



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE EXTRAKTŮ ECHINACEY

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF ECHINACEA EXTRACTS

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jana Pallová

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2021

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1563/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Jana Pallová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Příprava a charakterizace extraktů echinacey

### Zadání diplomové práce:

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

### Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

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

-----  
Bc. Jana Pallová  
student(ka)

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

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

V Brně dne 1.2.2021

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

## ABSTRAKT

*Echinacea purpurea* je bohatým zdrojom biologicky aktívnych látok, ktorým sú pripisované viaceré terapeutické účinky. Táto práca sa zaoberala optimalizáciou extrakčného procesu vzhľadom na zisk týchto látok. Ako typ použitej extrakcie bola vybraná macerácia, kvôli jej jednoduchosti. Za optimálne podmienky boli vybrané – pomer navážky k rozpúšťadlu 1:5, 40% etanol, 60°C, 60 minút.

Následne týmto optimalizovaným procesom bol pripravený extrakt so sušených kvetov *Echinacey purpurey*, ktorý bol presnejšie charakterizovaný. Bola zistená koncentrácia polyfenolických látok  $365,18 \pm 3,51$  [ $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{l}^{-1}$ ] a antioxidačná aktivita bola stanovená na  $507,50 \pm 6,89$  [ $\text{mg}_{\text{TEAC}} \cdot \text{l}^{-1}$ ]. Schopnosť zhasovať kation-radikál ABTS<sup>•+</sup> bola vypočítaná na  $95,45 \pm 1,30$  %. Zisťovaná bola aj antimikrobiálna aktivita extraktu voči 3 mikroorganizmom – baktériam *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* a kvasinke *Candida glabrata*. Avšak nebol detegovaný žiadny inhibičný účinok rastu mikroorganizmov. Počet identifikovaných aromatických látok bol 39, z ktorých najväčšiu skupinu predstavovali seskviterpény (70,9 %).

Získané výsledky potvrdzujú, že extrakt *Echinacey* vykazuje antioxidačnú aktivitu a obsahuje radu zaujímavých aromatických látok. Má tak dobrý potenciál pre využitie ako prírodný zdroj nutrične i sensoricky cenných látok, napr. s aplikáciou do rôznych potravín a pochutín.

## ABSTRACT

*Echinacea purpurea* is a rich source of biologically active compounds, which are attributed to several therapeutic effects. This thesis is focused on the optimization of the extraction process, considered these substances. Maceration was chosen as a type of extraction, due to its simplicity. The Optimal conditions were solid-solvent ratio 1: 5, 40% ethanol, 60 °C, 60 minutes.

An extract from the dried flowers of *Echinacea purpurea* was prepared by this optimized process. The content of total phenolic compounds was set on  $365.18 \pm 3.51$  [ $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{l}^{-1}$ ] and the antioxidant activity was  $507.50 \pm 6.89$  [ $\text{mg}_{\text{TEAC}} \cdot \text{l}^{-1}$ ]. The percentage of radical scavenging activity ABTS<sup>•+</sup> was  $95.45 \pm 1.30$ . The antimicrobial activity of the extract was tested against 3 microorganisms – *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Candida glabrata*. There was not detected inhibitory effect on the growth of microorganisms. In a total, 39 volatile compounds were identified, and the biggest group were represented sesquiterpenes (70.9%).

The obtained results confirm that *Echinacea* extract has antioxidant activity and contains several interesting aromatic substances, In the future, it can be used as a natural resource of nutritionally and sensory valuable compounds, e.g., into various foods and delicacies.

## KLÚČOVÉ SLOVÁ

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

## KEY WORDS

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

PALLOVÁ, Jana. *Příprava a charakterizace extraktů echinacey* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-30]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131318>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som citovala správne a úplne. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

Podpis študenta

## **Pod'akovanie:**

Rada by som touto cestou poďakovala Ing. Eve Vítovej, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady, pripomienky, ochotu a čas, ktorý mi venovala pri spracovávaní tejto diplomovej práce. Taktiež by som rada poďakovala Bc. Kataríne Palkovskej, s ktorou som pracovala v laboratóriu.

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČASŤ</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Rod Echinacea</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>Echinacea purpurea</b> .....	<b>10</b>
2.2.1	Popis rastliny .....	10
2.2.2	Pestovanie .....	11
2.2.3	Bioaktívne látky <i>Echinacey purpurey</i> .....	12
2.2.4	Prchavé látky a esenciálne oleje <i>Echinacey purpurey</i> .....	13
2.2.5	Antioxidačné účinky .....	16
2.2.5.1	Antioxidanty a mechanizmus ich účinku .....	16
2.2.5.2	Antioxidačné účinky <i>Echinacey</i> .....	17
2.2.6	Antimikrobiálne účinky .....	20
2.2.6.1	Antimikrobiálne látky .....	20
2.2.6.2	Antimikrobiálne účinky <i>Echinacey purpurey</i> .....	20
<b>2.3</b>	<b>Možnosti získavanie rastlinných extraktov – extrakčné metódy</b> .....	<b>22</b>
2.3.1	Konvenčné extrakčné metódy .....	23
2.3.2	Nekonvenčné metódy .....	24
2.3.3	Získavanie rastlinných extraktov – aplikácie na <i>Echinaceu</i> .....	26
<b>2.4</b>	<b>Metódy stanovenia antioxidačnej aktivity</b> .....	<b>27</b>
2.4.1	DPPH test .....	27
2.4.2	Metóda TEAC .....	27
2.4.3	FRAP .....	28
2.4.4	ORAC .....	28
2.4.5	Folin-Ciocalteuová metóda .....	29
<b>2.5</b>	<b>Metódy stanovenia antimikrobiálnej aktivity</b> .....	<b>29</b>
2.5.1	Difúzne metódy .....	29
2.5.1.1	Disková difúzna metóda .....	29
2.5.1.2	Difúzna jamková metóda .....	30
2.5.1.3	E-test .....	30
2.5.2	Dilučné metódy .....	30
<b>2.6</b>	<b>Metódy stanovenia prchavých látok</b> .....	<b>30</b>
2.6.1	Mikroextrakcia tuhou fázou .....	30
2.6.2	Plynová chromatografia .....	31
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Laboratórne vybavenie</b> .....	<b>33</b>
3.1.1	Prístroje a vybavenie .....	33
3.1.2	Použité chemikálie .....	33

3.1.3	Analyzované vzorky.....	33
<b>3.2</b>	<b>Metódy a postup práce .....</b>	<b>34</b>
3.2.1	Optimalizácia typu rozpúšťadla.....	35
3.2.2	Optimalizácia navážky .....	35
3.2.3	Optimalizácia doby extrakcie .....	35
3.2.4	Optimalizácia teploty extrakcie.....	36
3.2.5	Stanovenie celkových fenolických látok.....	36
3.2.6	Stanovenie aromatických látok .....	37
3.2.6.1	Podmienky SPME extrakcie .....	37
3.2.6.2	Podmienky GC-MS analýzy .....	37
3.2.7	Stanovenie antioxidačnej aktivity .....	38
3.2.8	Stanovenie antimikrobiálnej aktivity.....	39
<b>3.3</b>	<b>Štatistické spracovanie výsledkov .....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSIA .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Optimalizácia macerácie .....</b>	<b>41</b>
4.1.1	Optimalizácia typu (koncentrácie) rozpúšťadla.....	41
4.1.2	Optimalizácia navážky materiálu.....	45
4.1.3	Optimalizácia doby extrakcie .....	48
4.1.4	Optimalizácia teploty extrakcie.....	51
<b>4.2</b>	<b>Charakterizácia optimalizovaného extraktu.....</b>	<b>54</b>
4.2.1	Stanovenie celkovej koncentrácie fenolických látok a antioxidačnej aktivity.....	55
4.2.2	Stanovenie antimikrobiálnej aktivity.....	55
4.2.3	Stanovenie aromatických látok .....	57
<b>5</b>	<b>ZÁVER.....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>ZOZNAM PRÍLOH .....</b>	<b>69</b>

# 1 ÚVOD

*Echinacea* purpurová patrí k najznámejším druhom rodu *Echinacea*, nielen pretože je obľúbenou okrasnou rastlinou, ktorá zdobí parky a záhrady, ale hlavne pretože má vyhlásené liečivé účinky. Dá sa povedať, že pre severoamerických Indiánov predstavovala posvätnú bylinu, ktorou sa dá skoro všetko vyliečiť.

