených listů z domácí sklizně. Zároveň se Soxhletova extrakce jevila jako nejúčinnější, protože její výtěžky byly v průměru o jeden hmotnostní řád vyšší, a také jako jediná vyextrahovala malé množství kyseliny chlorogenové. Výpočtem LOD a LOQ se potvrdilo, že ampérometrická detekce je o jeden řád citlivější (10^{-7} mol.l^{-1}) než UV/VIS detekce (10^{-6} mol.l^{-1}), což umožňuje analyzovat látky hlavně ve stopovém množství, které UV/VIS detektor už není schopen detekovat.

Vedle ampérometrické detekce byla pro srovnání použitá coulometrická detekce s duální průtokovou analytickou celou, která umožňovala sledovat jak oxidaci, tak redukci fenolických kyselin. I když coulometrická detekce obecně poskytuje reprodukovatelnější výsledky, je citlivější, účinnější a selektivnější, což také bylo experimentem potvrzeno, je z ekonomického hlediska finančně mnohem náročnější než detekce ampérometrická. Z tohoto důvodu byla v diplomové práci využita právě ampérometrická detekce, aby bylo poukázáno na to, že pomocí vhodně zvolených podmínek a precizní přípravě vzorků dosahuje ve spojení s HPLC výborných výsledků. Může být proto využívaná jako rutinní metoda v lékařství a farmacii pro stanovení elektrochemicky aktivních látek, a to nejen v rostlinném, ale i živočišném materiálu.

F. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3´-H	hydroxycinamát-hydroxyfenylacetát-3´-hydroxylása
3-H	hydroxycinamát-hydroxyfenylacetát-3-hydroxylása
4CL	hydroxycinamát-CoA-ligása
5-CQA	kyselina 5-*O*-kafeoylchinová
ABTS	diamonná sůl kyseliny 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonové)
ACN	acetonitril
AFK	aktivní formy kyslíku
CA	kyselina kávová
CAPE	fenyl-ethyl ester kyseliny kávové (angl.*Caffeic Acid Phenethyl Ester)*
CNS	centrální nervová soustava
CoA	koenzym A
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor diodového pole
DMPD	4-amino-N,N-dimethylanilin dihydrochlorid
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
ECD	elektrochemická detekce
FD	fluorescenční detektor
GC	plynová chromatografie
HDV	hydrodynamický voltamogram
HPLC	vysoko-účinná kapalinová chromatografie
HPPD	hydroxyfenylpyruvát-dioxygenása
HPPR	hydroxyfenylpyruvát-reduktása
CHA	kyselina chlorogenová
IPP	izopentyl-difosfát
IR	infračervená spektroskopie
LD_{50}	střední smrtelná dávka (angl. *Lethal Dose*, 50%)
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MS	hmotnostní detektor
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAL	fenylalaninamonia-lyása

RA	kyselina rozmarýnová
RAS	hydroxycinamát-CoA-hydroxyfenylacetát-hydroxycinamát-transferása
RNS	reaktivní dusíkové částice
ROS	reaktivní formy kyslíku
RTCES	registr toxicity chemických sloučenin
SCE	standardní kalomelová elektroda
TAT	tyrosin-aminotransferéza
TLC	tenkovrstevná chromatografie
UV	ultrafialová oblast spektra
VIS	viditelná oblast spektra

G. SEZNAM LITERATURY

1. Treben Maria, Zdraví z lékárny Boží
2. Rubcov V.G., Beneš K.: Zelená lékárna, Lidové nakladatelství Praha (1984, 1985).
3. Korbelář J., Endris Z.: Naše rostliny v lékařství, *Avinceum* Praha (1973).
4. Kresánek J., Dugas D.: Príručný atlas liečivých rastlín, Osveta, Martin (1990).
5. Jirásek V., Starý F.: Atlas léčivých rostlin, SPN Praha (1986).
6. Iburg A.: Lexikon přírodní medicíny, REBO Production, Německo (2008).
7. http://byliny.apatykar.info/clanek-7/ (staženo 9.2.2010).
8. Karlíčková J.: Terapeutické účinky Salvia officialis, Praktické lékárenství 1(2007).
9. Fuller D.: Herb´s and Alzheimer´s, Liverpool, England (2004).
10. European Commision: Opinion of the Scientific Committee on Food on Thujone (2002).
11. Večeřa Z.: Chem. Listy *95*, 157-162 (2001).
12. Klejdus B., Tarbová D., Stratil P., Kubáň V.: Chem. Listy *97*, 530-539 (2003).
13. Pacák J.: Stručné základy organické chemie, SNTL, Praha (1978).
14. http://en.wikipedia.org/wiki/Eucalyptol (staženo 17.3.2009).
15. Martin J., Dušek J.: Praktické lékárenství 3(5) (2007).
16. Patočka J., Plácat B.: Absinth and it´s psychiatric reflection, Thigis, Praha (2003).
17. Padosh et. al.: Substance Abuse, Treatement, Prevention and policy, 1, 14 (2006).
18. Jahodář L., Klečáková J.: Chem. Listy *93*, 320- 26 (1999).
19. Höld K.M, Sirisoma N.S., Ikeda T., Narahashi T., Casida J.E.: PNAS *97*, 8, 3826-3831 (2000).
20. Šulc M., Schilla M.: Chem. listy *100*, 723-732 (2006).
21. Jandera P., Grynová L., Kopová G.: CHEMagazín 6, XII (2002).
22. Slanina J., Táborská E.: Chem. Listy *98*, 239 − 245 (2004).

