



Pedagogická  
fakulta  
Faculty  
of Education

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Pedagogická fakulta  
Katedra biologie

Bakalářská práce

# Bioaktivní látky v zeleném kořeni

Vypracoval: Lucie Arnoštová  
Vedoucí práce: Ing. Štěpánka Chmelová, Ph.D.

České Budějovice 2022

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne..... Podpis:.....

## Poděkování

Děkuji Ing. Štěpánce Chmelové, Ph.D. za obrovskou pomoc a velmi užitečné rady během zhotovování mé bakalářské práce. Děkuji za drahocenný čas a trpělivost.

Dále bych chtěla velmi poděkovat doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D. za přínosné konzultace a pomoc při stanovování jednotlivých fenolických látek na katedře aplikované chemie ZFT JU v Českých Budějovicích. Děkuji za ochotu a čas strávený nad mou prací.

Dále mockrát děkuji své rodině a partnerovi za trpělivost a motivaci při psaní této práce.

## **Abstrakt**

Bakalářská práce je zaměřena na stanovení celkového obsahu fenolických látek, jednotlivých majoritních fenolických látek a vitamínu C obsažených v bazalce pravé (*Ocimum basilicum*), v koriandru setém (*Coriandrum sativum*), v kopru vonném (*Anethum graveolens*) a v libečku lékařském (*Levisticum officinale*).

V první fázi byl stanoven celkový obsah fenolických sloučenin pomocí spektrofotometrie za využití činidla Folin Ciocalteu, a to v extraktech z čerstvých i sušených vzorků rostlin. Následně byli identifikováni jednotliví zástupci fenolických látek za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) v lyofilizovaném materiálu. Poté byl ještě měřen obsah vitamínu C také za užití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) v čerstvých vzorcích všech vybraných rostlin.

Nejvyšší koncentrace fenolických látek byla zaznamenána v libečku lékařském. Nejvyšší obsah jednotlivých fenolických látek, kvercetin a kemferol, byl prokázán rovněž v libečku lékařském.

## **Klíčová slova**

*Ocimum basilicum*, *Coriandrum sativum*, *Anethum graveolens*, *Levisticum officinale*, fenolické látky, flavonoidy, vitamin C

## **Abstract**

The bachelor thesis focuses on the determination of the total content of phenolic compounds, individual majority phenolic compounds and vitamin C, contained in sweet basil (*Ocimum basilicum*), coriander (*Coriandrum sativum*), dill (*Anethum graveolens*) and lovage (*Levisticum officinale*).

Firstly, the total content of phenolic compounds was determined by spectrophotometric analysis using Folin Ciocalteu agent in extracts from fresh and dried herb samples. Afterwards, particular representatives of phenolic compounds in the lyophilized material were identified by high-performance liquid chromatography (HPLC). Then the content of vitamin C in fresh samples from all



selected plants was measured using high-performance liquid chromatography (HPLC).

The highest concentration of phenolic compounds was discovered in lovage. The highest content of particular phenolic substances, quercetin and kaempferol, was also proved in lovage.

**Key words**

Sweet basil (*Ocimum basilicum*), coriander (*Coriandrum sativum*), dill (*Anethum graveolens*), lovage (*Levisticum officinale*), phenolic compounds, flavonoids, vitamin C

# Obsah

1. Úvod a cíle práce.....	1
2. Teoretická část.....	2
2.1 Koření.....	2
2.1.1 Bazalka pravá ( <i>Ocimum basilicum</i> ).....	3
2.1.1.1 Pěstování bazalky pravé.....	3
2.1.1.2 Význam bazalky pravé.....	3
2.1.2 Kopr vonný ( <i>Anethum graveolens</i> ).....	4
2.1.2.1 Pěstování kopru vonného.....	5
2.1.2.2 Význam kopru vonného.....	5
2.1.3 Koriandr setý ( <i>Coriandrum sativum</i> ).....	6
2.1.3.1 Pěstování koriandru setého.....	6
2.1.3.2 Význam koriandru setého.....	7
2.1.4 Libeček lékařský ( <i>Levisticum officinale</i> ).....	7
2.1.4.1 Pěstování libečku lékařského.....	8
2.1.4.2 Význam libečku lékařského.....	8
2.2 Bioaktivní látky.....	9
2.2.1 Fenolické sloučeniny.....	10
2.2.1.1 Vlastnosti fenolických sloučenin.....	11
2.2.1.2 Syntéza fenolických sloučenin.....	11
2.2.1.3 Fenolické sloučeniny jako významné antioxidanty.....	12
2.2.2 Flavonoidy.....	13
2.2.2.1 Chemická struktura a výskyt flavonoidů.....	14
2.2.2.2 Klasifikace flavonoidů.....	15
2.2.2.3 Myricetin.....	16
2.2.2.4 Morin.....	17
2.2.2.5 Luteolin.....	18
2.2.2.6 Kvercetin.....	18
2.2.2.7 Apigenin.....	19
2.2.2.8 Kemferol.....	20
2.2.3 Fenolické kyseliny.....	21
2.2.4 Kumariny.....	22
2.2.5 Stilbeny.....	23
2.2.6 Tanniny.....	23
2.2.7 Vitamin C.....	24

2.2.7.1	Význam a výskyt vitamínu C.....	25
2.3	<i>Analytické metody pro stanovení fenolů</i> .....	26
2.3.1	Kapalinová chromatografie .....	26
2.3.1.1	Čerpadla pro HPLC .....	26
2.3.2	Molekulová absorpční spektroskopie v oblasti UV/VIS .....	27
2.3.2.1	Spektrofotometrie .....	27
<b>3.</b>	<b>Metodika práce</b> .....	<b>28</b>
3.1	<i>Rostlinný materiál</i> .....	28
3.2	<i>Úprava materiálu k analýzám</i> .....	28
3.3	<i>Spektrofotometrické stanovení celkových fenolů</i> .....	29
3.3.1	Příprava extraktu.....	29
3.3.2	Stanovení celkového obsahu polyfenolů s činidlem Folin-Ciocalteu .....	29
3.4	<i>Stanovení fenolických sloučenin HPLC metodou</i> .....	30
3.4.1	Stanovení flavonoidních aglykonů v lyofilizovaném materiálu .....	30
3.4.2	Vyhodnocení stanovení s použitím kalibrační závislosti.....	32
3.5	<i>Stanovení obsahu vitamínu C pomocí HPLC metody</i> .....	34
3.5.1	Vyhodnocení stanovení pomocí kalibrační závislosti .....	35
3.6	<i>Použité chemikálie a přístroje</i> .....	36
3.6.1	Chemikálie.....	36
3.6.2	Přístroje a pomůcky .....	36
3.7	<i>Použité statistické programy</i> .....	38
<b>4.</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>39</b>
4.1	<i>Celkový obsah fenolických látek</i> .....	39
4.1.1	Vzorky analyzovaných rostlin-čerstvé .....	39
4.1.2	Vzorky analyzovaných rostlin-sušené .....	41
4.2	<i>Analýza jednotlivých fenolických látek a vitamínu C</i> .....	42
4.2.1	Kvercetin .....	43
4.2.2	Kemferol.....	43
4.2.3	Vitamin C .....	44
<b>5.</b>	<b>Diskuse</b> .....	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>49</b>

<b>7. Seznam literatury .....</b>	<b>50</b>
-----------------------------------	-----------

# 1. Úvod a cíle práce

V bylinkářství a v potravinářství mělo zelené koření už v dávné historii velké uplatnění. Bazalka pravá (*Ocimum basilicum*) se pro své aromatické a lékařské využití pěstuje již několik tisíciletí. Řadí se do čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*) a používá se pro přípravu salátů, omáček a dalších pokrmů. Koriandr setý (*Coriandrum sativum*) je ceněný pro své kulinářské vlastnosti a léčebné využití. Řadí se do čeledi miříkovité (*Apiaceae*) a používá se hlavně k výrobě omáček a sals. Kopr vonný (*Anethum graveolens*) je kategorizován do čeledi miříkovité (*Apiaceae*) a řadí se mezi nejznámější léčivky a pochutiny. Libeček lékařský (*Levisticum officinale*) je léčivá rostlina, která patří do čeledi miříkovitých (*Apiaceae*).

Všechny tyto rostliny jsou hojně užívány v kulinářství. Často se zpracovávají různými kulinářskými úpravami, např. vařením či sušením, a přidávají se do pokrmů. Díky vysokému obsahu biologicky aktivních látek v pletivech mají tyto rostliny různé, farmakologicky příznivé účinky. Především v nich obsažené rostlinné polyfenoly, které jsou významnými antioxidanty, přispívají k prevenci civilizačních chorob.

## **Cílem této bakalářské práce bylo:**

- Zjistit množství celkových i jednotlivých polyfenolů ve výše zmíněných vybraných rostlinách (bazalka pravá, koriandr setý, kopr vonný a libeček lékařský).
- Stanovit u těchto rostlin zeleného koření i obsah další bioaktivní látky - vitamínu C.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Koření

Pojem koření se běžně užívá pro čerstvé, sušené a jinak opracované komponenty některých rostlin, které jsou typické svým velmi intenzivním aromatem a chutí. Díky těmto vlastnostem se koření používá k ochucování pokrmů. Nejdůležitějšími složkami aroma jsou velmi těkavé mono- a seskviterpeny (především různé uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, estery) či fenoly a z nich odvozené ethery. U některých druhů koření se současně vyskytují pálivé látky a některá barviva (Velišek & Hajšlová, 2009b). Zájem o aromatické a léčivé rostliny roste, neboť jejich antioxidačních vlastností je využíváno ve vědeckém výzkumu a také průmyslu. Význam aromatických rostlin jako přírodních antioxidantů je dobře znám. Tyto vlastnosti bylin a rostlin pochází z jejich obsahu fytochemikálií, včetně flavonoidů, karotenoidů, terpenoidů, fenolických kyselin, L-askorbové kyseliny atd. (İsbilir & Sagiroglu, 2011). Pro zelené koření se běžně užívá i pojem kořeninová zelenina. Jsou to rostliny bohaté na silice, současně působí velmi dekorativně. Mezi kořeninovou zeleninu se řadí především bazalka pravá (*Ocimum basilicum*), saturejka zahradní (*Satureja hortensis*), kopr vonný (*Anethum graveolens*), brutnák lékařský (*Borago officinalis*), pelyněk estragon (*Artemisia dracunculus*), kerblík třebule (*Anthriscus cerefolium*), česnek kuchyňský (*Allium sativum*), libeček lékařský (*Levisticum officinale*), majoránka zahradní (*Origanum majorana*), dobromysl obecná (*Origanum vulgare*), petržel zahradní (*Petroselinum crispum*), bedrník obecný (*Pimpinella saxifraga*), šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*), pažitka pobřežní (*Allium schoenoprasum*), tymián obecný (*Thymus vulgaris*), meduňka lékařská (*Melissa officinalis*) a mnohé další (Duží, 1994). Vzhledem k tomu, že se v této práci budu věnovat pouze čtyřem druhům zeleného koření, budou následující kapitoly věnovány právě těmto bylinám: bazalka pravá (*Ocimum basilicum*), kopr vonný (*Anethum graveolens*), koriandr setý (*Coriandrum sativum*) a libeček lékařský (*Levisticum officinale*).

## **2.1.1 Bazalka pravá (*Ocimum basilicum*)**

Bazalka pravá patří mezi aromatické zelené koření (Peleška, 1995). Je to kořenitá bylina, která se pěstuje již několik tisíciletí pro své aromatické a lékařské využití. V současné době roste divoce v tropických a subtropických oblastech včetně střední Evropy, Afriky a jihovýchodní Asie (Pushpangadan & George, 2012). Řadí se do čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*) a dorůstá až do výšky 25-40 cm. Je to polokeř, který se k nám dostal z jižní Asie. U nás se pěstuje jako jednoletá rostlina. Má sladkou vůni a oválné velké lysé listy (Duží, 1994).

### **2.1.1.1 Pěstování bazalky pravé**

Bazalka pravá má ráda vlhkou půdu bohatou na živiny a je velice náročná na dostatek světla a tepla (Steinbach, 1997). Půdy vhodné pro pěstování jsou bohaté hlinité až chudé lateritové, zásadité až mírně kyselé. Dobře odvodněná půda napomáhá lepšímu vegetativnímu růstu. Bazalce vyhovují dlouhé dny a vysoké teploty. Výše uvedené faktory napovídají tomu, že tropické a subtropické podnebí je ideální pro pěstování bazalky (Pushpangadan & George, 2012). Doporučuje se přihnojovat vyzrálým hnojem a kompostem (Steinbach, 1997). Je vhodné si rostlinu předpěstovat v březnovém výsevu v teple a v druhé polovině května přesadit jednotlivě do živné zeminy (Peleška, 1995).

### **2.1.1.2 Význam bazalky pravé**

Bazalka je velkým zdrojem silic a bioaktivních látek. Je vhodná pro přípravu salátů, omáček a dalších pokrmů (Duží, 1994). Esenciální olej z bazalky pravé získávaný destilací se používá v řadě potravinářských výrobků jako dochucovadlo. Pro své aromatické vlastnosti je využívána také v parfumerii. Obsahuje cineol, pinen, methylchavikol, d-kamfor a ocimen (Pushpangadan & George, 2012). Bazalka se používá proti nachlazení, kašli, žaludečním bolestem nebo zácpě. Má antibakteriální účinky a velmi dobře podporuje hojení ran (Steinbach, 1997). Tradičně se používá při léčbě ledvin, jako hemostyptikum při porodu, při bolestech uší, při menstruačních potížích, artritidě, nechutenství, léčbě nachlazení a malárie. Bylo prokázáno, že bazalka působí pozitivně proti virovým, plísňovým, bakteriálním a některým dalším infekcím. Listy bazalky pravé se také

používají při léčbě horečky, kašle, chřipky, astmatu, bronchitidy a průjmu (Shahrajabian et al., 2020).



Obrázek 1: Bazalka pravá (Zdroj: [https://www.magazinzahrada.cz/shutterstock\\_274973366/](https://www.magazinzahrada.cz/shutterstock_274973366/))

### **2.1.2 Kopr vonný (*Anethum graveolens*)**

Kopr se řadí mezi silně aromatické byliny se zelenými, dělenými listy (Steinbach, 1997). Stonek roste do výšky až 1 metru (Peleška, 1995). Kopr vonný je kategorizován do čeledi miříkovité (*Apiaceae*). Jeho původ je v jihovýchodní Asii, ze které doputoval přes Středomoří až k nám do Evropy. Léčivou a velmi žádanou rostlinou a kořením byl už ve starověku (Steinbach, 1997). Kopr vonný se řadí mezi nejznámější léčivky a pochutiny. Obsahuje velké množství vitamínu C, karotenu, listové kyseliny, pantothenové kyseliny, nikotinové kyseliny, éterických silic a dalších látek (Peleška, 1995). Nať je zároveň nejvyšším antioxidačním činitelem v celé rostlině (Isbilir & Sagiroglu, 2011). Vyšší obsah bioaktivních látek má kopr zmražený než čerstvý (Steinbach, 1997). Listy kopru obsahují fosfor, draslík a hořčík. Kromě čerstvých listů se běžně používají také listy sušené. Aroma kopru bylo zkoumáno v mnoha studiích a bylo zjištěno, že hlavními složkami jsou karvon, limonen a *p*-cymen (Isbilir & Sagiroglu, 2011).



### 2.1.2.1 Pěstování kopru vonného

V našich podmínkách se kopr vonný pěstuje jako jednoletá rostlina z důvodu velkých nároků na světlo a teplo. Není však příliš náročný na množství živin, tudíž snese i chudší půdy. Při pěstování je vhodné přidávat do půdy výživný humus v kombinaci s pískem. Doporučuje se kopr nepřelévat (Steinbach, 1997).