Medzi terapeutické vlastnosti *Echinacey* patria imunomodulačné (posilňuje imunitný systém pri ochorení), protizápalové, protirakovinové, antimutagénne, antioxidantné, antimikrobiálne účinky a veľa ďalších. Nadzemné časti a korene vykazujú silnú antivírusovú aktivitu a môžu napomáhať pri chrípkovom ochorení alebo ochoreniach spôsobených vírusmi herpes simplex, koronavírusom a ďalšími. Čo je jej veľkým pozitívom, že je pomerne bezpečná, nevykazuje toxicitu.

Výrobky s ňou patria k popredným na trhu. V potravinárstve je využívaná skôr ako doplnok stravy vo forme tinktúr, čajov, sprejov, tabliet často v kombinácii s ďalšími bylinami, minerálmi, či vitamínmi. Extrakty *Echinacey* sú bohaté na bioaktívne látky ako deriváty kyseliny kávovej, alkylamidy, alkaloidy, flavonoidy, fenolické kyseliny a polysacharidy. Alkylamidy sú situované najmä v koreňoch a za hlavnú zlúčeninu nadzemných častí je považovaná kyselina cichorová.

V súčasnej dobe stúpol záujem ľudí o stravu, ktorá bude mať aj blahodarne a zdravie podporujúce účinky. Vo všeobecnosti sa vo svete využívajú rozličné byliny ako prevencia alebo na liečbu zdravotných komplikácií. Rôzne bylinné extrakty vykazujú pozitívne účinky ak sú súčasťou vyváženej stravy.

Z vyššie zvedených dôvodov bolo cieľom tejto práce zisk extraktu *Echinacey* a jeho komplexnej charakterizácie z hľadiska antioxidantného, antimikrobiálneho a sensorického, za účelom posúdenia jeho potenciálu pre prírodné využitie v potravinárstve.



## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

Táto práca je zameraná na možnosti získavania extraktov z *Echinacey* s maximálnym zachovaním biologicky aktívnych látok. Bola vypracovaná literárna rešerš zaoberajúcou sa charakteristikou antioxidantných a antimikrobiálnych vlastností *Echinacey purpurey* a jej biologicky aktívnych látok a zároveň optimalizáciou metód ich získavania a stanovovania.

### 2.1 Rod Echinacea

Rod *Echinacea* patrí do bohatej a rozšírenej čeľade astrovité (*Asteraceae*). Názov rodu je odvodený z gréckeho slova „echinos“, čo znamená v preklade ježovka. Toto pomenovanie vychádza z podoby medzi pichľavým súkvetím echinacey a ježovky. Do rodu *Echinacea* patrí 9 uznávaných taxonómov (*E. leavigata*, *E. atrorubens*, *E. paradoxa*, *E. tennesseensis*, *E. simulata*, *E. sanguinea*), pričom len 3 z majú nich ekonomickú hodnotu a to *E. pallida*, *E. angustifolia*. a *E. purpurea*. [1, 2, 3, 4]

Domovom tohto rodu je rozsiahle územie severu a severozápadu Severnej Ameriky. Pôvodné populácie sú rozšírené predovšetkým východne od Skalnatých hôr na území Spojených štátov a Kanady. [4] Druhovo najrozmanitejšia oblasť leží v pásme od pohoria Ozark v Missouri na juh k trávnatým plochám v Oklahome. [3]

Pôvodný Američania využívali byliny rodu *Echinacey* ako všeliek. Aplikovali si ich pri bolestiach zubov, pri popáleninách, k napomáhaniu hojenia, k vyplachovaniu očí, pri uhryznutí hadom, poprípade pri liečení zvierat a pri mnohých iných zdravotných ochoreniach a problémoch. Pripravovali si napríklad čaje z koreňov, ktoré používali pri reumatizme, artritíde, či osýpkach. [1, 2]

Druhy z rodu *Echinacea* boli umiestnené do rodu *Rudbeckia* a *Branuneria*, preto v skorších textoch môžu byť spomenuté tieto pomenovania. Pri svojej slávnej expedícií Lewis s Clarkom (1803 – 1086) sa dostali do styku s touto užitočnou rastlinou a rozhodli sa poslať korene a semená (*E. angustifolia*) vtedajšiemu prezidentovi Thomasovi Jeffersonovi. *Echinacea purpurea* ako prvá z druhov bola v roku 1830 spomenutá v euroamerickej lekárskej knihe Medical Botany. Do Európy sa dostali druhy *Echinacea* najprv len ako dekoratívne bylinné trvalky, ale postupom času nadobúdali na popularite aj ich liečiteľské vlastnosti. [1, 4]

V posledných rokoch je dopyt po *Echinacee* a prípravkov ju obsahujúcich veľmi rozšírený. [1] Predaj sa pohybuje v miliónoch dolárov ročne. *Echinacea leavigata* je uvedená ako ohrozený druh, pretože jej výskyt je vzácny. Takisto aj *E. tennesseensis* patrila do roku 2011 do tohto zoznamu ohrozených druhov, avšak bola odstránená vďaka úspešnej obnove. [1, 5]

K charakteristickými črtám patria kvitnúce hlávky kvetov, s pestrou paletou farieb od bielej, cez ružovú až po tmavofialovú a majúce uprostred úbor s oranžovými až červeno-fialovými koncami, ktoré vytvárajú ostnatý kužeľ. Stonky sú jednoduché, najčastejšie nerozvetvené, s hladkými i chlpatými listami, ktoré vyrastajú vo väčšine prípadov z jedného koreňa. Sú tolerantné k suchu. [1]

### *Echinacea bleďá*

*Echinacea bleďá* (lat. *Echinacea pallida*) rastie aď do vŕšky 140 cm. Má sa ũzkymi zvyčajne nerozvetvenmi stonkami s kopijovitmi listami. Typickým znakom tohto druhu je biely peľ s najväčšmi peľovými zrnami. Kvety sa vyznačj bielou aď ruřovou farbou (viď Obrázok 1). Obdobie kvitnutia zaina koncom jari, začiatkom leta a nepretržite kvitne aď do septembra. [1, 3] Vyskytuje sa východnejšie od *E. angustifolia* a to najčastejšie v slnečných a dobre priepustných prrich. [1]

### *Echinacea ũzkolist*

*Echinacea ũzkolist* (lat. *Echinacea angustifolia* DC.) je trvca bylina s menšou jednoduchou, nerozvetvenou stonkou nescou svetlo ruřov kvety (viď Obrázok 1). Dosahuje maximln vŕšku okolo 50 - 60 cm. Charakteristickou črtou sú sto zelen, ũzke, kopijovte listy bez zubkovtch okrajov. [3] Obva such, kamenst prrie východne od Veľkých prri v USA a vďaka hlbokému koreňu je dobre prispsoben na such podmienky. Ako jedin druh rastie i severnejšie a zasahuje do Kanady. [1]



Obrázok 1 *Echinacea pallida* (vľavo) [6] a *Echinacea angustifolia* (vpravo) [7]

## 2.2 *Echinacea purpurea*

### 2.2.1 Popis rastliny

*Echinacea purpureov* (lat. *Echinacea purpurea* (L.) Moench, es. trpatka nachov) je jedna z najbeřnejšie pouřivanch a najpestovanejch liečivch látok a najviac preštudovanm druhom z rodu *Echinacej*, ktor sa v našich oblastiach často pestuje ako psobiv ozdobn kvetina. [1, 2, 3] Jej taxonomick zaradenie sa nachádza v Tabuľke 1.