23. Schmitd Š., Pokorná J., Sekretár S.: Chem. Listy *100*, 723−732 (2006).

24. Šulc M., Schilla M.: Chem. Listy *100*, 723−732 (2006).

25. Fogliano V., Verde V., Randazzo G., Ritieni A.: J. Agric. Food Chem. 47, 1035 (1999).

26. Dvořák M., Matejovičová M.: Chem. Listy *102*, 977−983 (2008).

27. Stopka P., Křížová J.: Chem. Listy *100*, 723−732 (2006).

28. Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P.: Chem. Listy *99*, 455−466 (2005).

29. Santiago M., Penalta A.R., Neves A., Micke G.A., Vieira I.C.: Anal. Chim. Acta 613, 91-97 (2008).

30. Acker S. A., Balen G. P., Berg D. J.: Biochem. Pharmacol. *56*, 935-943, (1998).

31. Harmatha J.: Chem. Listy *99*, 622−632 (2005).

32. Heinrich J., Varcová I., Valentová K.: Chem. Listy *102*, 245−254 (2008).

33. Karakaya S.: Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. *44*, 453 (2004).

34. Robbins.R.: J. Agric. Food Chem. 51, 10 (2003).

35. Chvátalová K.: Studium antiradikálové aktivity fenolových kyselin a jejich vlivu na redoxní stav železa a mědi, Disertační práce, *Masarykova univerzita*, Brno (2006).

36. Lu Y., Foo L.Y.: Phytochem. 59, 117–140 (2002).

37. Rechner A. R., Spencer J. P., Kuhnle G., Hahn U., Rice-Evans C. A.: Free Radic. Biol. Med. 30, 1213-1222 (2001).

38. Clifford J.: Sci. Food. Agric. *79*, 362-372 (1999).

39. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=44699|FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC (staženo 9.2.2009).

40. http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/rosmarinic-acid.php (staženo 9.2.2009).

41. Petersen M., Simmonds M.S.J.: Phytochem. 62, 121-125 (2003).

42. Brancová P.: Syntéza derivátů kyseliny kávové a jejich toxicita, Diplomová práce, *Masarykova univerzita* Brno (2008).

43. Cosio M.S, Buratti S., Mannino S., Benedetti S.: Food Chem. 97, 4, 725-731 (2006).

44. http://www.chemicalland21.com/lifescience/phar/CAFFEIC%20ACID.htm (staženo 17.3.2009).

45. Knagga A.R.: Natural Products Reports *20*, 119-136 (2003).

46. www.gwu.edu/(vlnovka)mpb/shikimate1.htm, biosyntéza šikimátu (17.3.2009).