### 2.1.2.2 Význam kopru vonného

Kopr vonný (*Anethum graveolens*) je léčivem proti nadýmání a pálení žáhy, má také zklidňující účinky na nervy (Steinbach, 1997). Hojně se využívá především čerstvá nať, která je specifická svou silnou vůní, ale dá se i usušit či naložit v nálevu (Peleška, 1995). V tradiční bylinné medicíně se kopr používá jako diuretikum a také k řešení některých gastrointestinálních problémů, jako je nadýmání, střevní křeče a různé zažívací potíže. Kopr vonný je významná aromatická bylina, která se používá k ochucení různých potravin, jako jsou saláty, omáčky, polévky, a zejména se přidává do nakládaných okurek (Isbilir & Sagiroglu, 2011). Rovněž zvyšuje chuť k jídlu, pomáhá při odkašlávání a snižuje krevní tlak (Peleška, 1995).



Obrázek 2: Kopr vonný (Zdroj: <https://www.ifauna.cz/drubez/clanky/r/detail/8187/poklady-z-prirody-50-kopr-vonny/>)

### 2.1.3 Koriandr setý (*Coriandrum sativum*)

Koriandr setý je ceněný pro své kulinářské vlastnosti a léčebné využití. Název rostliny je ve skutečnosti odvozen z řeckého slova Korion, což znamená brouk (Sahib et al., 2012). U nás se pěstuje jako jednoletá rostlina, která se řadí do čeledi miříkovité (*Apiaceae*). Koriandr setý je poměrně houževnatá bylina, jež se k nám dostala z východního Středomoří (Steinbach, 1997). Výška rostliny se může pohybovat mezi 20 a 140 cm v závislosti na agroklimatických podmínkách (Sahib et al., 2012). Je jednou z nejstarších bylin, která se používá již více než 3 000 let, a to jak pro kulinářské, tak i léčebné účely (Ishikawa et al., 2003 in Sahib et al., 2012). Tato bylina je hojně pěstovaná v severní Africe, na Blízkém východě a se vzrůstajícím zájmem i v západní Evropě. Běžně se používají jeho čerstvé listy, ale i suchý prášek z plodů, které známe pro své organoleptické a chuťové vlastnosti (Barros et al., 2012). Listy mohou mít nepříjemnou vůni, kdežto vůně plodů je příjemná (Steinbach, 1997). Koriandr je zdrojem celé řady polyfenolů a dalších látek, jež jsou v něm obsaženy. Tyto sloučeniny souvisí s vysokou antioxidační aktivitou koriandru setého a s jeho využitím při zažívacích potížích, revmatismu, prevenci poškození peroxidací lipidů aj. (Barros et al., 2012). Ve svých pletivech obsahuje až čtyřnásobnou koncentraci karotenu a vápníku, než se nachází ve stejném množství v mrkvi. Plody koriandru setého obsahují až 30 % silic. Mletý koriandr je hlavní složkou kari (Steinbach, 1997). Ve svých pletivech disponuje různými fotochemikáliemi, jako jsou linalool, který je hlavní složkou esenciálního oleje, kafr, geraniol a geranylacetát (Barros et al., 2012). Rostlina je také potenciálním zdrojem lipidů bohatých na petroselinovou kyselinu (Sahib et al., 2012). Koriandr setý má obecně velmi obdobné vlastnosti, jako má kmín (Steinbach, 1997).

#### 2.1.3.1 Pěstování koriandru setého

Je známo, že koriandr setý je ideální pěstovat mezi říjnem a únorem, avšak v našich podmínkách v ČR je vhodné začít s pěstováním s příchodem jara. Kvete od června do července. V rané fázi růstu vyžaduje rostlina koriandru chladnější klima, v pozdějších fázích pak teplé počasí. Nejvhodnější jsou hlinité až středně těžké půdy s žádnou, nebo minimální závlahou (Sahib et al., 2012). Může se

předpěstovávat anebo přímo vysévat (Steinbach, 1997). Koriandr se pěstuje komerčně v Polsku, Rumunsku, České republice, Guatemale, Mexiku a Argentíně. Indie je jedním z hlavních producentů jeho semen (Sahib et al., 2012).

### 2.1.3.2 Význam koriandru setého

Koriandr je velmi užívaný pro svůj vysoký obsah proteinů, minerálních látek a vitamínu C (Steinbach, 1997). Rostlina koriandru setého se používá hlavně k výrobě omáček a sals, plody se používají v podobě prášku k ochucení masných produktů, ryb, limonád a nakládaných okurek. Dále je koriandr setý běžně využíván v pekařství a při přípravě nápojů. Jeho esenciální olej se používá také ve farmaceutických recepturách, nebo jako vonná látka v kosmetice. Koriandr má chelatační vlastnosti a působí tedy jako farmaceutická látka při odstraňování těžkých kovů (Barros et al., 2012). Díky přítomnosti mnoha bioaktivních látek má širokou škálu farmakologických aktivit v různých částech této rostliny. Mezi tyto aktivity se řadí antimikrobiální, antioxidační, antidiabetické, anxiolytické, antiepileptické, antidepressivní, antimutagenní, protizánětlivé, antidyslipidemické, antihypertenzní, neuroprotektivní a diuretické vlastnosti (Sahib et al., 2012).



Obrázek 3: Koriandr setý (Zdroj: <https://www.ifauna.cz/drubez/clanky/r/detail/8414/poklady-z-prirody-63-koriandr-sety/>)

### 2.1.4 Libeček lékařský (*Levisticum officinale*)

Podle své specifické vůně připomínající celer a mohutného kořenu, by se libeček mohl řadit mezi kořenovou zeleninu. Nicméně je to pochutina a léčivá rostlina, která se řadí k zelenině kořeninové. Pochází z přední Asie (Peleška, 1995).

Libeček lékařský je poměrně statná bylina se silným kořenovým systémem. Ve stáří je kořen libečku lékařského vícehlavý a má dvakrát až třikrát zpeřené, tmavě zelené listy. Řadí se do čeledi miříkovitých (*Apiaceae*). Jeho květenstvím jsou kulovité žluté okolíky (Steinbach, 1997). Vlastnosti libečku lékařského jsou podobné andělice lékařské, avšak libeček je jako bylina méně známý (Mirjalili & Javanmardi, 2012). Libeček lékařský je vytrvalou rostlinou, která dorůstá do výšky až 2 metrů. Díky svému mohutnému kořenovému systému má velké nároky na prostor. Libeček lékařský je známý obsahem vitamínu C, karotenu, cukrů i silic s terpineolem. Je po staletí vyhledáván pro své blahodárné účinky (Duží, 1994). Na našem území je nejhojněji zastoupena odrůda *Magnus*, která je rovněž zapsaná do sortimentu léčivých rostlin (Steinbach, 1997).

#### **2.1.4.1 Pěstování libečku lékařského**

Libeček lékařský je bylina teplomilná, avšak vzdoruje i mrazům (Steinbach, 1997). Velice prosperuje v hlubokých půdách, které jsou bohaté na množství pohotovostních živin (Duží, 1994). Půda by měla být dostatečně vlhká, propustná a humózní se slabě kyselým až neutrálním pH. Na jednom stanovišti roste i několik let. Doporučuje se rostlinu nepřesazovat a každoročně přihnojovat kompostem (Steinbach, 1997). Před samotným pěstováním se půda nejdříve připravuje orbou hlubokou 30-50 cm. Přímá aplikace organických hnojiv se pro libeček nedoporučuje (Mirjalili & Javanmardi, 2012). Nažkami i dělením trsů se velice snadno rozmnožuje, tudíž na mnoha místech samovolně zplaňuje (Peleška, 1995).

#### **2.1.4.2 Význam libečku lékařského**

Esenciální oleje z listů, plodů a kořenů libečku lékařského se používají především v potravinářském, nápojovém, parfémovém a tabákovém průmyslu. Tato rostlina se hojně využívá také jako aromatická přísada do různých likérů a bylinných omáček (Mirjalili & Javanmardi, 2012). Čerstvé i sušené listy se velmi často využívají jako naťová zelenina sloužící k dochucování polévek a omáček. Za léčivou bylinu je libeček považován díky kořenu, který podporuje trávení a působí močopudně. Řadu let se užívá při menstruačních potížích (Duží, 1994). Podporuje

zažívání, vylučování solí z těla, činnost žlučníku, mírní nadýmání a únavu nervové soustavy (Peleška, 1995).



Obrázek 4: Libeček lékařský

(Zdroj: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Liebst%C3%B6ckel.JPG>)

## 2.2 Bioaktivní látky

Rostliny jsou spojovány s lidským zdravím od nepaměti a jsou důležitým zdrojem léčiv již od dob začátku lidské civilizace. Rostliny stále zůstávají jedním z hlavních zdrojů léčiv v moderních i v tradičních systémech medicíny (Maobe et al., 2012). Bioaktivní sloučeniny jsou sloučeniny produkované rostlinami, které mají farmakologické nebo toxikologické účinky na člověka a další organismy. Jsou typicky produkovány jako sekundární metabolity. Definici bioaktivních sloučenin v rostlinách lze definovat jako sekundární rostlinné metabolity vyvolávající farmakologické nebo toxikologické účinky u člověka a zvířat (Bernhoft et al., 2010). Bioaktivní látky jsou rostlinné chemikálie v ovoci, zelenině, obilovinách a dalších rostlinných potravinách, které mohou poskytovat

žádoucí zdravotní výhody nad rámec základní výživy a které snižují riziko závažných chronických onemocnění (Liu, 2013). Tyto fytochemikálie mají různě prospěšné účinky, jako jsou antioxidační, antimikrobiální, protizánětlivé, působí preventivně proti rakovině, antidiabetické a antihypertenzní účinky (Maobe et al., 2012). Bioaktivní látky lze rozdělit do širokých kategorií, jako jsou fenoly, alkaloidy, sloučeniny obsahující dusík, organosírné sloučeniny, fytosteroly, karotenoidy aj. Z těchto fytochemických skupin jsou nejvíce studovány fenoly (Liu, 2013). Některé bioaktivní sloučeniny zastávají v živých rostlinách důležité funkce. Například flavonoidy mohou chránit před volnými radikály vznikající různou cestou. Terpenoidy mohou přitahovat opylovače nebo roznašeče semen či inhibovat konkurenční rostliny. Alkaloidy obvykle chrání rostlinu před útoky býložravců nebo hmyzu. Další sekundární metabolity fungují jako buněčné signální molekuly nebo mají jiné funkce v rostlinách. Většina rostlin, dokonce i běžné a krmné rostliny, je schopna takové sloučeniny produkovat. Hlavní skupiny bioaktivních sloučenin v rostlinách se klasifikují podle různých kritérií (Bernhoft et al., 2010). Více než 5000 těchto bioaktivních látek bylo izolováno a následně identifikováno v ovoci, zelenině a obilovinách, avšak velké procento zůstává stále neznámé (Liu, 2013).

### **2.2.1 Fenolické sloučeniny**

Fenolické látky jsou definovány jako sloučeniny s jedním nebo více aromatickými kruhy a s jednou nebo více hydroxylovými skupinami ve struktuře. Obecně se dělí na fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny, kumariny a třísloviny. Fenolické látky jsou produkty sekundárního metabolismu rostlin. Zajišťují základní funkce při rozmnožování a růstu rostlin a působí jako obranné mechanismy proti patogenům, parazitům, predátorům a UV záření. Rovněž přispívají k barvě rostlin (Liu, 2013). Fenolické sloučeniny jsou považovány za skupinu látek, která je syntetizována rostlinami během vývoje i v průběhu života v reakci na podmínky, jako jsou infekce, poranění a UV záření. Jsou spojeny s různými funkcemi, včetně příjmu živin, syntézy proteinů, enzymovou aktivitou a fotosyntézou (Maobe et al., 2012). Odhaduje se, že příjem fenolů může být až 1 g/den, přičemž fenolové kyseliny tvoří přibližně třetinu celkového příjmu a flavonoidy představují většinu ze

zbývajících dvou třetin. Hlavním zdrojem fenolů je především ovoce, nápoje (ovocné šťávy, víno, čaj, káva a další), v menší míře zelenina, suché luštěniny a obiloviny (Bernhoft et al., 2010). Nicméně fenoly jsou látky, které se vyskytují téměř ve všech potravinách. Představují velmi různorodou skupinu látek, z nichž některé mají vonný charakter. Jde konkrétně o některé jednoduché fenoly vznikající degradační cestou fenolových kyselin, aldehydy a alkoholy, které vznikají redukcí fenolových kyselin a další deriváty hydroxyfenolových kyselin, např. kumarin. Fenolické sloučeniny jsou řazeny mezi takzvané chuťové látky. Patří mezi ně jednoduché fenoly, ale i polyfenoly, kterými jsou např. kondenzované třísloviny, jimž se jinak říká flavolany (mající trpkou chuť), přírodní barviva (jednotlivé chinony, lignany, flavonoidy a jim příbuzné stilbeny, xanthony aj.) (Velíšek & Hajšlová, 2009b).

### **2.2.1.1 Vlastnosti fenolických sloučenin**

Fenolické sloučeniny mají schopnost zpomalovat oxidaci lipidů v potravinách a biologických membránách, plní tedy funkci antioxidantů (Melo et al., 2005). Některé fenoly vykazují významnou biologickou aktivitu, jako fytoalexiny, které fungují jako obranné látky rostlin (Velíšek & Hajšlová, 2009b). Kromě své úlohy v rostlinách plní fenolické sloučeniny také funkci v naší stravě. Mohou přinášet zdravotní výhody spojené se snížením rizika vzniku chronických onemocnění (Liu, 2013). Fenoly vykazují řadu zdravotně prospěšných účinků na lidské zdraví. Mají biologické a farmakologické účinky, zejména antimikrobiální, antimutagenní a antikarcinogenní. Jsou aktivní při léčení ledvin a žaludečních potíží, jsou také užitečné jako protizánětlivé látky (Maobe et al., 2012). Většina fenolů má antioxidační vlastnosti a patří mezi nejhojněji zastoupené antioxidanty v naší stravě (Bernhoft et al., 2010). Mezi hlavní zdroje antioxidantů se uvádí ovoce a zelenina (Dimitrios, 2006).

### **2.2.1.2 Syntéza fenolických sloučenin**

Většina sekundárních metabolitů s antioxidačními vlastnostmi, včetně rozmanité skupiny fenolických sloučenin, jsou syntetizovány cestou šikimové kyseliny (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011). Šikimová kyselina, systematickým

názvem (3*R*,4*S*,5*R*)-3,4,5-trihydroxycyklohex-1-en-1-karboxylová kyselina, je zásadním meziproduktem biosyntézy fenolových kyselin (Velíšek & Hajšlová, 2009b). Kromě těchto sekundárních sloučenin poskytuje dráha šikimové kyseliny prekurzory pro mnoho všudypřítomných sloučenin důležitých pro rostliny, jako jsou například strukturní prvek lignin, růstový hormon indolactová kyselina, chinony elektronového transportního řetězce a zásobní látky, jako je např. kafeoylchinát (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011). Šikimová kyselina byla nejdříve detekována v plodech badyániku pravého (*Illicium verum*), který roste v Japonsku a jeho japonský název dal jméno této sloučenině (Svršek, 1997 in Vachová, 2012). První klíčový krok v cyklu šikimové kyseliny je kondenzace erytros-4-fosfátu z pentosového fosfátu. Cyklus šikimové kyseliny vede k tvorbě tří aromatických aminokyselin: tryptofan, tyrosin a fenylalanin. Většina tříd fenolických sloučenin je odvozena od fenylalaninu, ačkoli hydrolyzovatelný tanin je přímo syntetizován přes gallovou kyselinu. Produkce fenolických sloučenin je katalyzována fenylalanin-amoniak-lyázou (PAL), přičemž PAL je klíčovým vstupním enzymem (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011).