Drsn, vzpriamen stonka s hladkými chlpkami dosahuje vŕšku 60 – 180 cm. K rozlišujúcim vlastnostiam tohto druhu patria protistojnte kopijovte listy, pri konci zaoblen, nepravidelne plkovte. [1] Ako jedin druh z rodu *Echinacea* m hlbok vlknt koreňov system. [1, 3]



Obrázok 2 *Echinacea purpurea* [8]

Typické široké purpurové kvety (viď Obrázok 2) majú predovšetkým záhradné kultivary, vo voľnej prírode sú oveľa rozmanitejšie vo farbe i v tvare. Jazykovité lupene najskôr odstávajú, starnutím začínajú ovisieť smerom nadol. Stred kvetného lôžka tvorí vypuknutý úbor s pružnými, rovnými hrotmi, ktorých konce sú zakončené typickou oranžovou farbou. Kvety bývajú sfarbené od ružových až po sýto fialové, zriedka sú biele. [1, 3]

Tabuľka 1 Taxonomické zaradenie [9]

Ríša	Rastliny ( <i>Plantae</i> )
Podríša	Zelené rastliny ( <i>Viridiplantae</i> )
Kmeň	Cievnaté rastliny ( <i>Tracheophyta</i> )
Podkmeň	Semenné rastliny ( <i>Spermatophytina</i> )
Trieda	Dvojkličnolistové ( <i>Magnoliopsida</i> )
Rad	Astrotvaré ( <i>Asterales</i> )
Čeľaď	Astrovité ( <i>Asteraceae</i> )
Rod	<i>Echinacea</i> ( <i>Echinacea</i> )
Druh	<i>Echinacea purpurea</i> ( <i>Echinacea purpurea</i> )

### 2.2.2 Pestovanie

*E. purpurea* vo voľnej prírode preferuje okraje saván, prerie a lesy často s čiastočným prenikaním slnečného žiarenia. Môže byť nájdená v nížinatých pobrežných oblastiach USA, no vo voľnej prírode nie je úplne obvyklá. [1]

Pestovanie v okrasných záhradách a parkoch je pomerne jednoduché, pretože táto trvalka netrpí príliš chorobami a nie je napadaná vo väčšej miere ani škodcami. *Echinacea* potrebuje pôdu s dostatkom vlhky a vápnika, ale je tolerantná k suchu a obľubuje priame slnečné svetlo. Je mrazuvzdorná. [10]

Kvitne od konca júna až do septembra. [10] Zber sa neobmedzuje na konkrétne časti, využíva sa celá rastlina - kvety, stonky, listy i korene. [3]

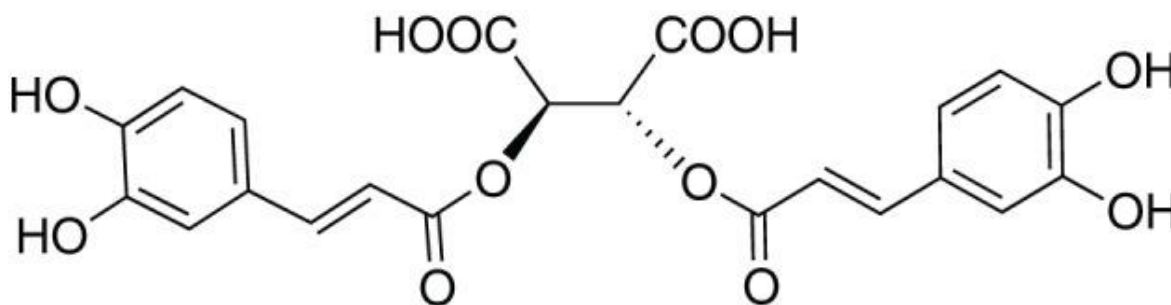
### 2.2.3 Bioaktívne látky *Echinacey purpurey*

Rod *Echinacea* je známy pre svoje pozitívne účinky na ľudské zdravie, ktoré úzko súvisia s ich chemickým zložením. Vo všeobecnosti sa predpokladá, že za účinnosťou týchto rastlín je komplexný systém niekoľkých skupín zložiek a nezodpovedá iba jednej látke, či skupine látok. Medzi jednotlivými časťami rastliny existujú určité rozdiely a platí to samozrejme i medzi jednotlivými druhmi rodu. [11]

#### *Kyselina kávová a jej deriváty*

Kyselina kávová a jej deriváty patria k najcharakteristickejším a najviac skúmaným látkam celkovo v rode *Echinacea*. Sú to fytochemikálie, ktoré prejavujú silné antioxidačné a antiradikálne účinky in vitro a môžu mať i protizápalové účinky. K najčastejšie popisovaným zlúčeninám patria kyselina kaftarová, kyselina chlorogénová, kyselina kávová, cynarín, echinakozid a kyselina cichorová. Avšak ich výskyt a obsah sa líši medzi jednotlivými druhmi. Napríklad echinakozid, ktorý je charakteristický pre *E. pallidu* a *E. angustifoliu*, sa nenachádza v *E. purpurea*, poprípade je ho možné nájsť iba v stopových množstvách. Kyselina kaftarová je detegovaná okolo 4 mg.g<sup>-1</sup> v *E. purpurea*. [11]

Kyselina cichorová (viď Obrázok 3) je hlavnou zložkou koreňa v *E. purpurea* s množstvom v rozmedzí 0,14 – 2,05 % a zároveň je hlavnou zložkou i nadzemných častí (1,2 – 3,1 %). [12] Má imunostimulačné vlastnosti podporujúce aktivitu fagocytov, ochranný účinok na degradáciu kolagénu a taktiež prejavuje antihyaluronidázovú aktivitu, či antivírusovú aktivitu. [13]



Obrázok 3 Kyselina cichorová [14]

#### *Flavonoidy a fenolické látky*

Celkový obsah fenolických látok v koreňoch *E. purpurea* sa odlišuje v závislosti od rôznych podmienok, ale približne sa pohybuje okolo 23 mg.g<sup>-1</sup>, čo ju činí najbohatšiu na obsah fenolických látok v porovnaní s inými druhmi. [1, 13] Lin a kol. [15] vo svojej práci určili poradie obsahu celkových fenolických látok a derivátov kyseliny kávovej v rôznych častiach rastliny zostupne: kvety>listy>stonky>korene.