47. Marinova M. E., Toneva A., Yanishlieva N.: Food Chem. 114, 4, 1498-1 (2009)

48. Velíšek J., Cejpek K.: Biosynthesis of food compounds, OSSIS, Tábor (2008).

49. Santos-Gomes P.C., Seabra R.M., Andrade P.B., Fernandes-Ferreira M.: J. Plant Physiology 160, 9, 1025-1032 (2003).

50. Trabelsi S.K., Tahar B. N.: Abdelhedi R., Electrochim. Acta 49, 9-10, 1647-1654 (2004).

51. Carvalho M.L., Murilo S., Peralta R.A., Neves A., Micke G.A., Vieira C.I.: Talanta *77*, 1, 394-399 (2008).

52. Franzoi A.C., Dupont J., Spinelli A., Vieira C.I.: Talanta 77, 4, 1322-1327 (2009).

53. Fernandes C. S., Zwirtes de Oliveira R.,Vieira C. I.: Enzyme and Microbial Technology 40, 4, 661-668 (2007).

54. Gomes S.A.S.S., Nogueira J.M.F., Rebelo M.J.F.: Biosensors and Bioelectronics 20, 6, 1211-1216 (2004).

55. Yalpani M., Tyman H. P. J.: Phytochem. 22, 10, 2263-2266 (1983)

56. Abdullah Y., Schneider B., Petersen M.: Phytochem. 1, 4, 199-203 (2007).

57. Li W., Qu H.: J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Article in Press

58. Geller F., Schmidt C., Göttert M., Fronza M., Schattel V., Heinzmann B., Werz O.,

Flores E.M.M., Merfort I., Laufer S.: J. Ethnopharmacology, Article in Press

59. Kilmartin A.P, Chyong F.H.: Food Chem. 82, 4 501-512 (2003).

60. Rapta P., Mišík V., Staško A., Vrábel I.: Free Radical Biology and Medicine 18, 5, 901-908 (1995).

61. Carvalho L.M., Santiago M., Peralta A.R., Neves A., Micke A.G., Vieira C.I.: Talanta 77, 1, 394-399 (2008).

62. Maleš Ž., Medic´-Šaric´ M.: J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 24, 353–359 (2001).

63. Simonovska B., Irena Vovk I., Andrenšek S., Valentová K., Ulrichová J.: J.Chrom.A., 1016, 1, 89-98 (2003).

64. Abdullah Y., Schneider B., Petersen M.: Phytochem. Letters 1, 4, 199-203 (2008).

65. Kovatcheva E., Pavlov A., Koleva I., Ilieva M., Mihneva M.: Phytochem. 43, 6, 1243-1244 (1996).

66. Pyrzynska K., Biesaga M.: Trend Ananl. Chem 28, 7, 893-902 (2009).

67. Bonoli M., Montanucci M., Toschi G.T., Lercker G.: J. Chrom.A. 1011, 1-2, 163-172 (2003).

68. Šafra J., Pospíšilová M., Kavalírová A.: J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41, 7, 1022-1024 (2006).

69. Pomponio R., Gotti R., Hudaib M., Cavrini V.: J. Chrom. A. 945, 1-2, 239-247 (2002).

70. Nevado J. J. B., Peñalvo G. C., Robledo V. R., Martínez G. V.: Talanta 79, 5, 1238-1246 (2009).

71. Sawalha S. M. S., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A.: Food Chem. 116, 2, 567-574 (2009).

72. Gómez-Caravaca A. M., Verardo V., Segura-Carretero A., Caboni F. M., Fernández-Gutiérrez A.: J. Chrom. A. 1209, 1-2, 238-245 (2008).

73. Peng Y., Juan J., Liu F., Ye J.: J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 39, 3-4, 431-437(2005).

74. Hossain A.M., Salehuddin S.M., Kabir M.J., Rahman S.M.M., Rupasinghe V. H. P.,: Food Chem.113, 1, 185-190 (2009).

75. Gómez-Alonso S., García-Romero E., Hermosín-Gutiérre I.,: J. Compositon and Analysis 20, 7, 618-626 (2007).

76. Zhorka G., Kawka S.: J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 24, 5-6, 1065-1072 (2001).

77. Inbaraj S. B., Lu H., Kao T.H., Chen B.H.: J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 51, 3, 549-556 (2010).

78. He Z., Xia W.: Food Chem. 105, 3, 1307-1311 (2007).

79. Parejo I. a kol.: J. Ethnopharmacology 94, 1, 175-184 (2004).

80. Križman M., Baričevič D., Prošek M.: J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 43, 2, 481-485 (2007).

81. Wang H., Provan G.J., Helliwell K.: Food Chem. 87, 2, 307-311 (2004).

82. Tasioula-Margari M., Okogeri O.: Food Chem. 74, 3, 377-383 (2001).

83. Yao L., Jiang Y., Datta N., Singanusong R., Liu X., Duan J., Raymont K., Lisle A., Xu L.: Food Chem. 84, 2, 253-263 (2004).

84. Tsimidou M., Papadopoulos G., Boskou D.: Food Chem. 44, 1, 53-60 (1992).

85. Tarnawski M., Depta K., Grejciun D., Szelepin B.: J. Pharmaceitucal and Biomedical Analysis 41, 1, 182-188 (2008).

86. Kowatcheva E., Pavlov A., Koleva I., Ilieva M., Mihneva M.: Phytochem. 43, 6, 1243-1244 (1996).

87. Škeříková V. Grynová L., Jandera P.: Chem. Listy *98*, 343-348 (2004).

88. Jandera a kol., J. Sep. Sci. 28, 1005–1022 (2005).

89. Wittemera S. M., Veitb M.: J. Chrom. B 793, 367–375 (2003).

90. N. Vanbeneden a kol.: J. Chrom. A 1136, 237–242 (2006).

91. Štulík K a kolektiv, *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha, (2005).

92. Douša M., *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*, Brno (2002).

93. Jirovský D., přednášky z Aplikované voltametrie, Univerzita Palackého Olomouc, Přírodovědecká fakulta, katedra Analytické chemie, Olomouc (2009).

94. Řehořová L., Šeříková V., Jandera P.: J. Sep. Sci. 27, 1345–1359 (2004).