### **2.2.1.3 Fenolické sloučeniny jako významné antioxidanty**

Pod pojmem antioxidant si mnoho lidí představuje různé věci. Věda zaměřující se na potraviny velmi často chápe tento pojem jako inhibitor peroxidace lipidů. Volné radikály, které při peroxidaci lipidů vznikají, poškozují mnoho struktur, včetně bílkovin, DNA a dalších důležitých molekul. Proto je třeba použít širší definici, v níž antioxidant je jakákoliv látka, která, pokud je přítomna v nízkých koncentracích ve srovnání s koncentracemi oxidovaného substrátu, významně zpomaluje nebo zabraňuje oxidaci tohoto substrátu (Halliwell, 1995). Volné radikály a další reaktivní formy kyslíku pocházejí buď z běžných základních metabolických procesů v lidském těle nebo z vnějších zdrojů. Jsou to atomy, molekuly nebo ionty s nepárovanými elektrony, které jsou vysoce aktivní vůči chemickým reakcím s jinými molekulami. V biologickém systému jsou volné radikály často odvozeny od molekul obsahujících kyslík, dusík a síru. Tyto volné radikály jsou součástí skupin molekul nazývaných reaktivní formy kyslíku (ROS), reaktivní formy dusíku (RNS) a reaktivní sírné sloučeniny (RSS) (Kostova et al., 2011). Podle Velíška a Hajšlové (2009b) jsou antioxidanty chemické látky, které



zabraňují znehodnocení potravin vlivem oxidace a prodlužují tak údržnost potravin. Jsou to sloučeniny, které mohou reagovat s volnými radikály autooxidačního řetězce, především s peroxydovými radikály (Velíšek & Hajšlová, 2009a). Oxidačními procesy probíhá žluknutí přítomných tuků a dalších, snadno oxidovatelných látek v potravě. Oxidace tuků způsobuje další chemické odlišnosti v potravinách, jež negativně ovlivňují jejich výživovou, hygienicko-toxikologickou a senzoryckou hodnotu (vůni, chuť, barvu). Antioxidanty fungují na základě tří principů dle Velíška & Hajšlové (2009b) tak, že:

- reagují s volnými radikály (primární antioxidanty) nebo redukují vzniklé hydroperoxydy (sekundární antioxidanty)
- váží do komplexů kovy s katalytickou funkcí
- eliminují přítomný kyslík

Dále se antioxidanty klasifikují podle původu na přírodní a syntetické. Dalšími klasifikacemi antioxidantů je kategorizace podle struktury na fenolové antioxidanty a endioly. Tyto klasifikace nejsou příliš významné a nevyužívají se často. Mezi hlavní primární antioxidanty se řadí: askorbová kyselina (vitamin C), erythorbová kyselina a její deriváty, tokoferoly, fenolové sloučeniny a galláty. Sekundárními antioxidanty jsou především: cystein, peptidy s cysteinem ve své struktuře, např. glutathion, methionin, lipoová kyselina a další (Velíšek & Hajšlová, 2009b).

### **2.2.2 Flavonoidy**

Flavonoidy jsou látky, které se vyskytují v cévnatých rostlinách, z nichž je více než 8000 známých sloučenin. V rostlinách působí jako antioxidanty, antimikrobiální látky, fotoreceptory, vizuální atraktory, repelenty, plní také funkci ochrany před světlem. Mnoho studií naznačuje, že flavonoidy vykazují biologické aktivity, včetně antialergických, antivirových, protizánětlivých a vazodilatačních účinků (Pietta, 2000). Flavonoidy se řadí mezi velmi významnou skupinu

pigmentů, jejíž součástí jsou i karotenoidy a tetrapyroly, tedy hemová a chlorofylová barviva (Merken & Beecher, 2000 in Vachová, 2012). Hlavní funkcí flavonoidů v květech je poskytovat barvy atraktivní pro opylovače rostlin. Stále více se předpokládá, že tyto sloučeniny podporují fyziologické přežití rostliny a chrání ji např. před houbovými patogeny a UV-B zářením. Kromě toho se flavonoidy podílejí na fotosenzibilizaci, přenosu energie, působení rostlinných růstových hormonů regulujících růst, řízení respirace a fotosyntézy, morfogenezi a také určování pohlaví (Cushnie & Lamb, 2005). Flavonoidy inhibují enzymy zodpovědné za produkci superoxidových aniontů, jako je xantinoxidáza. Prokázalo se, že flavonoidy blokují produkci cyklooxygenázy, lipoxygenázy, mikrosomální monooxygenázy, glutathion S-transferázy, mitochondriální sukcinoxidázy a NADH oxidázy, které se podílejí na vzniku reaktivního kyslíku (Pietta, 2000). Řada flavonoidů účinně chelatuje stopové kovy (Cu, Fe), které hrají důležitou roli v metabolismu kyslíku (Cushnie & Lamb, 2005). Stejně jako fenolické kyseliny jsou flavonoidy sekundárními metabolity rostlin s polyfenolickou strukturou. Jsou syntetizovány polypropanoidní cestou, kdy výchozí látkou je kódovaná aminokyselina fenylalanin (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011). Flavonoidy jsou tedy syntetizovány z fenylalaninu a obecně jsou charakteristické rozličnými barvami ve kvetoucích částech rostlin (Yao et al., 2004).

### 2.2.2.1 Chemická struktura a výskyt flavonoidů

Flavonoidní sloučeniny jsou kategorizovány jako velmi obsáhlá třída rostlinných fenolů, jež má v molekule dvě benzenová jádra (kruh A a C) spojená tříuhlíkatým řetězcem. U převážné části flavonoidů je C<sub>3</sub> řetězec spojený do heterocyklického kruhu odvozeného od 2*H*-pyranu (kruh C). Tyto látky jsou tedy odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny 2*H*-chromenu, jež je substituován v poloze C-2 fenylovou skupinou, který se nazývá flavan. Uspořádání flavonoidů má tuto strukturu: C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Sloučeniny s takto uspořádanými molekulami se obvykle nazývají 1,3-diarylpropanoidy. Velmi často jsou všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami, v nichž jsou jednotlivé deriváty rozlišovány pouze stupněm oxidace a substituce. Flavonoidy se vyskytují buď volně, anebo vázané ve formě glykosidů, acylovaných glykosidů a polymerů

(Velíšek & Hajšlová, 2009b). Flavonoidy jsou nejběžnějšími a nejrozšířenějšími skupinami rostlinných fenolických sloučenin, které se vyskytují téměř ve všech rostlinách, a to ve všech jejich částech, zejména pak ve fotosyntetizujících rostlinných buňkách. Ovoce a zelenina spolu s čajem a vínem jsou pro člověka hlavními zdroji flavonoidů (Yao et al., 2004). Kromě různých druhů zeleniny a ovoce jsou flavonoidy bohatě obsaženy v semenech, ořeších, obilovinách, koření, různých léčivých přípravcích a v nižším množství i v pivu (Pietta, 2000).

#### **2.2.2.2 Klasifikace flavonoidů**

Flavonoidy se dělí nejméně na 10 chemických skupin (Yao et al., 2004). Jsou charakteristické obrovskou rozmanitostí chemických sloučenin a jejich klasifikaci zpracovávají autoři různě (Vachová, 2012). Velíšek & Hajšlová (2009b) rozdělují flavonoidy podle stupně oxidace  $C_3$  řetězce a jeho substituce do následujících kategorií:

- katechiny (flavan-3-oly)
- leukoanthokyanidiny (flavan-3,4-dioly)
- flavanony
- flavanonoly
- flavony
- flavonoly (dihydroflavony)
- anthokyanidiny

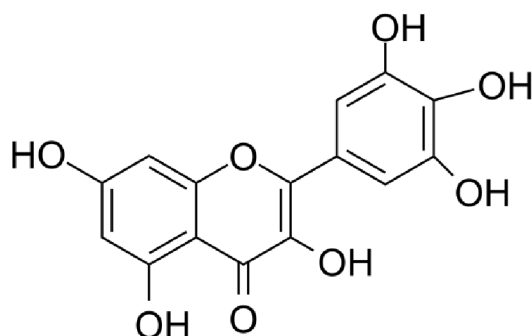
Existuje několik případů, ve kterých se nachází šestičlenný heterocyklický kruh B jako otevřená isomerní forma, nebo je vyměněn za pětičlenný heterocyklický kruh. Existují tedy strukturně podobné sloučeniny, u kterých jsou kruhy A a C spojeny alifatickým  $C_3$  řetězcem. V opačném případě jsou kruhy A a C spojeny řetězcem, jež je součástí furanového cyklu. Tyto flavonoidy s podobnou strukturou se dále klasifikují:

- chalkony a dihydroxychalkony
- aurony

Dále existují flavonoidy, které nejsou tak běžné, jako výše uvedené sloučeniny. Jsou to např. isoflavonoidy a neoflavonoidy, jež jsou odvozeny od isoflavanu a neoflavanu (Velíšek & Hajšlová, 2009b).

### 2.2.2.3 Myricetin

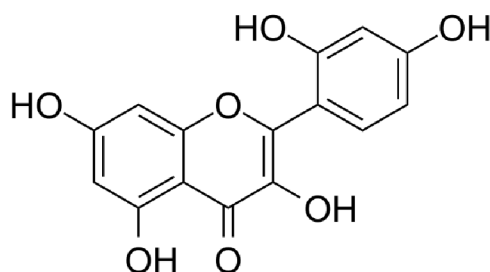
Myricetin je přírodní bioflavonoid, jehož výskyt v přírodě je hojně rozšířen v rostlinách včetně čaje, bobulovin, ovoce, zeleniny a léčivých rostlin (Ong & Khoo, 1997). Je to přirozeně se vyskytující flavonol s hydroxylem v polohách 3, 5, 7, 3', 4' a 5' (Wollenweber, 1982 in Ong & Khoo, 1997). Flavonoid myricetin se v bobulovinách, zelenině a ovoci vyskytuje převážně ve formě glykosidů, nikoli volného aglykonu a jeho obsah v bobulích se výrazně zvyšuje s jejich zráním (Ong & Khoo, 1997). V běžné stravě myricetin pravidelně konzumujeme zejména v zelenině, ovoci a nápojích, jako je čaj a víno (Hertog et al., 1993b in Ong & Khoo, 1997). Část zkonsumovaného myricetinu je vstřebávána gastrointestinálním traktem, zatímco zbytek je metabolizován gastrointestinální mikroflórou (Leibovitz a Mueller, 1993 in Ong a Khoo, 1997). V lékařském využití se přisuzuje role myricetinu jako antioxidantu. Bylo prokázáno, že myricetin odstraňuje radikály z těla generované enzymatickými i neenzymatickými systémy. Navzdory své pověsti antioxidantu má myricetin také prooxidační vlastnosti (Ong & Khoo, 1997). Myricetin může chránit lipidy před oxidačním poškozením, jak bylo uvedeno výše, ale má také potenciál zvyšovat poškození nelipidových složek, jako jsou sacharidy a DNA (Smith et al., 1992 in Ong & Khoo, 1997). Dále bylo zjištěno, že myricetin snižuje riziko vzniku kožních nádorů vyvolané polycyklickými aromatickými uhlovodíky (Mukhtar et al., 1988 in Ong & Khoo, 1997). Kromě toho může být myricetin prospěšný jako protizánětlivý, antiaterosklerotický a antitrombotický prostředek (Ong & Khoo, 1997).



Obrázek 5: Myricetin (Zdroj: <https://www.medchemexpress.com/Myricetin.html>)

#### 2.2.2.4 Morin

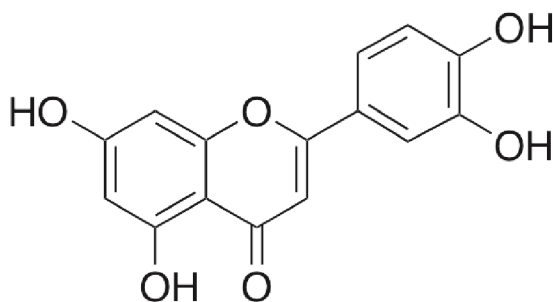
Morin je přírodní polyfenol, původně izolovaný z čeledi morušníkovité (*Moraceae*). Systematickým názvem 3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavon, je flavonol morin izolovaný jako žlutý pigment v rostlinách patřících do čeledi morušníkovité (*Moraceae*). Několik důkazů prokázalo, že morin může příznivě působit na několik lidských onemocnění. Morin totiž působí antioxidačně, antidiabeticky, protizánětlivě, protinádorově, antihypertenzivně, antibakteriálně, hypourikemicky a neuroprotektivně tím, že moduluje aktivitu mnoha enzymů. Morin se běžně vyskytuje v několika druzích ovoce a zeleniny, jako jsou mandlové slupky, guava (*Psidium guajava L.*), listy, maklura barvířská (*Chlorophora tinctoria*), mandloň obecná (*Prunus dulcis*), maklura oranžová (*Maclura promifera*), cibule, jablka, některé nápoje, jako je čaj nebo červené víno, mořské řasy, káva a obilná zrna. Kromě toho představuje jednu ze složek několika tradičních rostlinných léčivých přípravků (Caselli et al., 2016).



Obrázek 6: Morin (Zdroj: <https://www.medchemexpress.com/morin.html>)

### 2.2.2.5 Luteolin

Luteolin, systematickým názvem 3',4',5,7-tetrahydroxyflavon, patří do skupiny přirozeně se vyskytujících sloučenin zvaných flavonoidy, které se hojně vyskytují v rostlinné říši. Luteolin, jenž je součástí skupiny flavonů, má strukturu C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> a má tedy základní skladbu flavonoidní molekuly, jako jsou např. dva benzenové kruhy (A, B), třetí kruh obsahující kyslík (C) a dvojná vazba mezi uhlíky 2-3. Luteolin má hydroxylové skupiny na uhlících v polohách 5, 7, 3' a 4'. Hydroxylové substituenty a dvojná vazba jsou důležitými strukturálními prvky luteolinu, které souvisejí s jeho biochemickými a biologickými aktivitami. Stejně jako u jiných flavonoidů je luteolin v rostlinách často glykosylován a glykosid je během absorpce hydrolyzován na volný luteolin. Určitá část luteolinu se při průchodu střevem přeměňuje na glukuronidy. Zelenina a ovoce, především celer, petržel, brokolice, cibulové listy, mrkev, paprika, zelí, slupky jablek a květy chryzantém jsou na luteolin velmi bohaté. Rostliny s velkým množstvím luteolinu ve svých pletivech byly používány v tradiční čínské medicíně při léčbě hypertenze, zánětlivých onemocnění a rakoviny. Spolu s dalšími flavonoidy má i luteolin antioxidační účinky. Mezi další přínosné účinky luteolinu se uvádí protizánětlivé a protinádorové vlastnosti (Lin et al., 2008).

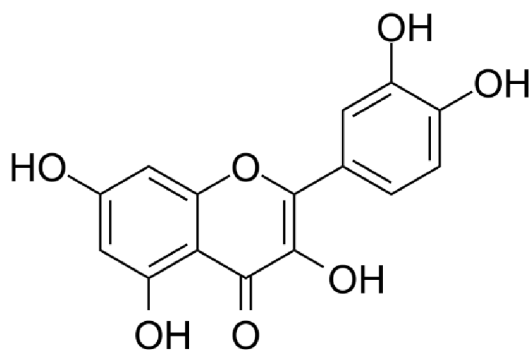


Obrázek 7: Luteolin (Zdroj: <https://lktlabs.com/product/luteolin/>)

### 2.2.2.6 Kvercetin

Kvercetin je sloučenina polyfenolické povahy řadící se do skupiny flavonoidů, konkrétně do třídy flavonolů. Jeho systematický název je 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-

3,5,7-trihydroxychromen-4-on. Velmi často se nachází jako součást bioflavonoidních glykosidů v podobě aglykonové složky. Jeho struktura se skládá ze dvou benzenových jader a jednoho heterocyklického řetězce s kyslíkem situovaným uprostřed. Kvercetin disponuje jasně žlutou barvou. Jeho čistá forma jsou jehlovité krystalky. Ve vodě je jen velmi málo rozpustný. V roztocích s alkoholem má velmi hořkou chuť. V naší stravě je kvercetin převážně v glykosidické formě. Je přítomný v kůře dubu sametového (*Quercus velutina*) a užívá se jako přírodní barvivo (Válková, 2017). Je považován za nejčastější flavonoidní aglykon vůbec.