Flavonoidy v *E. purpurea* boli identifikované v celej rastline, ale hlavným zdrojom sú kvety. V práci Kurkin a kol. [16] izolovali z kvetov nikotiflorin a rutín. Medzi ďalšie zlúčeniny prítomné v *E. purpurea* patrí kvercetín, kaempferol a ich glykozidy. Listy obsahujú okolo

0,48 % flavonoidov (prepočítané na kvercetin). Ako hlavná zložka v listoch a stonkách sa uvádza rutozid. [17]

### ***Alkylamidy***

Alkylamidy sú lipofilné zlúčeniny so substituovanou amidovou skupinou. Preukázalo sa, že alkylamidy majú imunomodulačné vlastnosti, insekticídne a onkologické vlastnosti. V druhoch *Echinaceae* bolo identifikovaných viac ako 25 alkylamidových štruktúr a údajne by sa mali byť významne podieľať na protizápalovej aktivite *Echinaceae*. [11]

Práve alkylamidy tvoria hlavnú lipofilnú zložku *E. purpurea*, a zastúpené sú najmä alkylizobutylamidy alebo alkylmetylbutylamidy. Lokalizované sú predovšetkým v koreňoch, no v menšej miere i v nadzemných častiach. [18] Množstvo sa pohybuje okolo 0,01 % – 0,04 % a obsiahnuté sú predovšetkým 2,4-diénové jednotky. [12]

### ***Polyacetáty a polyény***

Polyacetylény sú hlavnými lipofilnými zložkami koreňov *E. pallidy*. V *E. purpurea* je možné nájsť trideca-1-en-3,5,7,9,10-pentayn a ponticaepoxid. [17]

### ***Polysacharidy a glykoproteíny***

Tieto zlúčeniny boli izolované z rôznych častí druhov rodu *Echinacea* v 80. rokoch a ich štúdium sa zameria predovšetkým na ich imunomodulačnú aktivitu v reakcii na infekcie alebo poranenia. [11]

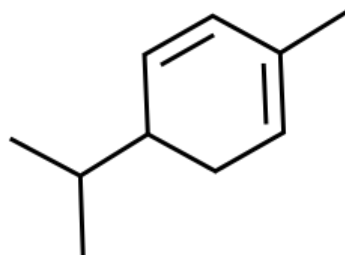
V *E. purpurea* sa vyskytujú glykoproteíny i polysacharidy v celej rastline a medzi izolované polysacharidy patria PS1 (metylglukuronoarabinoxylán), PS2 (arabinorhamnogalaktán) a xyloglukán. [12] Vyšší obsah polysacharidov bol v práci Glavač a kol. [19] stanovený v kvetoch a v rastlinách so zelenými stonkami. K ďalším zlúčeninám, ktoré je možné nájsť v *E. purpurea*, patrí fruktóza a polyméry fruktánu. Nadzemné časti obsahujú asi 10-krát množstva menej fruktánu ako nadzemné časti. [17]

## **2.2.4 Prchavé látky a esenciálne oleje *Echinaceae purpurea***

Esenciálne oleje z rastlín *Echinaceae* sa získavajú z rôznych častí a v rozdielnych obsahoch výťažkov. Medzi jednotlivými druhmi existuje rozdiel v chemickom zložení v dôsledku mnohých vnútorných a vonkajších faktorov. Vo všeobecnosti sa dá dosiahnuť výťažok esenciálnych olejov z *E. purpurea* v rozmedzí 0,05 – 0,48 % z čerstvých rastlín a zo sušeného materiálu sa pohybuje výťažok od 0,1 % do 1,25 %. [17]

Zoznam prchavých látok, ktoré boli doposiaľ detegované v *E. purpurea*, sa nachádza v Tabuľke 2. Tabuľka obsahuje iba prehľad zlúčenín spomenutých vo viacerých štúdiách, nie sú v nej uvedené všetky identifikované látky.

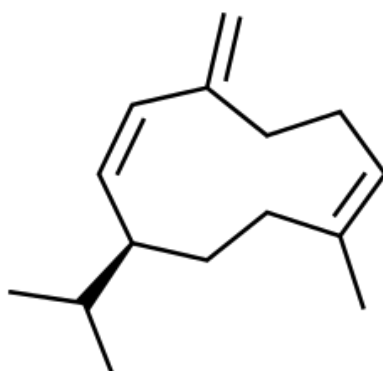
Pri skúmaní aromatických látok rôznych častí *Echinaceae* – kvet, stonka, list a koreň, v štúdií Mazza a kol. [20] bolo identifikovaných viac ako 70 zlúčenín. Koncentrácie esenciálneho oleja v sušenom materiáli sa pohybovali v rozmedzí 0,1 – 1,25 hmot.%. V kvetoch, stonkách a listoch boli majoritnou skupinou terpény, pričom v listoch boli vo väčšej miere zastúpené i aldehydy, estery a alkoholy. Jedine v koreňoch boli určené ako hlavná skupina aldehydy. Hlavná zložka koreňov bol  $\alpha$ -felandrén (viď Obrázok 14).



Obrázok 4  $\alpha$ -Felandrén [21]

V práci Mirjalili a kol. [22] izolovali vzorky esenciálnych olejov zo sušených kvetov. Analyzovali tri liečivé odrody rodu *Echinacea* vypestovaných v Iráne. V *Echinacea purpurea* identifikovali 36 zlúčenín, pričom z celkového počtu až 70,9 % predstavovali seskviterpénové uhľovodíky. Ďalšími skupinami boli kyslíkaté seskviterpény s 15,4 % a monoterpény so 6,4 %. Hlavnú zložku predstavoval Germacrén D (viď

Obrázok 5) so zastúpením 57 % z celkového obsahu esenciálneho oleja vzorky. K hlavným zlúčeninám boli zaradené i  $\beta$ -Karyofylén (4,6 %) a  $\alpha$ -Felandrén (3,2 %).



Obrázok 5 Germacrén D [23]

Pri skúmaní esenciálneho oleja zo sušeného koreňa a listov *Echinacey* z Južnej Afriky, určili Nyalambisa a kol. [24] 25, respektíve 31 zlúčenín. Výťažok esenciálnych olejov bol 0,24 hmot. % (list) a 0,29 hmot. % (koreň). Medzi hlavné zlúčeniny v oboch častiach patrili Germacrén D, Naftalén, Karyofylénoxid, Cedrol  $\alpha$ -Felandrén a  $\alpha$ -Kadinol.

I v ďalších štúdiách bolo preukazné, že seskviterpény tvoria hlavnú skupinu v *Echinacey*, spolu s kyslíkatými seskviterpénami ako druhou najpočetnejšou skupinou. [25] Napríklad v práci Kaya a kol. [26] identifikovali až 92 zlúčenín pri optimalizácii metódy HS-SPME. Vo väčšine prípadov, v rámci použitých vlákien, vyšlo poradie terpenov zostupne: sesquiterpény > seskviterpenoidy > monoterpény > monoterpenoidy a ďalšie.

Vo viacerých prácach patrili medzi hlavné zlúčeniny, obsiahnuté v esenciálnom oleji *E. purpurea*, Germacrén D, Myrcén,  $\alpha$ -Pinén,  $\beta$ -Pinén,  $\beta$ -Karyofylén, 1-Pentadecén a Limonén. Z týchto látok, ako už bolo spomenuté vyššie, Germacrén D je najbohatšie sa vyskytujúcou látkou. [27. 28] Celková koncentrácia prchavých látok i jednotlivých zložiek je ovplyvňovaná

klimatickými podmienkami, v ktorých rastlina rastie. V práci Thappa a kol. [28] koncentrácia Germacrénu D vykazuje stály rast v čase od júna do decembra (z 7,2 % na 33,5 %), ale napr. obsah Myrcénu sa znížil v tom istom období (z 26,1 % na 10,5 %).

Tabuľka 2 Aromatické látky *E. purpurey*

Skupina	Aromatická zlúčenina	Analyzovaná vzorka			
		List	Koreň	Kvet	Stonka
Monoterpény	$\alpha$ -Pinén	X <sup>[20, 24, 27]</sup>	X <sup>[20, 24, 27]</sup>	X <sup>[20, 22, 26, 27, 28]</sup>	X <sup>[20]</sup>
	$\beta$ -Pinén	X <sup>[20, 24]</sup>	X <sup>[20, 24]</sup>	X <sup>[20, 22, 26, 28]</sup>	X <sup>[20]</sup>
	Sabinén	X <sup>[20]</sup>	X <sup>[20]</sup>	X <sup>[20, 22, 28]</sup>	X <sup>[20]</sup>
	Myrcén	X <sup>[20, 27]</sup>	X <sup>[27]</sup>	X <sup>[20, 22, 26, 27, 28]</sup>	X <sup>[20]</sup>
	$\alpha$ -Felandrén	X <sup>[24]</sup>	X <sup>[24]</sup>	X <sup>[22, 26, 28]</sup>	-
	p-Cymén	-	-	X <sup>[22, 26, 28]</sup>	-
	Limonén	X <sup>[20, 24]</sup>	X <sup>[20, 24]</sup>	X <sup>[20, 26, 28]</sup>	X <sup>[20]</sup>
	$\gamma$ -Terpinén	-	-	X <sup>[26, 28]</sup>	-
	$\alpha$ -Tujén	X <sup>[20]</sup>	-	X <sup>[28]</sup>	-
	Kamfén	X <sup>[20]</sup>	X <sup>[20, 24]</sup>	X <sup>[20, 28]</sup>	X <sup>[20]</sup>
Sesquiterpény	$\beta$ -Elemén	X <sup>[27]</sup>	X <sup>[27]</sup>	X <sup>[22, 26, 27, 28]</sup>	-
	$\gamma$ -Elemén	X <sup>[27]</sup>	-	X <sup>[22, 26, 27]</sup>	-
	$\delta$ -Elemén	X <sup>[27]</sup>	-	X <sup>[22], [27] [28]</sup>	-
	$\alpha$ -Bergamotén	X <sup>[27]</sup>	X <sup>[27]</sup>	X <sup>[22, 26, 27]</sup>	-
	$\alpha$ -Copaen	X <sup>[27]</sup>	X <sup>[27]</sup>	X <sup>[22, 26, 27, 28]</sup>	-
	$\beta$ -Karyofylén	X <sup>[27]</sup>	X <sup>[27]</sup>	X <sup>[22, 27, 28]</sup>	-
	$\alpha$ -Humulén	X <sup>[24, 27]</sup>	-	X <sup>[22, 26, 27, 28]</sup>	-
	$\gamma$ -Kurkumén	-	-	X <sup>[22, 26]</sup>	-
	Germakrén D	X <sup>[24, 27]</sup>	X <sup>[24]</sup>	X <sup>[22, 26, 27, 28]</sup>	-
	$\beta$ -Bisabolén	-	-	X <sup>[22, 26]</sup>	-
	$\alpha$ -Farnesén	X <sup>[27]</sup>	-	X <sup>[22, 27]</sup>	-
	$\beta$ -Farnesén	-	-	X <sup>[26, 28]</sup>	-
	$\gamma$ -Kadinén	X <sup>[27]</sup>	-	X <sup>[22, 26, 27]</sup>	-
	$\delta$ -Kadinén	X <sup>[27]</sup>	-	X <sup>[22, 27, 26, 28]</sup>	-
	Cyclosativen	X <sup>[27]</sup>	-	X <sup>[26, 27]</sup>	-
	$\beta$ -Guaien	X <sup>[27]</sup>	-	X <sup>[26, 27]</sup>	-
	$\alpha$ -Muuroolén	X <sup>[27]</sup>	X <sup>[27]</sup>	X <sup>[26, 27, 28]</sup>	-
	Bicyclogermakrén	X <sup>[27]</sup>	-	X <sup>[26, 27, 28]</sup>	-
	$\alpha$ -Bulnesen	X <sup>[27]</sup>	-	X <sup>[26, 27]</sup>	-
	$\alpha$ -Kubeben	X <sup>[24]</sup>	X <sup>[24]</sup>	X <sup>[28]</sup>	-
$\beta$ -Kubeben	X <sup>[24, 27]</sup>	X <sup>[24, 27]</sup>	X <sup>[26, 27, 28]</sup>	-	

Tabuľka 2 Aromatické látky *E. purpurey* – pokračovanie

Skupina	Aromatická zlučenina	Analyzovaná vzorka			
		List	Koreň	Kvet	Stonka
Kyslíkaté seskviterpény	Nerolidol	-	-	X <sup>[22, 26]</sup>	-
	Spatulenol	-	-	X <sup>[22, 26, 28]</sup>	-
	Karyofylín oxid	X <sup>[24]</sup>	X <sup>[24]</sup>	X <sup>[22, 26, 28]</sup>	-
	Guaiol	-	-	X <sup>[22, 26]</sup>	-
	Globulol	-	-	X <sup>[22, 26]</sup>	-
	Kubenol	-	-	X <sup>[22, 26, 28]</sup>	-
	$\alpha$ -Kadinol	X <sup>[24]</sup>	X <sup>[24]</sup>	X <sup>[22, 26]</sup>	-
	6-Isocedrol	-	-	X <sup>[22, 26]</sup>	-
	$\beta$ -Eudesmol	-	-	X <sup>[26, 28]</sup>	-
<b>Monoterpenoidy</b>	Trans-Karveol	X <sup>[24]</sup>	X <sup>[24]</sup>	X <sup>[26]</sup>	-
<b>Ďalšie</b>	Hexanal	X <sup>[20]</sup>	X <sup>[20]</sup>	X <sup>[20, 26]</sup>	X <sup>[20]</sup>
	2-Hexenal	X <sup>[20, 24]</sup>	X <sup>[20, 24]</sup>	X <sup>[20, 28]</sup>	X <sup>[20]</sup>
	p-Cymen-8-ol	-	X <sup>[24]</sup>	X <sup>[26]</sup>	-

## 2.2.5 Antioxidačné účinky

### 2.2.5.1 Antioxidanty a mechanizmus ich účinku

V rámci priemyselných procesov boli antioxidanty používané už koncom 19. storočia, avšak ich veľký význam v potravinách i v ľudskom tele si ľudia začali uvedomovať až postupom času. [29]

Antioxidanty predstavujú heterogénnu skupinu zlučenín alebo systémov, ktoré interagujú s voľnými radikálmi a zabraňujú a predchádzajú poškodeniu životne dôležitých látok a systémov. [30] Sú schopné spomaliť alebo eliminovať oxidáciu a to vo veľmi malom množstve (<1 %; 1-1000 mg·l<sup>-1</sup>) v porovnaní s oxidovaným materiálom (s množstvom materiálu, ktorý ochraňujú). [31] V prípade, že dôjde k ich strate, inaktivácii alebo ich vyčerpaniu, môže nastať narušenie bunkového redoxného prostredia a následne k zdravotným poškodeniam spojeným s ďalšími komplikáciami. [32]