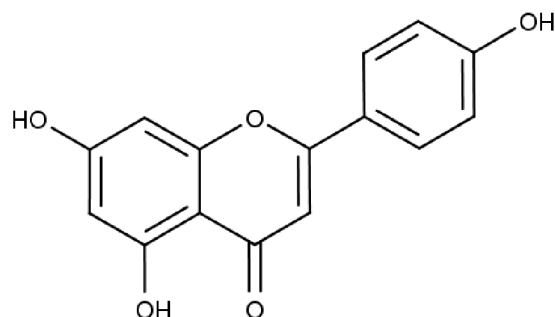


Obrázek 8: Kvercetin (Zdroj: <https://www.medchemexpress.com/Quercetin.html>)

#### 2.2.2.7 Apigenin

Apigenin, jehož systematickým názvem je 4,5,7-trihydroxyflavon, patří mezi nejrozšířenější flavonoidy v rostlinách a formálně patří do třídy flavony. Rostliny patřící do čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*), jako jsou například rostliny patřící do rodu pelyněk (*Artemisia*), řebříček (*Achillea*), heřmánek (*Matricaria*) a vratič (*Tanacetum*), jsou hlavními zdroji této sloučeniny (Salehi et al., 2019). Apigenin je přirozeně se vyskytující rostlinný flavon, hojně zastoupený v běžném ovoci a zelenině. Je považován za bioaktivní flavonoid, u něhož byly prokázány protizánětlivé, antioxidační a protirakovinné účinky. Epidemiologické studie naznačují, že strava bohatá na flavony je spojena se sníženým rizikem vzniku některých druhů rakoviny, zejména rakoviny prsu, zažívacího traktu, kůže, prostaty a některých dalších nádorů. Předpokládá se, že apigenin může mít ochranný účinek i u jiných onemocnění, které jsou ovlivněny oxidačním

procesem, jako jsou kardiovaskulární a neurologické poruchy (Shukla & Gupta, 2010).

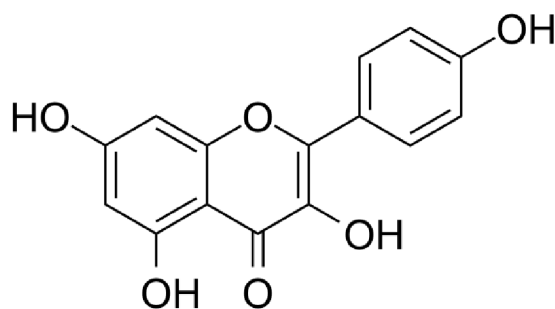


Obrázek 9: Apigenin (Zdroj: <https://cymitquimica.com/products/11-1102S/520-36-5/apigenin/>)

#### 2.2.2.8 Kemferol

Kemferol, systematickým názvem 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)-4H-1-benzopyran-4-on), je flavonoid, který se vyskytuje v mnoha rostlinných potravinách, např. v čaji, brokolici, zelí, kapustě, fazolích, endivii, pórku, rajčatech, jahodách, hroznech i v rostlinách či rostlinných produktech běžně používaných v tradiční medicíně. Je to žlutá sloučenina s nízkou molekulovou hmotností. Odhaduje se, že příjem tohoto flavonoidu v lidské stravě může být až 10 mg/den. Četné preklinické studie prokázaly, že kemferol a některé glykosidy kemferolu mají širokou škálu farmakologických účinků, včetně antioxidačních, protizánětlivých, antimikrobiálních, protinádorových, kardioprotektivních, neuroprotektivních, antidiabetických, antiosteoporotických, estrogeních nebo antiestrogeních, anxiolytických, analgetických a antialergických (Calderon-Montaño et al., 2011).





Obrázek 10: Kemferol (Zdroj: <https://www.medchemexpress.com/Kaempferol.html>)

### 2.2.3 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny jsou sekundární metabolity běžně se vyskytující v potravinách rostlinného charakteru (Mattila & Hellström, 2007). Fenolické kyseliny tvoří jednu z nejrozšířenějších skupin rostlinných fenolických látek. Dodávají zelenině a ovoci jedinečnou chuť, vůni a zdraví prospěšné vlastnosti (Tomas-Barberan & Espin, 2001 in Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011). Zvýšení obsahu fenolických látek v těchto rostlinách může zlepšit jejich kvalitu (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011). Množství hlavních fenolických kyselin se v průběhu růstu a zrání plodů v různých druzích ovoce kvantitativně i kvalitativně mění (Velíšek & Hajšlová, 2009b). Převládajícími fenolickými kyselinami v rostlinách jsou substituované deriváty hydroxybenzoové kyseliny a hydroxyskořicové kyseliny, přičemž deriváty hydroxyskořicové kyseliny jsou častější (Mattila & Hellström, 2007). Skořicová kyselina je poměrně hojně zastoupená nenasycená aromatická kyselina (Velíšek & Hajšlová, 2009b). Fenolické kyseliny jsou v rostlinných potravinách přítomny převážně ve formě vázané. Nejběžnějšími hydroxyskořicovými kyselinami jsou např. kyseliny kávová, *p*-kumarová a ferulová, jež se často vyskytují v potravinách jako jednoduché estery s chinonovou kyselinou nebo glukózou. Pravděpodobně nejznámější vázaná hydroxyskořicová kyselina je chlorogenová kyselina. Na rozdíl od hydroxycinamátů jsou deriváty hydroxybenzoové kyseliny přítomny v některých potravinách především ve formě glykosidů (Mattila & Hellström, 2007). Dalšími formami vázané skořicové kyseliny mohou být estery a amidy (Velíšek & Hajšlová, 2009b). Většina z nich je syntetizována přeměnou L-fenylalaninu na

trans-skořicovou kyselinu prostřednictvím enzymu fenylalanin amoniak lyázou (PAL), jejíž koncentrace se zvyšuje v reakci na poranění. Je známo, že fenolické kyseliny vykazují antimikrobiální aktivitu vůči řadě mikroorganismů (Wen et al., 2003). Stejně jako polyfenoly jsou fenolické kyseliny silnými antioxidanty a vykazují antibakteriální, antivirové, antikarcinogenní, protizánětlivé a vazodilatační účinky (Mattila & Hellström, 2007). Kromě toho fenolické kyseliny spolu s flavonoidními látkami hrají důležitou roli v boji proti dalším lidským onemocněním. Byly prokázány další farmakologické aktivity fenolických kyselin. Podporují vylučování žluči, snižují krevní hladiny cholesterolu a lipidů, vykazují antimikrobiální aktivitu proti některým kmenům bakterií, jako je *Stafylococcus aureus* (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh, 2011).

#### **2.2.4 Kumariny**

Kumariny jsou dobře známá skupina přirozeně se vyskytujících sloučenin. Tyto sloučeniny vykazují pozoruhodnou škálu biochemických a farmakologických účinků, z nichž někteří členové této skupiny sloučenin naznačují, že mohou významně ovlivňovat funkci různých orgánů buněčných systémů savců. Vývoj kumarinů jako antioxidantů látek přitahuje v posledních letech velkou pozornost (Kostova et al., 2011).  $\delta$ -Laktony jsou velmi podivuhodnou skupinou odvozenou od *o*-hydroxyskořicových kyselin, která se nazývá kumariny se svým skeletem 2H-benzopyran-2-onu, kterému se jinak přezdívá chromen-2-on nebo 5,6-benzo-2-pyron. Je známo více než tisíc kumarinů, jež se vyskytují volně v přírodě. Avšak vonný charakter má jenom základní člen homologické řady kumarinů, a to kumarin. V materiálech rostlinného původu se vyskytuje mnoho netěkavých hydroxy- a methoxysubstituovaných kumarinů a jejich glykosidů. Tyto kumariny vykonávají svoji roli, jako fytoalexiny neboli obranné látky rostlin (isokumariny, furanokumariny, pyranokumariny a další). Většina kumarinů má biologickou aktivitu a jsou přirozenými toxickými složkami potravin (Velíšek & Hajšlová, 2009b).

## 2.2.5 Stilbeny

Stilbeny jsou chemické látky, jež se systematicky nazývají diarylethanoidy a jsou taktéž sekundárními metabolity rostlin se strukturou C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>. V zanedbatelném množství se spolu s glykosidy volně vyskytují v některých druzích rostlin. Hlavním zástupcem řady běžně se vyskytujících stilbenů je *trans*-pinosylvin se systematickým názvem stilben-3,5-diol. Nachází se spolu s dalšími stilbeny v jehličnanech, např. v borovicích (*Pinus* spp., borovicovité, *Pinaceae*). Základní sloučeninou stilbenů s antimikrobiálními a antioxidačními vlastnostmi je *trans*-resveratrol, neboli 3,4',5-trihydroxystilben. Resveratrol mají schopnost syntetizovat některé rostliny, jako jsou např. podzemnice olejná (*Arachis hypogea*), réva vinná (*Vitis vinifera*) (Velíšek & Hajšlová, 2009b; Tříška & Houška, 2012).

## 2.2.6 Tanniny

Název "tannin" je odvozen z francouzského "tanin" (tříslovina) a používá se pro řadu přírodních polyfenolů. Již od starověku je známo, že určité organické látky mají tříslovinové vlastnosti. V přírodě se třísloviny vyskytují po celém světě, nejčastěji v mnoha různých čeledích vyšších rostlin, jako např. v kaštanovém a dubovém dřevě, divizně aj. (Khanbabae & Ree, 2001). Jsou to trpké látky. Tato vlastnost je zapříčiněna interakcí proteinů slin s některými polymerními fenolovými sloučeninami obsaženými v potravinách rostlinného původu. Tyto jevy vedou jednoznačně k denaturaci proteinů přítomných ve slinách a zároveň ke ztrátě jejich ochranné vlastnosti, tudíž dochází k interakci s proteiny ústní dutiny. Tyto látky, které interagují s proteiny a mají povahu fenolových sloučenin, se obecně označují pojmem třísloviny, nebo také tanniny (Velíšek & Hajšlová, 2009b). Podle Velíška & Hajšlové (2009b) se tanniny dělí do dvou velkých tříd:

- hydrolyzovatelné tanniny
- kondenzované tanniny

Hydrolyzovatelné tanniny jsou polymery esterů gallové kyseliny neboli polygalloylestery. Kondenzované tanniny se jinak nazývají flavolany. Jsou to

polymery některých flavonoidních sloučenin kondenzované se strukturou 3-hydroxyflavanu (flavan-3-olu). Jsou známé i jakékoliv kombinace kondenzovaných a hydrolyzovatelných tříslovin s názvem komplexní třísloviny (Velíšek & Hajšlová, 2009b). Zvýšená produkce tříslovin často bývá spojena s některou nemocí rostliny. Proto se předpokládá, že biologická úloha mnoha tříslovin v rostlině souvisí s ochranou proti infekci, hmyzu nebo živočichům. Třísloviny se objevují jako světle žluté nebo bílé amorfni prášky či lesklé, téměř bezbarvé sypké hmoty, s charakteristickou zvláštní vůní a svíravou chutí. Medicína, zejména asijská (japonská a čínská), využívá tanniny z rostlinných extraktů jako přírodní léčivé látky, např. adstringentní látky proti průjmu, jako diuretika, proti žaludečním potížím, proti nádorům dvanáctníku, jako protizánětlivé a antiseptické prostředky i jako hemostatické léčivé přípravky (Khanbabae & Ree, 2001).

### 2.2.7 Vitamin C

Vitamin C je bílý krystalický prášek s relativní molekulovou hmotností 176,13 g/mol a bodem tání 192 °C (Moravcová, 2013). Vitamin C, neboli askorbová kyselina, je biologicky aktivní látka, jež se vyskytuje ve čtyřech různých stereoisomerech (chirální uhlíky C-4 a C-5). Biologickou aktivitu vykazuje pouze L-askorbová kyselina (1,4-lakton L-threo-*hex*-2-enové kyseliny). Její isomer se nazývá D-askorbová kyselina (D-*xylo*-askorbová kyselina). Tento isomer a druhý pár enantiomerů, tj. L- a D-isoaskorbová kyselina, vykazuje téměř nulovou biologickou aktivitu vitamínu C. Dříve se tyto látky označovaly jako L- a D-erythorbová kyselina. V roztocích při fyziologickém pH se askorbová kyselina a askorbylradikál vyskytují nejčastěji ve formě aniontů (Velíšek & Hajšlová, 2009a). Askorbová kyselina je velmi významným a dostupným přírodním antioxidantem. Přírodní antioxidanty zajišťují ochranu buněk před působením volných radikálů, tj. aktivních forem kyslíku, jež se v organismu vytvářejí např. působením výfukových plynů, kouřením, UV zářením atd. Když jsou volné radikály v organismu v nadbytku, způsobují tzv. oxidační stres (Ježková et al., 2010). Askorbová kyselina a její estery nejsou v bezvodém prostředí hodnotnými antioxidanty, jako v prostředí vodném (Schmidt et al., 2002). Všechny zelené

fotoautotrofní rostliny si askorbovou kyselinu dokážou syntetizovat samy. Živočichové si askorbovou kyselinu rovněž umí syntetizovat sami, s výjimkou hmyzu, bezobratlých, většiny ryb, a několika druhů savců a ptáků. Askorbová kyselina je vitamínem pouze pro člověka a nemnoho dalších savců (primáti, morčata a netopýři) (Velíšek & Hajšlová, 2009a).

### **2.2.7.1 Význam a výskyt vitamínu C**

Mezi nejvýznamnější zdroje vitamínu C patří především zelenina (hlavně kapusta a brokolice), ovoce (nejvíce šípek, citrusy, rybíz aj.) a brambory (Moravcová, 2013). Jsou velké rozdíly v množství askorbové kyseliny mezi jednotlivými druhy ovoce a zeleniny. Obsah vitamínu C je zároveň závislý na vegetačních podmínkách během růstu, stupni zralosti a dalších podmínkách (Velíšek & Hajšlová, 2009a). Mnoho experimentálních studií ukázalo, že vitamin C ovlivňuje imunitní systém. Kromě toho studie zjistily zkrácení doby trvání nebo snížení závažnosti nachlazení při podávání vitamínu C (Hemilä & Douglas, 1999 in Sasazuki et al., 2006). V medicíně se vitamin C používá při hypovitaminóze. Zároveň je vitamin C vhodné doplňovat při zvýšené fyzické či psychické zátěži (Kubíková, 2010). Při nedostatečném příjmu vitamínu C se objevují změny jako snížení obranyschopnosti, deprese, pocit slabosti, žaludeční problémy aj. Závažný nedostatek způsobuje zpomalení růstu, křehnutí kostí, anémii, vypadávání vlasů a zubů, krvácení a další patologické změny známé pod názvem kurděje (Moravcová, 2013). Funkcí askorbové kyseliny je přednostně její antioxidační schopnost, která se hojně využívá v určitých krocích fotosyntézy, kde reguluje množství aktivních forem kyslíku. Nezastupitelná je při syntéze kolagenu. Dále hraje roli při růstu a diferenciaci buněk. Pro živočichy je askorbová kyselina důležitá pro realizaci hydroxylačních reakcí probíhajících v organismu. Absorbuje iontové formy železa, realizuje jeho transport a vyvolává přenos sodných, chloridových a pravděpodobně i vápenatých iontů. Velmi důležitými reakcemi vitamínu C jsou reakce s aktivními formami kyslíku neboli volnými radikály, které souvisí s antioxidační povahou askorbové kyseliny. Mezi další reakce vitamínu C jsou reakce s oxidovanými formami vitamínu E, které jsou významné tím, že chrání lipidy membrán před oxidací. Askorbová kyselina inhibuje tvorbu nitrosaminů a působí jako modulátor mutogeneze a karcinogeneze. Vitamin C je

běžně přidáván k ovocným džusům a konzervovanému ovoci jako prevence oxidace při skladování a následnými nežádoucími změnami v aromatu (Velíšek & Hajšlová, 2009a).

## **2.3 Analytické metody pro stanovení fenolů**

Celkové fenolické látky se stanovují v biologických materiálech zejména jednoduchou metodou s činidlem Folin-Ciocalteu (Chen et al., 2014). Dnes je rozšířená pro tyto analýzy hlavně metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Fibigr, 2019).