Antioxidačné látky môžu byť rozdelené na priame (enzymatické) a nepriame (neenzymatické). [31] V biologických systémoch je oxidácia primárne sprostredkovaná radom redoxných enzýmov, no zároveň môže dôjsť i neenzymatickej oxidácii lipidov. [33] Priame antioxidanty bezprostredne ovplyvňujú procesy s radikálmi bránením ich počiatočnej tvorby alebo poprípade im konkurujú za vzniku nereaktívnych látok. Nepriame antioxidanty sú prírodné produkty, ktoré skôr podporujú antioxidačný systém, napr. zvýšením aktivity antioxidačných enzýmov. [31] K nim radíme prechodné metalocheláty, inhibítory oxidačných enzýmov, kofaktory antioxidačných enzýmov a látky zachytávajúce ROS (reaktívne formy síry)/ RNS (reaktívne formy kyslíka). [33]

Mnohé antioxidačné látky boli izolované z prírodných zdrojov ako sú bylinky, korenie, či zelenina. Boli vyvinuté i syntetické antioxidanty vo výskumných laboratóriách, k nim patrí

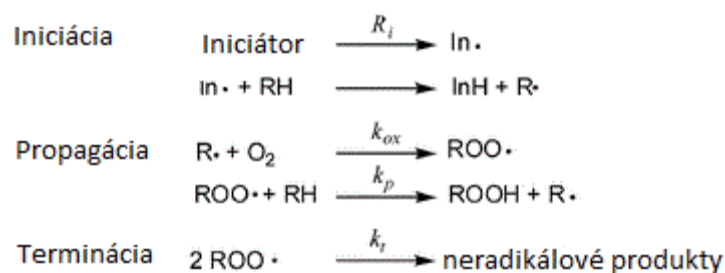


butylovaný hydroxyanizol (BHA), butylovaný hydroxytoluén (BHT) a propylgalát (PG). Medzi antioxidanty pochádzajúce z rastlín a ktoré môžu byť prijímané potravou patria vitamíny (kyselina askorbová, tokoferoly), karotenoidy (kondenzované triesloviny, xantofyly a karotény), flavonoidy (flavóny, izoflavíny, flavonoly, flavanoly, flavanóny), fenolové kyseliny (kyselina hydroxy-benzoová a kyselina škoricová), fenolové alkoholy, stilbény, lignany, triesloviny, antioxidanty obsahujúce síru a neoformované zlúčeniny (melanoidíny). [29]

ROS a RNS sú malé difúzne molekuly, ktoré sú prirodzenou súčasťou organizmov. Sú tvorené nepretržite ako vedľajšie produkty metabolizmu a aeróbného dýchania. Tvorba ROS v rastlinách je lokalizovaná v mitochondriách a chloroplastoch. Ich nadprodukcia môže predstavovať hrozbu pre bunky a to z dôvodu možného oxidačného poškodenia až bunkovej smrti. Zvýšená hladina ROS v ľudskom tele môže viesť až k disfunkciám orgánov a vyššiemu riziku rozvoja chronickým chorôb, ako sú dýchacie, neurologické, srdcové a reprodukčné choroby alebo rôzne typy rakovín. Rastliny si vytvorili vlastné antioxidačné obranné systémy ako reakciu na abiotické a biotické faktory prostredia. [32] Antioxidačná aktivita sa prejavuje podľa niekoľkých možných mechanizmov a účinnosť závisí od chemických vlastností a umiestnenia v potravine. [30]

Autooxidácia (viď Obrázok 6) molekúl prebieha reťazovou reakciou sprostredkúvanou kyslíkovým radikálom. Pozostáva z troch krokov, ktoré sa opakujú v niekoľkých cykloch, dokiaľ nedôjde k náhodnej zrážke, k náhodnému uhaseniu radikálov v terminačnom kroku. Voľné radikály sú iniciátormi tohto procesu a to bez ohľadu na ich pôvod alebo štruktúru. Reagujú so substrátom RH, čím sa získa alkylový radikál R•, ktorý ďalej reaguje s kyslíkom za vzniku peroxylového radikálu ROO•. Jeho účinkami na inú molekulu substrátu vznikne hydroperoxid ROOH a ďalší radikál. [31]

Obrázok 6 Autooxidácia [34]



### 2.2.5.2 Antioxidačné účinky *Echinacey*

Viacere látky rodu *Echinacey* vykazujú antioxidačnú aktivitu a aktivitu zachytávania voľných radikálov, ktoré sa môžu podieľať na vzniku zápalu. Preto tieto látky môžu pozitívne ovplyvňovať a zvyšovať protizápalový účinok rastliny. [17] Stručný zoznam použitých metód, ktoré sa použili pri stanovovaní antioxidačných účinkov je v Tabuľke 3.

V práci Pires a kol. [35] pozorovali rozdiely medzi extraktami čerstvých a sušených častí *E. purpurey* a doplnkami výživy vo forme tabliet a sirupu, ktoré obsahovali *Echinaceu*. Zistili zreteľné rozdiely v antioxidačnej aktivite jednotlivých vzoriek. Alkoholový extrakt pripravených z čerstvej rastliny vykazoval najvýraznejšie účinky aktivity a bol najefektívnejší, čo bolo potvrdené aj vysokým obsahom flavonoidov (124,83 mg·g<sup>-1</sup>) a fenolických látok

(229,22 mg·g<sup>-1</sup>). Najnižší antioxidačný potenciál bol pozorovaný v sirupe, čo môže mať súvislosť s chemickým zložením

V ďalšej štúdií sa porovnávala antioxidačná aktivita etanolového extraktu z kvetov *Echinacey* s kyselinou askorbovou, BHA, EDTA a  $\alpha$ -tocoferolmi. So zvyšujúcou sa koncentráciou rástla aj schopnosť zachytávať radikály a extrakt vykazoval vyšší antioxidačný potenciál ako  $\alpha$ -tocoferoly. Avšak na dosiahnutie rovnakej aktivity ako kyselina askorbová bolo potrebné 4-krát väčšie množstvo extraktu. Obsah celkových fenolických látok bol stanovený na 437,34 mg/g. [36] Pri porovnaní antioxidačnej aktivity so syntetickým BHA, má rastlinný extrakt oveľa slabší účinok, ktorý sa ale významne znižuje v množstvách nad 50  $\mu$ g/ml. [37]

Erenler a kol. [38] určovali antioxidačnú aktivitu dvojakých extraktov z kvetov a listov *E. purpurey* a *E. pallidy*. Vodné extrakty vo všeobecnosti mali nižšie hodnoty fenolických látok, proti metanolovým extraktom. Avšak práve vodné extrakty kvetov i listov vykazovali výbornú antioxidačnú aktivitu.

Toto tvrdenie sa preukázalo aj v štúdií Mohameda a kol. [39], vodný výťažok z listov dosahoval vyššej hodnoty pri stanovovaní celkového množstva fenolických látok (56,7 mg·g<sup>-1</sup>) ako extrakty z kvetov. Z tohto dôvodu sa javil vodný extrakt z listov ako najhodnotnejší pri viacerých metódach (FRAP, ORAC, ABTS, DPPH). Pri stanovovaní celkových flavonoidov bolo dosiahnutá najvyššia hodnota pre metanolový extrakt pripravený z listov (25 mg·g<sup>-1</sup>). Pri určovaní chelatačných schopností už vodné extrakty nepatrili k najlepším, práve naopak, schopnosť klesala v poradí etylacetát > MeOH > voda a platilo to pre kvety i listy. V tejto štúdií bola kyselina cichorová určená ako majoritná zložka kvetov (4,2 mg·g<sup>-1</sup>) i listov (4,9 mg·g<sup>-1</sup>). Medzi ďalšie identifikované látky patrili napríklad kys. mesocichorová, kys. kaftarová a z flavonoidov – rutín.