### **2.3.1 Kapalinová chromatografie**

Kapalinová chromatografie je nejhojněji využívaná metoda pro stanovení bioaktivních látek v různých rostlinných složkách a pro testování čistoty rostlinných vzorků. Tyto analýzy jsou nejčastěji realizovány metodou HPLC. Pro zlepšení selektivity a citlivosti je možné použít fluorescenční detektor (Fibigr, 2019). Separační děje užívané v kapalinové chromatografii se výrazně neodlišují od chromatografie plynové. Mezi nejvýznamnější rozdíly kapalinové chromatografie od chromatografie plynové se uvádí minimální kompresibilita mobilní fáze, malý vliv teploty na separaci a velmi významná aktivní úloha mobilní fáze. Kapalinová chromatografie zařizuje všechny chromatografické typy separace, ve kterých je mobilní fáze vždy kapalná. Kapalinová chromatografie se kategorizuje, s ohledem na experimentální uspořádání, na kapalinovou chromatografii v otevřeném systému (papírová a tenkovrstvá chromatografie) a kapalinovou chromatografii v uzavřeném systému, které se dnes říká zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC (Křížek & Šíma, 2015). Chromatografické systémy zahrnují pumpy a detekční systémy, chromatografické kolony a rozpouštědla tvoří chromatografické zařízení. Tyto komponenty neustále zlepšují svoji kvalitu a spolehlivost (Fibigr, 2019).

#### **2.3.1.1 Čerpadla pro HPLC**

V HPLC se užívají tlaky od 1 do 60 MPa, přičemž průtok mobilní fáze je v rozsahu od 0,1 do 10 ml.min<sup>-1</sup>. Prvními dávkovači byly lineární dávkovače.

Dnes se více uplatňují tzv. kontinuálně pracující pulzující čerpadla, a to pístová či membránová. Každý pohyb vpřed membrány anebo pístu způsobí vytlačení malého objemu mobilní fáze do systému. Tyto pulzy jsou tlumeny dalším čerpadlem, které funguje v opačné fázi (dual head pumps), nebo tlumičem pulzů. Bývá jím odporový element z několika závitů svinuté kapiláry, či kapacitní elementy s malým vnitřním objemem, kde se využívá stlačitelnosti vnitřního jádra elementů vyrobeného z pružného inertního plastu k tlumení pulzů. Dnešní čerpadla jsou obohacena o elektronicky řízené zpětnovazební systémy, ve kterých jsou otáčky motoru přímo ovládány reziduálními tlakovými pulzacemi (Křížek & Šíma, 2015).

### **2.3.2 Molekulová absorpční spektroskopie v oblasti UV/VIS**

Metody molekulové absorpční spektroskopie v oblasti ultrafialového a viditelného světla fungují na principu absorpce záření v rozpětí vlnových délek 190-800 nm. Výsledkem absorpce záření v určité spektrální oblasti je přechod valenčních elektronů do vyšších energetických stavů. S přechodem elektronů do vyšších energetických vrstev v elektronovém obalu souvisí i změna vibrace a rotace molekuly (Křížek & Šíma, 2015).

#### **2.3.2.1 Spektrofotometrie**

Základním principem spektrofotometrie je měření záření absorbovaného roztokem. Rozkladem záření na hranolovém nebo mřížkovém monochromátoru se z polychromatického záření získává monochromatické. Jako zdroj záření se ve spektrofotometrii využívá žárovka se žhavenou wolframovou spirálou nebo žárovky plněné některými vzácnými plyny, jako jsou krypton a argon. Absorpce daného záření je dána vlnovou délkou použitého zdroje záření. Dále se ve spektrofotometru nachází skleněná či křemenná kyveta s roztokem, která slouží jako absorpční prostředí. Detektorem záření ve spektrofotometru bývá velmi často fotonka či fotonásobič (Křížek & Šíma, 2015).

## **3. Metodika práce**

### **3.1 Rostlinný materiál**

Rostliny, využité jako zkoumaný materiál pro výzkum této bakalářské práce, byly pěstovány na pozemku Jihočeské univerzity Pedagogické fakulty v roce 2021. Pozemek se nachází v Českých Budějovicích v areálu kampusu Jihočeské univerzity. Konkrétní souřadnice pozemku Jihočeské univerzity Pedagogické fakulty jsou N 48°58'29.528'', E 14°26'52.057''. V tomto regionu je charakteristickým půdním typem kambizem, která je zároveň nejrozšířenějším půdním typem v celé České republice. Osivo pěstovaných rostlin bylo pořízeno v běžně dostupném obchodním řetězci v Českých Budějovicích. Osivo pochází z produkce firmy Semo. Odrůda vypěstované bazalky právě se jmenuje African Blue a odrůda kopru vonného se nazývá Hanák. Ostatní byliny jsou bez specifikace odrůdy. Rostliny použité v této kvalifikační práci, bazalka pravá, kopr vonný, koriandr setý a libeček lékařský, byly přímo vysety do připravených záhonů dne 25. dubna 2021. Pouze bazalka pravá byla předpěstována a posléze 15. května 2021 vysázena na venkovní záhony. Všechny čtyři byliny byly pěstovány na upraveném povrchu bez střechy, vhodném pro požadavky rostlin. Sklizeň se uskutečnila 28. června 2021 a tentýž den se z rostlin zhotovily extrakty určené k analýzám v laboratoři katedry biologie Pedagogické fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Materiál získaný z bylin byl zpracován pomocí dvou separačních analytických metod. Nejprve byl za využití spektrofotometrické metody stanoven celkový obsah polyfenolů z čerstvých i sušených vzorků. Později byly identifikovány jednotlivé fenolické látky ze sušených vzorků a vitamin C z čerstvých vzorků za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Postupy těchto zmíněných metod jsou blíže popsány v následujících kapitolách.

### **3.2 Úprava materiálu k analýzám**

Rostliny byly sklizeny 28. června 2021. Tentýž den došlo k jejich zpracování. Nejprve byly rostliny zbaveny zbytků nečistot na povrchu. Dále byla každá



rostlina pokrájena na asi 0,5 cm velké díly. Část takto zpracovaného vzorku byla přímo zamražena při teplotě (-16 °C) a během následujícího měsíce od odběru lyofilizována (0,1 mbar, - 50 °C, 24 hodin). Po lyofilizaci vzorku byla provedena homogenizace na laboratorním mlýnku. Homogenní materiál byl vložen do plastové vzorkovnice do mrazícího zařízení při stálé teplotě - 18 °C, a to až do doby konání analýzy pomocí HPLC metody, která stanovila konkrétní zástupce polyfenolů. Zbývající část připraveného vzorku byla zpracována do roztoku k měření spektrofotometrem. U každého vzorku bylo stanoveno také množství sušiny.

### **3.3 Spektrofotometrické stanovení celkových fenolů**

#### **3.3.1 Příprava extraktu**

Nejprve byla vytvořena extrakční směs. K vytvoření této směsi bylo použito 80 ml 60 % methanolu a 20 g čerstvého vzorku. Celý roztok byl následně převeden do Erlenmayerovy baňky, zakryt alobalem a zavíčkovan zátkou. Obsah Erlenmayerovy baňky byl extrahován po dobu 24 hodin.

#### **3.3.2 Stanovení celkového obsahu polyfenolů s činidlem Folin-Ciocalteu**

Folin-Ciocalteuova metoda se široce používá pro stanovení celkového obsahu fenolických látek v přírodních produktech (Chen et al., 2015). Tato metoda je založená na oxidaci fenolových sloučenin a redukcí činidla Folin-Ciocalteu (směs oxidů wolframu a molybdeny). Principem této metody je selektivní oxidace podobných, snadno oxidovatelných látek, které v případě přítomnosti přispívají k celkovému obsahu fenolů. Další snadno oxidovatelné látky kromě fenolů jsou např.: aromatické aminy, oxid siřičitý, askorbová kyselina a endioly. Produkty oxidů kovů mají modrou barvu, která má široké světelné spektrum absorpce s maximem 765 nm. Metoda je rychlá a snadno proveditelná (Rover & Brown, 2013).

Nejdříve proběhla filtrace vytvořeného extraktu. Do 50 ml odměrné baňky bylo přidáno 20 ml destilované vody a 1 ml odpipetovaného přefiltrovaného extraktu. Dále byl do odměrné baňky přidán 1 ml činidla Follin-Ciocalteu. Po uplynutí 3 minut bylo přidáno 5 ml 20 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Obsah byl promíchán a doplněn destilovanou vodou po rysku odměrné baňky. Roztok se nechal 30 minut zreagovat. Následně byla přelita část výluhu do kyvety a poté byla změřena intenzita zbarvení proti slepému vzorku (nulový obsah gallové kyseliny) na přístroji při vlnové délce 765 nm. Pro každý vzorek bylo měření provedeno třikrát a výsledek byl odečten z kalibrační křivky, která představuje lineární závislost absorbance na koncentraci gallové kyseliny a objemu měřeného extraktu. Následně byl spočítán obsah mg gallové kyseliny (GAE) na 100 g.

### **3.4 Stanovení fenolických sloučenin HPLC metodou**

Flavonoidy, které se vyskytují ve výše zmíněných bylinách (bazalka pravá, koriandr setý, kopr vonný a libeček lékařský), se vyskytují především v podobě glykosidů. Glykosidy jsou deriváty sacharidů, ve kterých se váže nesacharidická flavonoidní molekula (aglykon) se sacharidem. Množství volných aglykonů bývá většinou malé. Je téměř nemožné určit jednotlivě množství všech glykosidů, poněvadž v přírodních materiálech existuje mnoho typů glykosidů každého aglykonu. Proto se stanovuje celkový obsah příslušných flavonoidních aglykonů. Užívá se tedy metoda fungující na principu kyselé hydrolyzy, které je vzorek vystaven. Při této metodě se všechny přítomné glykosidy štěpí a dochází k uvolnění aglykonů. Ty jsou následně ze vzorku izolovány. K tomu byla využita metoda sorpce na tuhé fázi (SPE), při které došlo k oddělení volných aglykonů a jejich stanovení po rozdělení metodou HPLC. Touto metodou bylo zkoumáno šest nejzastoupenějších aglykonů: myricetin, morin, luteolin, kvercetin, apigenin a kemferol.

#### **3.4.1 Stanovení flavonoidních aglykonů v lyofilizovaném materiálu**

Pro stanovení celkového obsahu flavonoidních aglykonů v lyofilizovaném materiálu, který se uvolnil z glykosidů za určitých podmínek, byla použita níže popsaná metoda.

Nejdříve se připraví ve varné baňce směs 0,25 g připraveného homogenizovaného rostlinného materiálu, 80 mg askorbové kyseliny (vitamin C), 7,5 ml destilované vody, 5 ml 6M HCl a 12,5 ml methanolu. Vytvořená směs se hydrolyzuje pod zpětným chladičem zhruba 2 hodiny na vodní lázni při teplotě 90° C. Obsah varné baňky se nechá zchladnout do vyhovujících teplot. Po vychladnutí se obsah baňky nechá zneutralizovat 2 g NaHCO<sub>3</sub>. Obsah se převede do odstřeďovací kyvety použitím 12,5 ml methanolu a vody. Postupně se třikrát odstředí v čase 10 minut při 3000 otáčkách. Po uplynutí doby vznikne tekutina nad sedimentem označována jako supernatant. Následuje spojení dílčích supernatantů v kádince s objemem 600 ml, která se doplní vodou na 200 ml. Přidáním nasyceného roztoku NaHCO<sub>3</sub> se ještě upraví pH na požadovanou hodnotu 3. Upravený roztok se následně přefiltruje přes speciální filtr ze skleněných vláken za podmínek sníženého tlaku. Dále se filtrát kvantitativně převede do 500 ml odměrné baňky.

Před sorpcí, která se odehrává na kolonkách SPE, se všechny vzorky ředí připraveným 5% roztokem methanolu. Vlastní ředění je realizováno s ohledem na předpokládaný obsah aglykonů a dle množství přidružených látek, nejčastěji barviv. Roztok připravený těmito postupy se využívá pro sorpci na tuhé fázi (SPE). Pro realizaci SPE se využívají kolonky RP-18 (Merck), které jsou kondicionované promytím 10 ml methanolu a 10 ml vody. Pro promytí vzorku je kolonka promyta 10 ml vody a následuje sušení po dobu 20 minut procházejícím vzduchem. Látky, které se zachytily na kolonce, se vymyjí pomocí 1,4 ml methanolu do odměrné vialky. K eluátu v měrné vialce se přidá roztok vnitřního standardu, kterým je  $\alpha$ -naftyloctová kyselina (2mg/ml) v množství 100  $\mu$ l.

Tímto způsobem připravené vzorky jsou měřeny na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu (HPLC). Byl použit kapalinový chromatograf Agilent 1200 Series Rapid Resolutions (Agilent Technologies, USA) s kolonou Zorbax Eclipse SB-C18 (Agilent) o parametrech 4,6 x 50 mm se zrněním 1,8  $\mu$ m. Mobilní fáze je A: 5% acetonitril, 0,1 % mravenčí kyselina, voda B: 0,1 % mravenčí kyselina, acetonitril.

Celá analýza byla realizována při teplotě 25° C, detekce vzorku při 270 nm. Následovalo nastříknutí vzorku o velikosti vzorku 5 µl na kolonu. Rychlost průtoku mobilní fáze byl 1 ml/min, délka celé analýzy zabrala asi 15 minut.

Všechny připravené vzorky byly vystaveny analýze dvakrát. Výsledkem je aritmetický průměr s uvedením směrodatné odchylky. Identifikace jednotlivých látek byla provedena podle retenčních časů a porovnáním spekter se spektry standardů. Jako vnitřní standart byla použita  $\alpha$ -naftyloctová kyselina s retenčním časem 5,9 minut. Všechny analýzy prováděné pomocí vysokofunkčního kapalinového chromatografu (HPLC) proběhly ve spolupráci s katedrou aplikované chemie Zemědělské a Technologické fakulty Jihočeské univerzity.

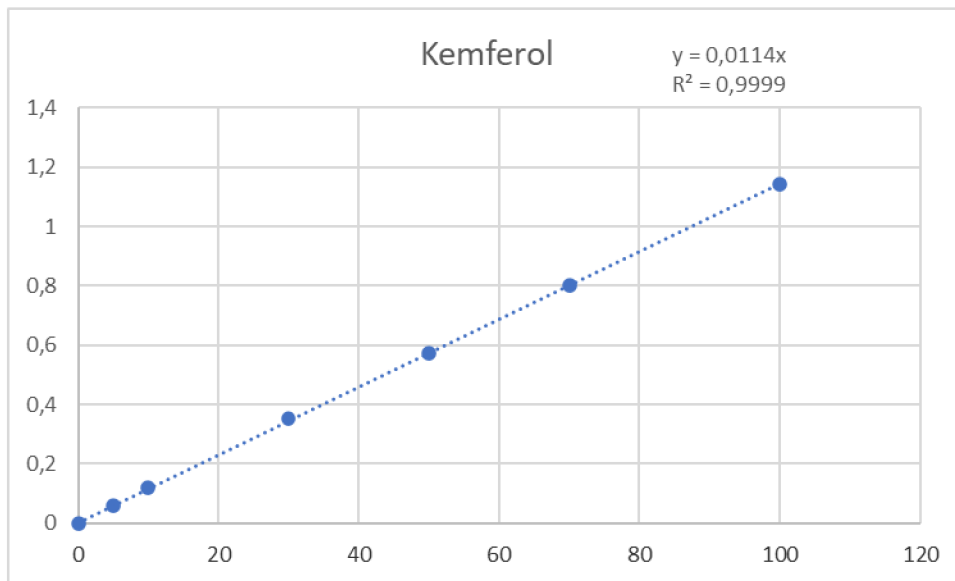
### **3.4.2 Vyhodnocení stanovení s použitím kalibrační závislosti**

K celkovému vyhodnocení se používá poměr ploch píků identifikovaných flavonoidů a vnitřního standardu. Kvantifikace obsahu přítomných aglykonů se provádí pomocí kalibrační závislosti. K sestavení kalibrační závislosti slouží roztoky, které se připravují ze zásobních roztoků v pracovním rozsahu 5-100 µg/ml. Mez detekce je 1 mg/kg, mez stanovitelnosti 5 mg/kg sušiny.

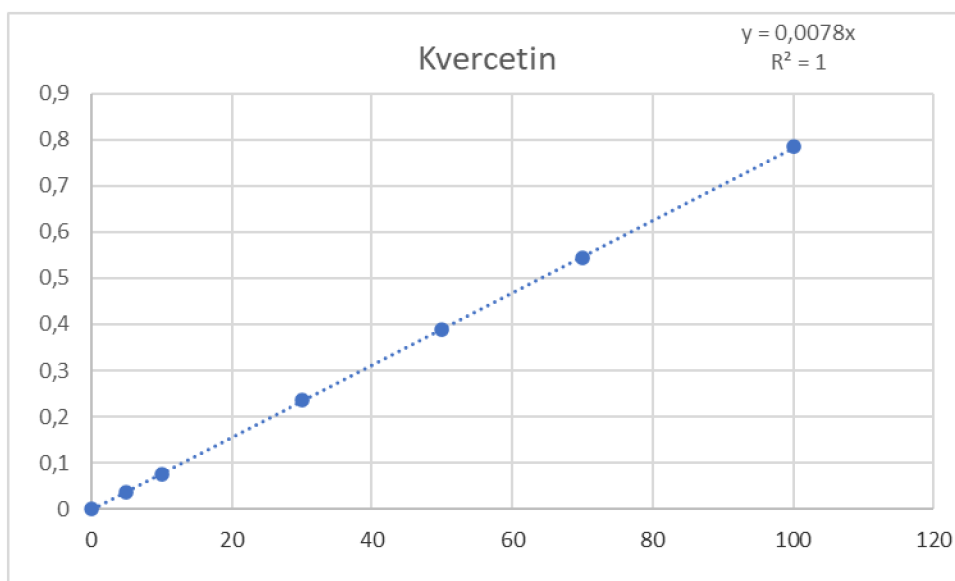
Tato metoda se používá velice běžně u optických metod. V tomto případě je analytický signál odezvou detektoru, která je interpretována jako absorbance vzorku. U HPLC metody je analytický signál roven ploše píku, který odpovídá stanovované látce. V moderních analytických metodách např. kapalinová chromatografie (HPLC) je graficky prezentována absorbance vzorku jako tzv. pík. Jako analytická odezva se odečítá plocha tohoto píku. Z toho vyplývá, že koncentrace je přímo úměrná velikosti analytického signálu.

Při užití kalibrační závislosti se nachystala tzv. kalibrační řada, což jsou roztoky s různou, přesně známou koncentrací, připravené z čisté látky (standard). Měření se zjistily velikosti analytického signálu (pík) odpovídající dílčím vzorkům. Připravený vzorek, který obsahuje stanovovanou látku v neznámé koncentraci, byl proměřen na přístroji za stejných podmínek, jako byla měřena kalibrační řada. Takto se získal analytický signál neznámého vzorku.

Pro vytvoření kalibrační závislosti byl použit program MS Excel. Údaje, které byly zjištěny měřením kalibrační řady, vytvořily dvojice, které představují koncentrace a k ní příslušný analytický signál. Získaná data byla využita pro vytvoření kalibračních grafů (Obrázek 11 a 12).



**Obrázek 11: Kalibrační graf pro kemferol**



**Obrázek 12: Kalibrační graf pro kvercetin**

### 3.5 Stanovení obsahu vitamínu C pomocí HPLC metody

Obsah vitamínu C byl stanovován jako obsah L-askorbové kyseliny a jejích příbuzných látek, pravděpodobně L-dehydroaskorbová kyselina. Analýza probíhala po extrakci čerstvého materiálu extrakčním činidlem chromatograficky pomocí HPLC metody. Při zhotovování vzorků L-askorbová kyselina rychle podléhá oxidaci. Aby se oxidaci předešlo, použil se jako extrakční činidlo roztok obsahující šťavelovou kyselinu a chelatační činidlo (0,02 mol/l šťavelové kyseliny a 0,5 mmol/l EDTA). Použité postupy vychází z publikované práce Beguma & Harikrishna (2010). Podmínky pro chromatografické separace byly zajištěny na pracovišti katedry aplikované chemie Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity.

Nejprve bylo naváženo 2,5 – 5 g průměrného homogenního materiálu a následně se vzorek 10 minut homogenizoval v homogenizátoru s přidavkem 20 ml extrakčního činidla. Hotová směs byla převedena do odstředivací kyvety. Odstředování probíhalo 10 minut při 3 500 otáčkách. Vzniklý supernatant byl převeden do 50 ml odměrné baňky. Zbytek směsi v kyvetě se resuspendoval s 20 ml čerstvého extrakčního činidla a proběhlo odstředění za stejných podmínek. Spojené supernatanty byly v odměrné baňce doplněny po rysku destilovanou vodou a byly dobře promíchány. Před samotným měřením byl vzorek přefiltrován přes speciální filtr ze skleněných vláken (Z7). Přefiltrované vzorky byly okamžitě měřeny na HPLC. Měření proběhlo ve čtyřech opakováních.

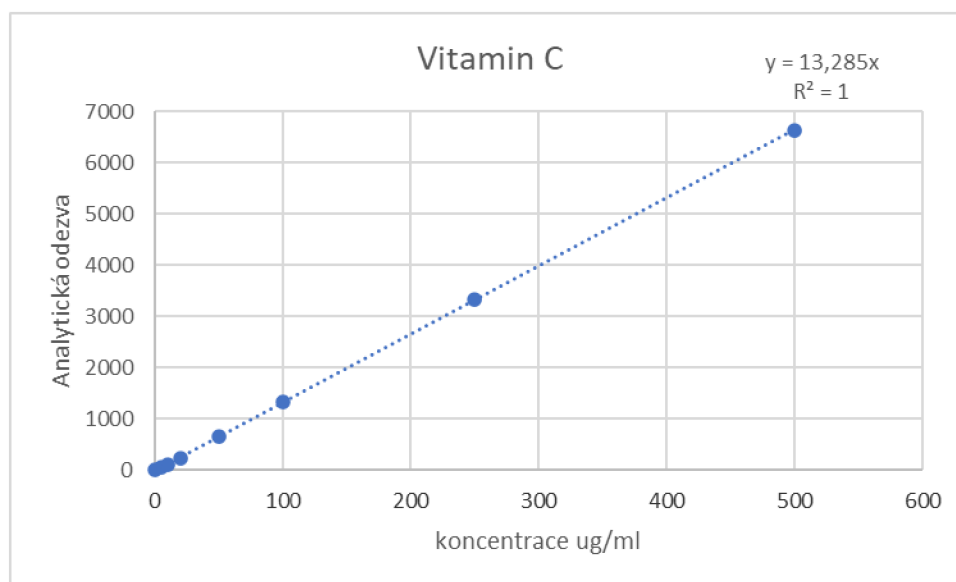
Chromatografická separace byla provedena na přístroji UHPLC Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC System na koloně Zorbax SB-C8 o parametrech 4,6 x 150 mm se zrnitostí 5  $\mu\text{m}$ .

Jako mobilní fáze byl použit roztok 0,02 M šťavelové kyseliny. Na kolonu bylo nastříknuto 5  $\mu\text{l}$  vzorku. Teplota v místnosti při analýze byla 25°C. Absorbance vzorku byla odečtena při vlnové délce 254 nm. Za těchto podmínek koeluují pravděpodobně všechny formy vitamínu. Kvantifikace byla provedena pomocí standardu L-askorbové kyseliny v pracovním rozsahu 5-100 mg/kg čerstvého materiálu.

### 3.5.1 Vyhodnocení stanovení pomocí kalibrační závislosti

Obsah L-askorbové kyseliny (vitaminu C) se stanovuje metodou kapalinové chromatografie (HPLC) a počítá se pomocí rovnice kalibrační závislosti, která se získá proměřením souboru roztoků známé koncentrace (viz Obrázek 13).

Pro kalibrační závislost byly vytvořeny vzorky L-askorbové kyseliny o koncentraci 0-100  $\mu\text{g/ml}$  a byla změřena jejich absorbance při vlnové délce 254 nm. Jako analytická odezva byla odečtena plocha píku (bezrozměrné číslo), která se získala z grafického záznamu (chromatogramu).



Obrázek 13: Kalibrační graf pro vitamin C

## **3.6 Použité chemikálie a přístroje**

### **3.6.1 Chemikálie**

destilovaná a redestilovaná voda (Merck, Německo)

Folin – Ciocalteuovo činidlo (Merck, Německo)

methanol 60 % (Merck, Německo)

hydrogenuhličitan sodný (Penta, ČR)

gallová kyselina (Merck, Německo)

$\alpha$ -naftyloctová kyselina (Lachema, ČR)

L-askorbová kyselina (Merck, Německo)

chlorovodíková kyselina (Lachema, ČR)

acetonitril (LiChrosolv Reag. Ph. Eur, Merck)

EDTA (LachNer, ČR)

mravenčí kyselina (Penta, ČR)

uhličitan sodný 20 %

### **3.6.2 Přístroje a pomůcky**

Analytické váhy (Mettler toledo-AB 204, Švýcarsko)

Laboratorní mlýnek (Retsch-GM 200, Německo)

Laboratorní odstředivka (Sigma- 2-5, Německo)

Laboratorní váhy (Denver instrument- APX-602)

pH metr (Eutech instruments- pH 700)



Vodní lázeň (EL-20R)

SPE extraktor (vývojové dílny JCU)

Laboratorní sada nádobí

Zkumavky s víčkem s teflonovým těsněním

Běžné vybavení laboratoře

Laboratorní třepačka (Kavalier- LT2, ČR)

Lyofilizační zařízení Lyokontrol 2.0 (Gregor instrument- L10-55PRO)

Automatická pipeta (Transfer pette 20-200 µl Brand, Německo)

Automatická pipeta (Transfer pette 100-1000 µl Brand, Německo)

Destilační zařízení

Magnetické míchadlo (Heidolph, Německo)

SPE kolonky RP-18 (Merck, Německo)

Filtry ze skleněných vláken GF/C (Whatman, Velká Británie)

Kapalinový chromatograf Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC Systém (Agilent Technologies, USA), detektor DAD UV VIS (Agilent Technologies, USA)

Kolona Zorbax SB-C8 (4,6 x 150 mm, zrnitost částic stacionární fáze 5 µm) (Agilent Technologies, USA)

Kolona Zorbax SB-C18 (4,6 x 50 mm, zrnitost částic stacionární fáze 1,8 µm) (Agilent Technologies, USA)

Biochrom WPA Lightwave II spektrofotometr (WPA Biochrom, UK)

Biochrom Libra S11 (WPA Biochrom, UK)

### **3.7 Použité statistické programy**

Získané výsledky byly pro přehlednost zpracovány do tabulek a grafů a následně vyhodnoceny základními statistickými metodami v programu Microsoft Office 365 Excel.

## 4. Výsledky

### 4.1 Celkový obsah fenolických látek

Stanovení celkového množství polyfenolických látek bylo provedeno spektrofotometrem Biochrom Libra S11 při vlnové délce 765 nm. Dílčí vzorky byly stanovovány oproti standardu, kterým byl roztok kyseliny gallové. Nejdříve proběhla analýza pro rostlinné materiály, kterými byly čerstvé vzorky výše zmíněných rostlin.

Nejprve byly stanoveny celkové obsahy fenolických látek jednotlivých rostlin. Množství polyfenolů bylo zkoumáno zprvu v čerstvých vzorcích, a následně pak ve vzorcích sušených. Výsledky celkového obsahu fenolických látek jsou uvedeny v mg/kg čerstvé hmoty z přepočtených mg GAE/100g.

#### 4.1.1 Vzorky analyzovaných rostlin-čerstvé

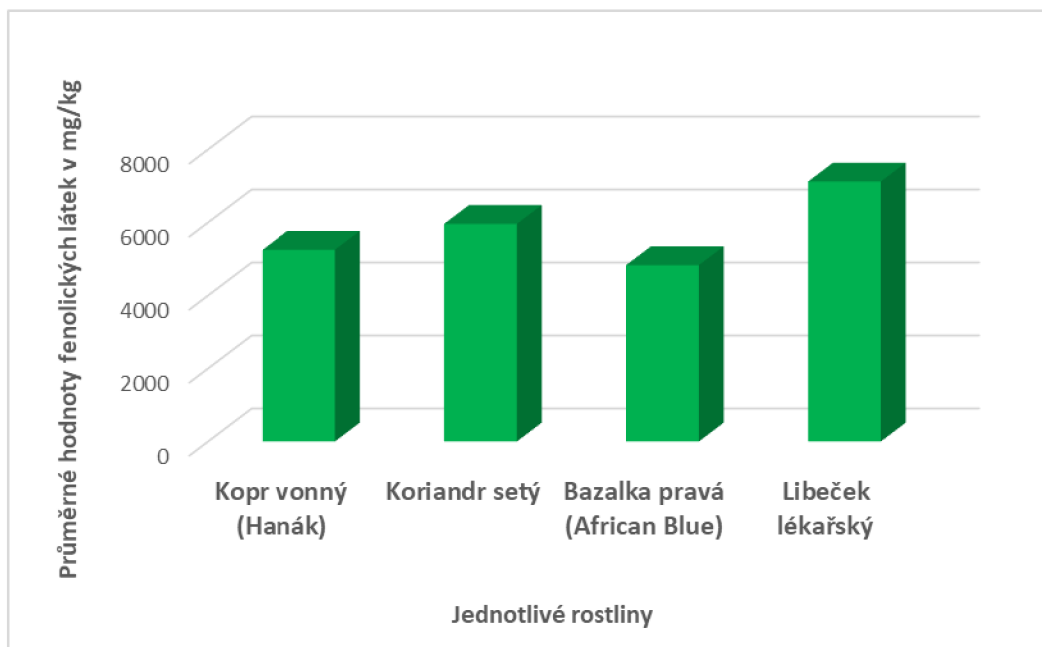
Měření polyfenolů u každého vzorku čerstvých bylin proběhlo třikrát. Maximální a minimální výsledné hodnoty změřených vzorků byly zaznamenány do tabulky 1, ve které jsou přehledně prezentovány. V tabulce 1 je rovněž uveden průměr všech třech měření. Z výsledků měření vyplývá, že největší rozdíl v celkovém obsahu fenolů v čerstvých vzorcích je mezi libečkem lékařským, který má největší množství fenolů ( $7120 \pm 18,4$  mg/kg), a bazalkou pravou, která má naopak množství fenolů nejnižší ( $4830 \pm 51,6$  mg/kg).

**Tabulka 1: Celkový obsah fenolů v čerstvých vzorcích**

Čerstvé byliny	celkový obsah fenolických látek v mg/kg			
	Max.	Min.	SD	Průměr
Kopr vonný (Hanák)	5300	5210	6,36	5250
Koriandr setý	6010	5930	5,66	5960
Bazalka pravá (African Blue)	5090	4360	51,6	4830
Libeček lékařský	7210	6950	18,4	7120

*SD... směrodatná odchylka*

Pro přehlednost a snadnou orientaci jsou průměrné hodnoty celkových fenolů v čerstvých vzorcích rostlin zapracovány do grafu (Obr. 14).