Kyselina cichorová, ako bolo spomenuté už vyššie, je majoritnou zložkou v *E. purpurea* (0,49 % hmot.), čo je niekoľko násobne vyššie v porovnaní s množstvom, ktoré sa vyskytujú v koreňoch druhov *E. pallida* (0,105 % hmot.) a *E. angustifolia* (0,04 % hmot.). [40] Pri stanovovaní antioxidačnej aktivity kyseliny cichorovej preukázali Thygesen a kol. [41], že listy s vyšším množstvom kyseliny cichorovej (41,3 mg·g<sup>-1</sup>) sú účinnejšie ako koreň, či stonka. Taktiež porovnávali antioxidačnú aktivitu kyseliny cichorovej s kyselinou rozmarínovou (dobře charakterizovaný antioxidant) a obe kyseliny mali podobné účinky.

V práci Güneş a kol. [42] skúmali antioxidačnú aktivitu a obsah fenolických látok vybraných druhov z čeľade *Asteraceae*. *E. purpurea* sa preukázala byť jednou z najbohatších na prítomnosť niektorých antioxidantov, enzýmov a fenolických látok. I v ďalších štúdiách bola určená vysoká antioxidačná aktivita extraktov pripravených z *E. purpurey* a vysoký obsah fenolických látok. [43, 44] Pellati a kol. [13] vo svojej práci určili *E. purpureu* taktiež ako najbohatšiu na celkové fenolické látky, čo sa prejavilo i v efektívite potlačania voľných radikálov (použitá metóda DPPH).

K ďalším látkam, ktoré boli identifikované v *E. purpurea* a prejavili antioxidačnú aktivitu, patrili kyselina gallová, kyselina chlorogénová a vanilín.[45]

Tabuľka 3 Prehľad metód použitých na stanovenie antioxidačnej aktivity extraktov *E. purpurea*

Vzorky	Metóda	Rozpúšťadlo	Zlúčeniny	R
Nadzemné časti <i>E. purpurea</i> + tablety, sirup	DPPH; supoxidácia $\beta$ -karoténu CBI; LPI; TBARS; RP; TPC; TFC	80% etanol; voda	-	[35]
Kvety <i>E. purpurea</i>	TPC, DPPH; FRP;	50% etanol	Kys. kaftárová; kys. chlorogénna; echinakozyd; kys. cichorová; cinarin	[36]
Kvety, listy <i>E. purpurea</i> a <i>E. pallida</i>	DPPH; ABTS; TPC; RP	Metanol; etylacetát	Kys. cichorová, kys. chlorogénová, quercetin, kys. ferulová, rutín, kys. kávová, kys. gallová, kys. 4-hydroxybenzoová	[38]
Listy, kvety <i>E. purpurea</i>	TPC; TFC; DPPH; ABTS; FRAP; CUPRAC; FB	Etylacetát; metanol, voda	Kys. kaftarová; kys. chlorogénová; kys. cichorová; rutin; kaempferol; kvercetin, kys. kávová;	[41]
Korene <i>E. purpurea</i> , <i>E. pallida</i> , <i>E. angustifolia</i>	ABTS, DPPH, RP, CUPRAC	Metanol, chloroform	Kys. cichorová	[40]
Listy, stonka, koreň, <i>E. purpurea</i>	TPC; DPPH	70% metanol	Kys. cichorová; alkylamidy	[39]
Korene <i>E. purpurea</i> , <i>E. pallida</i> , <i>E. angustifolia</i>	DPPH	70% methanol	Kys. kaftárová, kys. chlorogenová, kys. kávová, cynarin, kys.cichorová	[13]
Listy <i>E. purpurea</i>	DPPH, ABTS, FRAP, TPC, TFC	80% metanol	Kys. kávová, kys. neochlorogenová, kys. cumarová, kys. ferulová, kvarcetin	[42]

R - referencie

## 2.2.6 Antimikrobiálne účinky

### 2.2.6.1 Antimikrobiálne látky

Prírodné antimikrobiálne látky boli identifikované a izolované zo živočíšnych, rastlinných aj mikrobiálnych zdrojov. Rastliny sú zdrojom obrovskej škály látok s antimikrobiálnymi účinkami a mnohé z nich sa používajú už po stáročia. [46] Tieto prírodné zlúčeniny sú sekundárnymi metabolitmi s dôležitou úlohou v biochémií a fyziológii rastlín a podieľajú sa aj na ochrane rastliny pred mikroorganizmy. Ich primárnym účelom je inhibícia rastu a rozmnožovania mikroorganizmov alebo ich priama likvidácia. [46]

Absolútny a jednotný mechanizmus účinku antimikrobiálnych látok nie je presne definovaný, pretože rozdiely v zložení a v chemických štruktúrach zlúčenín sú veľké. V podstate mechanizmy mnohých z nich sú záhadou a predpokladá sa, že sa jedná o viaceré zásahy do bunky. [46]

Antimikrobiálne látky sa využívajú v potravinárstve na zníženie strát potravín pôsobením mikroorganizmov a na zvýšenie potravinovej bezpečnosti a kvality. Využitie si našli i v kozmetike, kde sa pridávajú do rôznych kozmetických prípravkov, z dôvodu zníženia alebo úplného odstránenia syntetických konzervačných látok. Uplatnenie nachádzajú aj v medicíne, pri boji s antibiotickou rezistenciou. Antimikrobiálne látky by mohli čiastočne alebo plne nahradiť antibiotiká. [46]

### 2.2.6.2 Antimikrobiálne účinky *Echinacey purpurey*

*Echinacea purpurea* sa využíva pri ochorení horných dýchacích ciest, ktoré vzniká v dôsledku vírusovej infekcie. V štúdií Sharma a kol. [47] sa zamerali predovšetkým na respiračné baktérie a patogény ako napr. *Streptococcus pyogenes*, *Hemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis* a *Candida albicans*. Bol skúmaný komerčný prípravok obsahujúci výťažok z *Echinacey* a jeho antimikrobiálne schopnosti. Tri z patogénov, *S. pyogenes*, *H. influenzae* a *L. pneumophila*, boli veľmi citlivé a ľahko inaktivované, avšak *C. albicans*, s viacerými ďalšími patogénmi, sa prejavila ako relatívne rezistentná.

Antimikrobiálnu aktivitu študovali vo svojej práci Mohamed a kol. [41] proti 21 kmeňom zahrňujúcim grampozitívne, gramnegatívne, aeróbne i fakultatívne anaeróbne mikroorganizmy. Na skúmanie aktivity sa využila mikrodilučná metóda bujónom. Zistili, že vyššiu antimikrobiálnu aktivitu voči testovaným mikroorganizmom vykazovali metanolové extrakty, čo naznačuje vyššiu efektivitu extrakcie bioaktívnych látok metanolom. Účinnosť pripísali vysokému obsahu fenolických látok. Hodnoty MIC (minimálna inhibičná koncentrácia) a MBC (minimálna bakteriálna koncentrácia) sa pohybovali v koncentráciách od 62,5 do 500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Ako najcitlivejším mikroorganizmom na extrakty sa javil *Enterococcus faecalis*. Preto na základe týchto výsledkov určili, že extrakty pripravené z listov a kvetov *E. purpurey*, môžu byť dobrými kandidátmi na liečbu infekcií spôsobených *E. faecalis*.