**Obrázek 14: Průměrné hodnoty fenolů v čerstvých vzorcích**

#### 4.1.2 Vzorky analyzovaných rostlin-sušené

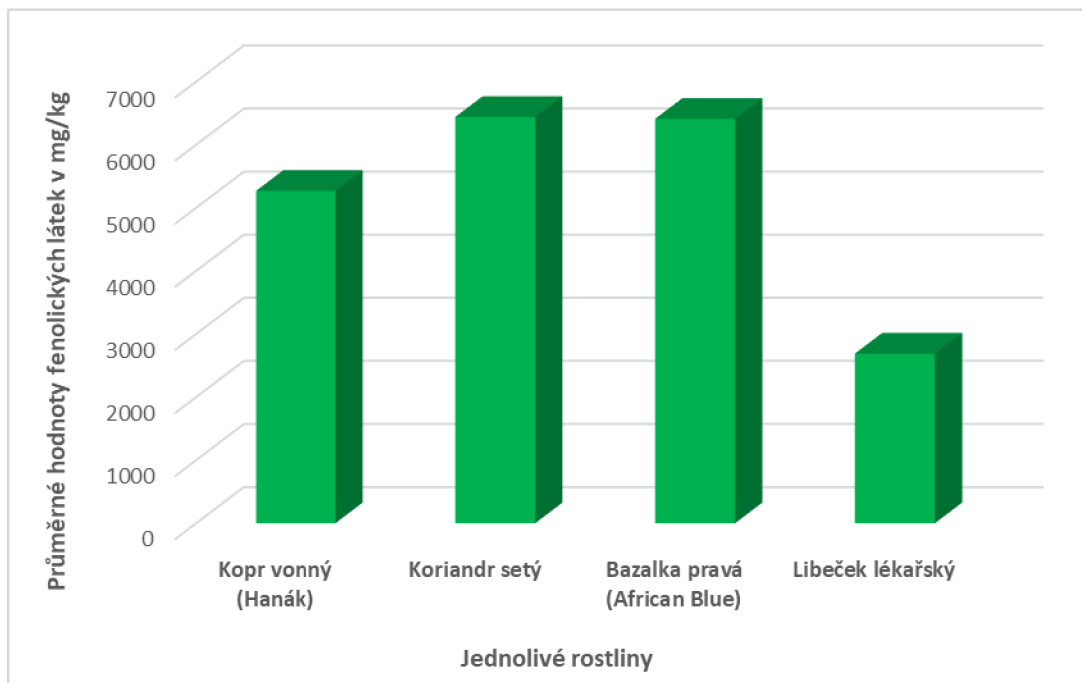
Měření celkových fenolických sloučenin v sušených vzorcích proběhlo taktéž třikrát. Do tabulky 2 byly zaznamenány maximální a minimální výsledné hodnoty ze všech třech měření. Z těchto měření byl spočítán aritmetický průměr, který byl rovněž zapsán do tabulky. Z výsledků obsahu fenolických sloučenin v sušených vzorcích je zřejmé, že největší rozdíl v průměrném obsahu fenolů je opět mezi bazalkou pravou a libečkem lékařským. Avšak je tomu přesně naopak. Největší množství fenolů v sušených vzorcích bylo nalezeno v bazalce pravé ( $6890 \pm 48,4$  mg/kg) a nejnižší množství v libečku lékařském  $2690 \pm 14,1$  mg/kg (viz Tabulka 2.)

**Tabulka 2: Celkový obsah fenolů v sušených vzorcích**

Sušené vzorky	celkový obsah fenolických látek v mg/kg			
	Max.	Min.	SD	Průměr
Kopr vonný (Hanák)	5400	5020	26,9	5270
Koriandr setý	6640	6080	37,5	6440
Bazalka pravá (African Blue)	6890	5470	100	6410
Libeček lékařský	2760	2560	14,1	2690

*SD... směrodatná odchylka*

Pro lepší orientaci ve výsledcích byl vytvořen graf (Obrázek 15) s průměrnými hodnotami celkových fenolů v jednotlivých vzorcích sušených rostlin.



**Obrázek 15: Průměrné hodnoty fenolů v sušených vzorcích**

Byl stanoven i obsah sušiny jednotlivých vzorků rostlin. Množství sušiny tvoří u kopru vonného (Hanák) – 16,21 %, u koriandru setého – 16,25 %, u bazalky pravé (African Blue) – 11,66 % a u libečku lékařského – 19,6 %.

## 4.2 Analýza jednotlivých fenolických látek a vitamínu C

V této části bakalářské práce byl podrobně zkoumán výskyt některých fenolických sloučenin, kterými jsou: apigenin, luteolin, kemferol, kvercetin, myricetin a morin v lyofilizovaných vzorcích čtyř výše zmíněných rostlin. Jedná se o tyto byliny: bazalka pravá, konkrétně odrůda African Blue, odrůda Hanák kopru vonného, koriandr setý a libeček lékařský. Poslední dvě rostliny jsou uvedeny bez specifikace odrůdy. Každý ze vzorků byl analyzován dvakrát a z těchto dvou měření byl výsledek zprůměrován. Výsledné hodnoty byly následně přepočítány na čerstvou hmotu. V měřených vzorcích byl zaznamenán pouze výskyt kemferolu, kvercetinu a vitamínu C.

### 4.2.1 Kvercetin

Kvercetin je jedním z nejčastěji se vyskytujících flavonoidů v mnohých druzích zeleniny. Kvercetin se vyskytoval pouze v některých měřených vzorcích stanovovaných rostlin. Jeho přítomnost v bazalce pravé nebyla prokázána. Nejvyšší obsah kvercetinu byl stanoven v libečku lékařském ( $2920 \pm 14,5$  mg/kg). U bazalky pravé nebylo možné stanovit obsah kvercetinu, hodnoty byly pod mezí detekce. Podrobné výsledky jsou prezentovány v Tabulce 3.

**Tabulka 3: Obsah kvercetinu v jednotlivých rostlinách**

Kvercetin	mg/kg			
	Max.	Min.	SD	Průměr
Libeček lékařský	2930	2910	14,5	2920
Bazalka pravá (African Blue)	< LOQ	< LOQ	0	0
Koriandr setý	1160	1110	31,9	1140
Kopr vonný (Hanák)	407	370	25,2	389

*LOQ....pod mezí detekce; SD...směrodatná odchylka*

### 4.2.2 Kemferol

Další stanovenou flavonoidní látkou je kemferol, který se vyskytoval ve všech vzorcích rostlin, kromě bazalky pravé. Množství kemferolu v bazalce pravé bylo menší, než je mez stanovitelnosti. Koncentrace kemferolu v mg/kg poměrně výrazně klesla v porovnání s kvercetinem. Nejvíce naměřeného kemferolu bylo zjištěno v libečku lékařském ( $72,0 \pm 3,3$  mg/kg). U bazalky pravé nebylo možné opět stanovit obsah kemferolu, hodnoty byly pod mezí detekce. Podrobné výsledky jsou dostupné k nahlédnutí v Tabulce 4.

**Tabulka 4: Obsah kemferolu v jednotlivých rostlinách**

Kemferol	mg/kg			
	Max.	Min.	SD	Průměr
Libeček lékařský	74,7	69,3	3,3	72,0
Bazalka pravá (African Blue)	< LOQ	< LOQ	0	0
Koriandr setý	28,5	27,4	0,7	28,0
Kopr vonný (Hanák)	25,4	19,1	4,2	22,3

*LOQ...pod mezi detekce; SD...směrodatná odchylka*

### 4.2.3 Vitamin C

Přítomnost vitamínu C byla zaznamenána ve všech připravených vzorcích rostlin. Nejvíce vitamínu C bylo prokázáno v kopru vonném (149±4,9 mg/kg). U ostatních bylin obsah vitamínu C v porovnání s koprem vonným výrazně klesá. Nejnížší naměřené hodnoty vitamínu C byly zjištěny v libečku lékařském (19,1±2,4 mg/kg).

**Tabulka 5: Obsah vitamínu C v jednotlivých rostlinách**

Vitamin C	mg/kg			
	Max.	Min.	SD	Průměr
Libeček lékařský	22,1	16,7	2,4	19,1
Bazalka pravá (African Blue)	32,7	27,9	2,1	30,8
Koriandr setý	22,9	18,8	1,8	20,7
Kopr vonný (Hanák)	156	145	4,9	149

*SD...směrodatná odchylka*



## 5. Diskuse

Tato bakalářská práce měla za cíl zjistit obsah celkových fenolických látek, obsah jednotlivých flavonoidů a vitamínu C ve vybraných rostlinách. Předmětem této studie byla bazalka pravá, koriandr setý, kopr vonný a libeček lékařský. Celkový obsah fenolických látek byl stanovován pomocí spektrofotometrické metody s využitím činidla Folin Ciocalteu. Tato metoda funguje na principu měření absorbance výsledné modré barvy spektrofotometricky při vlnové délce 765 nm, a to v čerstvých a sušených vzorcích vybraných bylin.

Průměr celkového obsahu fenolických látek v čerstvých vzorcích vybraných rostlin se pohyboval od 4830 mg/kg do 7120 mg/kg. Naopak průměrné hodnoty celkových fenolických sloučenin ve vzorcích sušených rostlin se držely v rozmezí od 2690 mg/kg do 6440 mg/kg. Nejvyšší hodnota v čerstvých vzorcích byla naměřena v libečku lékařském, a to 721 mg/kg. V sušených vzorcích byla zaznamenána nejvyšší koncentrace v bazalce pravé, a to 6890 mg/kg. Z výsledků měření vyplývá, že vyšší obsah fenolických látek byl prokázán v extraktech z čerstvých vzorků. Toto tvrzení se podařilo zjistit i Široké (2019), která se ve své práci zabývala vlivem kuchyňských úprav na obsah fenolických látek v miřiku celeru (*Apium graveolens*). Tento fakt dle Široké (2019) může znamenat, že analyzované látky během sušení degradují a díky tomu ubývají.

Dalším cílem této práce bylo stanovení konkrétních flavonoidů v lyofilizovaných vzorcích a také vitamínu C v čerstvých vzorcích vybraných rostlin. K těmto analýzám byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). V těchto vzorcích rostlin byly zkoumány látky: luteolin, kvercetin, apigenin, kemferol, myricetin a morin. Avšak prokázat se podařilo pouze kvercetin a kemferol. Naopak vitamin C byl zaznamenán ve všech vzorcích rostlin.

Nejvyšší koncentrace kvercetinu byla prokázána v libečku lékařském, přesně 2 930 mg/kg. Kvercetin byl zaznamenán až v 7x vyšších koncentracích v libečku lékařském v porovnání s koprem vonným. Flavonoid kemferol byl identifikován v nejvyšší koncentraci rovněž v libečku lékařském 74,7 mg/kg. V této práci se potvrdilo, že nejvyšší koncentrace flavonoidů jsou zastoupeny v libečku

lékařském. V bazalce pravé nebyl zaznamenán žádný ze zkoumaných flavonoidů. Tato skutečnost by mohla souviset s životními podmínkami při pěstování či s obsahem živin v půdě. Pravděpodobně hraje roli mnohem méně intenzivní aroma bazalky pravé v porovnání s koprem vonným.

Vitamin C byl identifikován ve všech čerstvých vzorcích vybraných bylin. Nejvyšší koncentrace byly identifikovány v kopru vonném 156 mg/kg. Nejnížší naměřené hodnoty vitaminu C byly zjištěny v libečku lékařském, ve kterém jsou přítomny až v 9x menším množství.

Zajímavým zjištěním je, že zatímco naměřené koncentrace obou identifikovaných flavonoidů byly nejvyšší v libečku lékařském a nejnížší v kopru vonném, s naměřenými koncentracemi vitaminu C je tomu přesně naopak.

Kratchanová et al. (2010) se zabývala vlivem extrakčního systému na extrahovatelnost polyfenolových sloučenin a antioxidační aktivitu různých léčivých rostlin. Zkoumala 25 bulharských léčivých rostlin, které byly podrobeny extrakci vodou nebo 80 % acetonem. Při analýze celkového obsahu fenolických látek bylo naměřeno  $2391 \pm 38$  mg/100g extrakcí acetonem a  $1816 \pm 52$  mg/100g extrakcí vodou ze vzorku z bazalky.

Juhaimi & Ghafoor (2011) měřili celkový obsah fenolů pomocí Folin Ciocalteu metody v mátě rolní (*Mentha arvensis*), petrželi zahradní (*Petroselinum crispum*) a koriandru setém (*Coriandrum sativum*). Nejvyšší obsahy celkových fenolů byly zjištěny v extraktu z listů máty rolní 1,24 mg/100ml. V listech petržele zahradní změřili 1,22 mg/100ml a v koriandru setém 1,12 mg/100 ml.

Chrpová et al. (2010) se ve své práci také věnovala celkovému obsahu fenolických látek, který měřila spektrofotometricky v sušených vzorcích při vlnové délce 760 nm za použití činidla Folin Ciocalteu. V dobromysli obecné bylo zjištěno 91,4 mg/g, v šalvěji lékařské 24,3 mg/g, v bazalce pravé 20,3 mg/g, v meduňce lékařské 85,0 mg/g, v majoránce zahradní 27,7 mg/g a v libečku lékařském 19,7 mg/g fenolických látek.

Chaleshtori et al. (2013) se zabýval studií, jejímž cílem bylo zhodnotit antioxidační účinky a antibakteriální aktivitu pelyňku estragonu a jeho chemického složení. Naměřili  $10,16 \pm 0,08$  mg/g celkového obsahu fenolů.

Výsledky zjištěné v této práci korelují s tím, co ve svém výzkumu zjistil Huang et al. (2007), a tedy skutečnost, že po kyselé hydrolyze nebyly zjištěny žádné významné píky glykosidů, což naznačuje, že většina glykosidů byla hydrolyzována na aglykony.

V práci Huanga et al. (2007) byl zaznamenán výskyt kvercetinu, který byl nalezen v zeleném salátu, hořčici, kapustě, okře, sladkých bramborách, fialovém hrášku, hrachu a šruše zelné. Obsah se pohyboval od 1,3 do 31,8 mg/100 g, přičemž nejvyšší obsah byl v kapustě a nejnižší v šruše zelné. Dále byl prokázán kemferol, a to v hořčici, kapustě, sladkých bramborách, zeleném salátu, zelené cibuli a šruše zelné. Obsah se pohyboval od 1,1 do 90,5 mg/100 g. Autorům se rovněž nepodařilo identifikovat myricetin, luteolin a apigenin.

V dalším výzkumu Caia et al. (2004) byl zkoumán celkový obsah fenolů, jejich antioxidační kapacita a jednotlivé majoritní fenolické sloučeniny. V pelyňku ročním naměřil celkový obsah fenolických sloučenin od 3,51 do 3,44 mg/100g a prokázali výskyt luteolinu, kemferolu, kvercetinu, rutinu a kumarinů. V pelyňku čínském bylo zjištěno 1,94 až 1,29 mg/100g celkového obsahu fenolů. Ve svém výzkumu autoři prokázali přítomnost kvercetinu, kvercitrinu, apigeninu, eupatilinu a chrysoeriolu. Šalvěj červenokořená obsahuje 4,26 až 4,91 mg/100g celkového obsahu fenolů. V této studii se rovněž nepodařilo prokázat flavonoidy luteolin, apigenin, myricetin a morin, stejně jako v této práci.

Celkový obsah fenolických látek ve své práci zkoumal také Surveswaran et al. (2007), který prokázal přítomnost 1,45 mg/100g v kopru vonném. Dále zjistil množství celkových fenolických sloučenin 0,41 mg/100g v koriandru setém, 3,15mg/100g v kmínu koptském, 1,11mg/100g ve fenyklu obecném a 0,49mg/100g v pelyňku brotanu.

Studie Favella (1996) se zabývala přímým porovnáním nutriční kvality čerstvé zeleniny se stejnou zeleninou komerčně rychle zamraženou a hluboce zmrazenou,

skladovanou po dobu až 12 měsíců, s využitím vitamínu C, jako ukazatele nutriční kvality. Čerstvé vzorky vykazovaly tyto hodnoty: hrách 30,9 mg/100g, brokolice 93,1 mg/100g, zelené fazolky 15,1 mg/100g, špenát 31,6 mg/100g a mrkev 4,4 mg/100g. Obsah vitamínu C se po zamražení snižoval.

Z těchto tvrzení lze konstatovat, že nejvíce zastoupenými flavonoidy v rostlinách jsou kvercetin a kemferol.

Obsahy celkových fenolických látek se v rostlinném materiálu podstatně liší v mnohých výzkumech. Rozdíly mohou záviset na použité metodě stanovení, kalibrační závislosti, míře detekce těchto látek, použité úpravě vzorků a zkoumaného materiálu. Navíc mnohdy jsou obsahy jednotlivých bioaktivních látek vyjádřeny v různých jednotkách (hmotnostních, objemových) a přepočtených na jednotky hmotnosti buď v sušině či v čerstvé hmotě.

Z uvedených publikací je zřejmé, že fenolické látky jsou předmětem velkého zájmu vědeckého bádání, a to nejen pro svůj antioxidační potenciál, ale i pro blahodárné účinky na lidské zdraví, které nebyly doposud zcela objasněny.

## 6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit obsah celkových fenolických látek a jednotlivých flavonoidních aglykonů ve vybraných rostlinách, a to v bazalce pravé (*Ocimum basilicum*), v kopru vonném (*Anethum graveolens*), v koriandru setém (*Coriandrum sativum*) a v libečeku lékařském (*Levisticum officinale*). Navíc byl ještě stanoven obsah vitamínu C jako jedné z dalších bioaktivních látek s antioxidačními vlastnostmi.

Literární část této práce byla věnována podrobnému popisu jednotlivých vybraných rostlin, jejich pěstování a významu. Teoretická část se pak hlavně zaměřila na stanovované látky, jejich rozdělení a chemickou strukturu.

V praktické části práce byl nejprve měřen celkový obsah fenolických látek ve vzorcích jednotlivých rostlin zeleného koření pomocí spektrofotometrické metody s využitím Folin-Ciocalteauva činidla. Měření proběhlo ve vzorcích čerstvých i sušených. Obsahy celkových fenolů se pohybovaly v rozmezí 2760-7210 mg/kg.

Další analýzy pak byly zaměřeny na stanovení konkrétních fenolických látek v lyofilizovaných vzorcích popsaných rostlin. Tato stanovení proběhla za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Pozornost byla věnována konkrétně těmto látkám: luteolin, kvercetin, apigenin, kemferol, myricetin, morin. Ze zmíněných flavonoidů se podařilo prokázat pouze kvercetin a kemferol, přičemž kvercetin byl v bylinách nalezen ve výrazně vyšších koncentracích 407-2930 mg/kg.

Současně byl stanoven obsah vitamínu C v čerstvých vzorcích výše zmíněných rostlin pomocí metody HPLC. Vitamin C byl identifikován ve všech rostlinách, avšak nejvyšší množství bylo objeveno v kopru vonném, a to 156 mg/kg.

Domnívám se, že zjištěné hodnoty celkových fenolických látek a jednotlivých flavonoidů získaných během zpracování této bakalářské práce by bylo zajímavé porovnávat např. s výsledky stejných rostlin vypěstovaných v odlišných půdních a klimatických podmínkách.

## 7. Seznam literatury

Al-Juhaimi, F., & Ghafoor, K. (2011). Celkové fenoly a antioxidační aktivity extraktů listů a stonků z koriandru, máty a petržele pěstovaných v Saúdské Arábii. *Pak. J. Bot*, 43 (4), 2235-2237.

Barros, L., Duenas, M., Dias, MI, Sousa, MJ, Santos-Buelga, C., & Ferreira, IC (2012). Fenolické profily in vivo a in vitro pěstovaných *Coriandrum sativum* L. *Food Chemistry*, 132 (2), 841-848.

Begum, A., & Harikrishna, S. (2010). Pathogens and heavy metals concentration in green leafy vegetables. *E-Journal of Chemistry*, 7(S1), S552-S558.

Bernhoft, A., Siem, H., Bjertness, E., Meltzer, M., Flaten, T., & Holmsen, E. (2010). Bioactive compounds in plants—benefits and risks for man and animals. *The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo*.

Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidační aktivita a fenolické sloučeniny 112 tradičních čínských léčivých rostlin spojených s protirakovinnými účinky. *Life Sciences*, 74 (17), 2157-2184.

Calderon-Montano, J., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., & López-Lázaro, M. (2011). Recenze dietního flavonoidu kaempferolu. *Mini recenze v lékařské chemii*, 11 (4), 298-344.

Caselli, A., Cirri, P., Santi, A., & Paoli, P. (2016). Morin: a promising natural drug. *Current medicinal chemistry*, 23(8), 774-791.

Cushnie, T.T., & Lamb, A.J. (2005). Antimikrobiální aktivita flavonoidů. *International Journal of antimicrobial agents*, 26 (5), 343-356.

De Almeida Melo, E., Mancini Filho, J., & Guerra, N. B. (2005). Characterization of antioxidant compounds in aqueous coriander extract (*Coriandrum sativum* L.). *LWT-Food Science and Technology*, 38(1), 15-19.

Dimitrios, B. (2006). Zdroje přírodních fenolických antioxidantů. *Trends in food science & technology*, 17 (9), 505-512.

Duží, J. (1994). *Užitková zahrada*. Ostrava: Blesk.

Favell, D. J. (1998). A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food chemistry*, 62(1), 59-64.

Fibigr, J. (2019). *Využití HPLC techniky v analýze doplňků stravy na bázi rostlinných extraktů* [disertační práce]. Karlova univerzita.

Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoidy a fenolové kyseliny: Úloha a biochemická aktivita u rostlin a člověka. *Journal of medical plants research*, 5 (31), 6697-6703.

Halliwell, B. (1995). Charakteristika antioxidantů: metodologie a mechanismus. *Biochemical pharmacology*, 49 (10), 1341-1348.

Hemilä, H., & Douglas, R. M. (1999). Vitamin C a akutní respirační infekce. *The international journal of tuberculosis and lung disease*, 3 (9), 756-761.

Hertog M. G. L., Holhnan P. C. H., Katan M. B. & Kromhout D. (1993b) Estimation of daily intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr. Cancer* 20, 21-29.

Huang, Z., Wang, B., Eaves, D. H., Shikany, J. M., & Pace, R. D. (2007). Profil fenolických sloučenin vybrané zeleniny často konzumované Afroameričany na jihovýchodě Spojených států. *Food Chemistry*, 103 (4), 1395-1402.

Chaleshtori, R. S., Rokni, N., Razavilar, V., & Kopaei, M. R. (2013). Hodnocení antibakteriální a antioxidační aktivity estragonového (*Artemisia dracuncululus* L.) silice a jejího chemického složení. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6 (9).

Chen, L. Y., Cheng, C. W., & Liang, J. Y. (2015). Vliv esterifikační kondenzace na Folin–Ciocalteu metodu pro kvantitativní měření celkových fenolů. *Chemie potravin*, 170, 10-15.

Chrpová, D., Kouřimská, L., Gordon, M. H., Heřmanová, V., Roubíčková, I., & Panek, J. (2010). Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medical conditions. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(4), 317-325.

Ishikawa T., Kondo K. & Kitajima J. (2003). Water-soluble constituents of coriander. *Chem Pharm Bull* 51: 32–39.

Isbilir, S., & Sagiroglu, A. (2011). Antioxidační potenciál různých extraktů z listů kopru (*Anethum graveolens* L.). *International Journal of food properties*, 14 (4), 894-902.

Ježková, K., Pavlíková, P., Dobiáš, P., Adam, M., & Ventura, K. (2010). Analýza kyseliny L-askorbové v nápojích s využitím techniky MEPS. *Chemické listy*, 104.

Khanbabaee, K., & Van Ree, T. (2001). Třísloviny: klasifikace a definice. *Zprávy o přírodních produktech*, 18 (6), 641-649.

Kostova, I., Bhatia, S., Grigorov, P., Balkansky, S., S. Parmar, V., K. Prasad, A., & Saso, L. (2011). Coumarins as antioxidants. *Current medicinal chemistry*, 18(25), 3929-3951.

Kratchanová, M., Denev, P., Číž, M., Lojek, A., & Mihailov, A. (2010). Hodnocení antioxidační aktivity léčivých rostlin obsahujících polyfenolové sloučeniny. Porovnání dvou extrakčních systémů. *Acta Biochimica Polonica*, 57 (2).

Křížek, M. & Šíma j. (2015). *Analytická chemie*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta.

Kubíková, D. (2010). *Stanovení paracetamolu, kyseliny askorbové a fenylefrinu ve farmaceutických přípravcích pomocí micelární elektrokinetické chromatografie* [rigorózní práce]. Karlova univerzita.



Leibovitz, B.E. & Mueller, J.A. (1993) Bioflavonoids and polyphenols: medical applications. *J. Optimal Nutr.* 2, 17-35.

Lin, Y., Shi, R., Wang, X., & Shen, H. M. (2008). Luteolin, flavonoid s potenciálem pro prevenci a terapii rakoviny. *Současné cíle proti rakovině*, 8 (7), 634-646.

Liu, R. H. (2013). Dietní bioaktivní látky a jejich zdravotní důsledky. *Journal of food science*, 78 (s1), A18-A25.

Maobe, M.A., Gitu, L., Gatebe, E., Rotich, H., & Box, P.O. (2012). Fytochemická analýza fenolu a flavonoidu v osmi vybraných léčivých bylinách používaných k léčbě cukrovky, malárie a zápalu plic v Kisii v Keni. *Acad J Cancer Res*, 5 , 31-9.

Mattila, P., & Hellström, J. (2007). Fenolové kyseliny v bramborách, zelenině a některých výrobcích z nich. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 (3-4), 152-160.

Merken, H.M. & Beecher G.R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (3,) s. 577-599.

Mirjalili, M.H., & Javanmardi, J. (2012). Libeček. In *Handbook of Herbs and Spices* (str. 371-390). Nakladatelství Woodhead.

Moravcová, G. (2013). *Spektrofotometrické stanovení kyseliny askorbové ve zbarvených vzorcích* [Bakalářská práce]. Vysoké učení technické.

Mukhtar H., Das M., Khan W. A., Wang Z. Y., Bik D. P. & Bickers D. R. (1988). Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-, benzo(a)- pyrene-, 3-methylcholanthrene-, and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice. *Cancer Res.* 48, 2361-2365.

Ong, K.C., & Khoo, H.E. (1997). Biologické účinky myricetinu. *Obecná farmakologie: Vaskulární systém*, 29 (2), 121-126.

Peleška, S. (1995). *Zelenina na zahrádce a balkoně*. Praha: Brána.

Pietta, P.G. (2000). Flavonoidy jako antioxidanty. *Journal of natural products*, 63 (7), 1035-1042.

Pushpangadan, P., & George, V. (2012). Bazalka. In *Průručka bylinek a koření* (s. 55-72). Indie: Nakladatelství Woodhead.

Rover, M.R., & Brown, R.C. (2013). Kvantifikace celkových fenolů v bio-oleji metodou Folin–Ciocalteu. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104, 366-371.

Sahib, N.G., Anwar, F., Gilani, A.H., Hamid, A.A., Saari, N., & Alkharfy, K.M. (2013). Koriandr (*Coriandrum sativum* L.): Potenciální zdroj vysoce hodnotných složek pro funkční potraviny a nutraceutika – přehled A. *Phytotherapy Research*, 27 (10), 1439-1456.

Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A. & Martins, N. (2019). Terapeutický potenciál apigeninu. *Mezinárodní časopis molekulárních věd*, 20 (6), 1305.

Sasazuki, S., Sasaki, S., Tsubono, Y., Okubo, S., Hayashi, M., & Tsugane, S. (2006). Účinek vitamínu C na běžné nachlazení: randomizovaná kontrolovaná studie. *Evropský časopis klinické výživy*, 60 (1), 9-17.

Shahrajabian, M.H., Sun, W., & Cheng, Q. (2020). Chemické složky a farmakologické výhody bazalky (*Ocimum basilicum*): přehled. *International Journal of Food Properties*, 23 (1), 1961-1970.

Shukla, S., & Gupta, S. (2010). Apigenin: slibná molekula pro prevenci rakoviny. *Farmaceutický výzkum*, 27 (6), 962-978.

Schmidt, Š., Šardzíková, I., & Sekretář, S. (2002). Výskyt, struktúra a účinek přírodních antioxidantů. Bratislava: *Katedra potravinárskej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU*

Smith C., Halliwell B. & Aruoma O. L. (1992) Protection by albumin against the pro-oxidant actions of phenolic dietary components. *Food Chem. Toxicol.* 30, 483-489.

Steinbach, G. (1997). *Lexikon užitkových rostlin*. Praha: Knižní klub.

Surveswaran, S., Cai, Y.Z., Corke, H., & Sun, M. (2007). Systematické hodnocení přírodních fenolických antioxidantů ze 133 indických léčivých rostlin. *Chemie potravin*, 102 (3), 938-953.

Svršek, J. (1997). Rostlinné jedy, 1. In: *Natura* [online]. 1997, č. 4 [cit. 2012-01-08]. ISSN 1212-6748. Dostupné z: <http://natura.baf.cz/natura/1997/4/9704-6.html>

Šířoká, J. (2019). *Vliv kuchyňských úprav na obsah fenolických látek v miřiku celeru (Apium graveolens)* [diplomová práce]. Jihočeská univerzita.

Tomas-Barberan F., Espin J.C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality of fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.*, 81: 853-876.

Tříška, J. & Houška, M. (2012). Physical methods of resveratrol induction in grapes and grape products – A Review. *Czech J. Food Sci.*, 30 (6), 489–502.

Vachová, S. (2012). *Flavonoidy a jejich význam pro lidské zdraví* [Bakalářská práce]. Mendelova univerzita.

Válková, A. (2018). *Kvercetin a rutin: jejich stabilita a vliv na zdraví člověka* [Bakalářská práce]. Univerzita Pardubice.

Velíšek, J. & Hajšlová, J. (2009a). *Chemie potravin I* (3rd ed.). Tábor: OSSIS.

Velíšek, J. & Hajšlová, J. (2009b). *Chemie potravin II* (3rd ed.). Tábor: OSSIS.

Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K., & Toivonen, P. (2003). Antilisteriální aktivita vybraných fenolových kyselin. *Food Microbiology*, 20 (3), 305-311.

Wollenweber E. (1982) Flavones and flavonols. In *The Flavonoids: Advances in Research*. (Edited by Harborne J. B. and Mabry T. J.), pp. 189-259. Chapman and Hall, London.

Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S.S. (2004). Flavonoidy v potravinách a jejich přínosy pro zdraví. *Rostlinné potraviny pro lidskou výživu*, 59 (3), 113-122.

## Seznam použitých zdrojů obrázků

*Bazalka-elixír dobré nálady*. (2011). Magazín zahrada. Retrieved March 28, 2022, from <https://www.magazinzahrada.cz/bazalka-elixir-dobre-nalady/>

*Kopr vonný*. (2018). Ifauna.cz. Retrieved March 28, 2022, from <https://www.ifauna.cz/drubez/clanky/r/detail/8187/poklady-z-prirody-50-kopr-vonny/>

*Koriandr setý*. (2014). Ifauna.cz. Retrieved March 28, 2022, from <https://www.ifauna.cz/drubez/clanky/r/detail/8414/poklady-z-prirody-63-koriandr-sety/>

*Libeček lékařský*. (2010). Wikimedia commons. Retrieved March 28, 2022, from <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Liebst%C3%B6ckel.JPG>

*Myricetin*. (2020). MedChemExpress. Retrieved March 28, 2022, from <https://www.medchemexpress.com/Myricetin.html>

*Morin*. MedChemExpress. Retrieved March 30, 2022, from <https://www.medchemexpress.com/morin.html>

*Luteolin*. Laboratoře LKT. Retrieved March 30, 2022, from <https://lktlabs.com/product/luteolin/>

*Quercetin.* MedChemExpress. Retrieved March 30, 2022, from <https://www.medchemexpress.com/Quercetin.html>

*Apigenin.* Cymitquimica.com. Retrieved March 30, 2022, from <https://cymitquimica.com/products/11-1102S/520-36-5/apigenin/>

*Kaempferol.* Retrieved March 30, 2022, from <https://www.medchemexpress.com/Kaempferol.html>