Metanolový extrakt bol použitý i v štúdií Hassana a kol. [48] a bolo vybraných 6 mikroorganizmov – *Aspergillus oryzae*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Alternaia solani*, *Escherichia coli* a *Streptococcus faecalis*. Zároveň bolo skúmané množstvo

extraktu (30, 50, 100 mg·l<sup>-1</sup>) a ukázalo sa, že proti *C. albicans*, *A. solani* a *A. oryzae* pri najnižšej koncentrácii extrakt nevykazoval žiadne antimikrobiálne účinky. Pri koncentrácii 100 mg·l<sup>-1</sup> inhibičné zóny u *E. coli* a *Saccharomyces cerevisiae* boli najvýraznejšie (12 respektíve 15 mm). U *S. faecalis* sa vytvorila 10 mm inhibičná zóna a u *A. solani* 11 mm.

V Práci Stanisavljević a kol. [49] boli skúmané etanolové extrakty proti 7 mikroorganizmom a jedinou výnimkou, pri ktorej nebol pozorovaný rast inhibičných zón, bol *Aspergillus niger*. Naproti tomu, u *C. albicans* (21 mm) a *S. cerevisiae* (25,7 mm) bola preukázaná značná inhibícia rastu. Dokonca sa prejavila vyššia citlivosť na extrakty, ako na testované antibiotiká.

Aj v ďalších štúdiách bola potvrdená antimikrobiálna aktivita extraktov obsahujúcich *Echinaceu* voči rôznym mikroorganizmom. V štúdií Coss a kol. [50] sa prejavila aktivita voči *E. coli*, a *Staphylococcus aureus*, avšak *Enterococcus hirae* bol rezistentný voči pripraveným extraktom. Extrakty *Echinacey* vykazujú inhibičný účinok aj na *Bacillus subtilis*. [51] *Echinacea pupurea* patrila medzi 50 rastlín skúmaných na antimikrobiálnu aktivitu. Inhibičné zóny v okolí výťažku sa vytvorili v prípade *C. albicans* (2,3 mm), *E. coli* (4,2 mm), *P. vulgaris* (5,3 mm) a *K. pneumonia* (8,5 mm). [52]

Stručný prehľad niektorých mikroorganizmov a metód, ktoré boli použité na zistenie účinku sa nachádza v Tabuľke 4.

Tabuľka 4 Prehľad mikroorganizmov a metód

	Mikroorganizmus	Časť rastliny	Metóda	I R
<b>Baktérie</b>	<i>Enterococcus durans</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
	<i>Enterococcus faecium</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
	<i>Sarcina lutea</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
		-	Jamková difúzna	± [51]
		Nadzemné časti	Jamková difúzna	+ [49]
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
	<i>Staphylococcus alpha haemolyticus</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
		Celá rastlina	Disková difúzna	- [52]
	<i>Escherichia coli</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
		-	Jamková difúzna	± [51]
		Nadzemné časti	Jamková difúzna	+ [49]
		Listy	Jamková difúzna	+ [48]
		Celá rastlina	Disková difúzna	+ [52]
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
	<i>Proteus mirabilis</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]

Tabuľka 4 Prehľad mikroorganizmov a metód - pokračovanie

	<b>Mikroorganizmus</b>	<b>Časť rastliny</b>	<b>Metóda</b>	<b>I R</b>
<b>Baktérie</b>	<i>Proteus vulgaris</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
		Celá rastlina	Disková difúzna	+ [52]
	<i>Salmonella enteritidis</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
		<i>Salmonella kentucky</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
		Celá rastlina	Disková difúzna	- [52]
	<i>Serratia marcescens</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kvety, listy	Mikrodilúcia bujonu	+ [41]
		Nadzemné časti	Jamková difúzna	+ [49]
	<i>Bacillus subtilis</i>	-	Jamková difúzna	+ [51]
		Nadzemné časti	Jamková difúzna	+ [49]
	<i>Streptococcus faecalis</i>	Listy	Jamková difúzna	+ [48]
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Celá rastlina	Disková difúzna	+ [52]
<i>Corynebacterium xerosis</i>	Celá rastlina	Disková difúzna	- [52]	
<b>Plesne</b>	<i>Aspergillus niger</i>	Nadzemné časti	Jamková difúzna	- [49]
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Listy	Jamková difúzna	± [48]
	<i>Alternaria solani</i>	Listy	Jamková difúzna	± [48]
<b>Kvasinky</b>	<i>Candida albicans</i>	-	Jamková difúzna	± [51]
		Nadzemné časti	Jamková difúzna	+ [49]
		Listy	Jamková difúzna	± [48]
	<i>S. cerevisiae</i>	Celá rastlina	Disková difúzna	+ [52]
		-	Jamková difúzna	± [51]
		Nadzemné časti	Jamková difúzna	+ [49]
	Listy	Jamková difúzna	+ [48]	

R – referencie; I – inhibícia; + (pozitívna), - (negatívna), ± (zaznamenaná aj negatívna aj pozitívna)

### 2.3 Možnosti získavanie rastlinných extraktov – extrakčné metódy

Rastlinné extrakty sú bohatým zdrojom bioaktívnych látok a svoje miesto si našli v potravinárskom, farmaceutickom a kozmetickom priemysle. [53] Extrakčné techniky, ktoré sa využívajú na získanie bioaktívnych látok sa rozdeľujú na tradičné (konvenčné), a moderné (nekonvenčné). Tradičné využívajú jednoduché a nenáročné zariadenia. Zámerom vývoja moderných techník je odstránenie obmedzení konvenčných techník, ako je dĺžka extrakcie, potreba vysoko čistého rozpúšťadla a odparovanie jeho veľkého množstva, termický rozklad termolabilných zlúčenín a nízka extrakčná selektivita. Niektoré z nich sa považujú za „zelené techniky“. [54]

Extrakčné metódy bývajú ovplyvnené premennými (parametrami, faktormi), ktoré priamo pôsobia na efektívnosť procesu. V klasickej extrakcii sú to predovšetkým rozpúšťadla, čas extrakcie, teplota, pomer látky ku činidlu a veľkosť častíc, resp. stupeň rozomletia. [25]

### **2.3.1 Konvenčné extrakčné metódy**

V konvenčných extrakčných technikách hrá dôležitú úlohu výber rozpúšťadla. Faktory, ktoré ovplyvňujú výber rozpúšťadla alebo by sa mali brať do úvahy, sú polarita získavanej zlúčeniny, použitie pomocného rozpúšťadla, bezpečnosť životného prostredia, toxicita pre človeka a finančné náklady. Medzi klasické extrakčné techniky patrí Soxhletová extrakcia, macerácia a hydrodestilácia. [54]

#### ***Soxhletova extrakcia***

Soxhletova extrakcia je dlho využívanou, dobre zavedenou, štandardnou metódou, ktorá bola navrhnutá predovšetkým na extrakciu lipidov. [54] V súčasnosti má široké použitie i pre ďalšie extrakcie ako napr. extrakcie bioaktívnych zlúčenín z rôznych prírodných zdrojov. [53] Jedinou výnimkou je obmedzenie pri aplikácii na extrakciu termolabilných zlúčenín. [54]

Pri extrakcii sa využíva Soxhletova aparátúra, v ktorej dochádza k izolácii analytu z tuhej vzorky pomocou vhodného rozpúšťadla. Rozpúšťadlo, ktoré neustále kondenzuje, sa vracia späť do varnej banky. Tento proces sa opakuje, kým nie je dosiahnutá úplná extrakcia. Najbežnejšie používaným rozpúšťadlom olejov je hexan, avšak patrí k nebezpečným látkam znečisťujúcim životné prostredie. Z dôvodu ochrany životného prostredia, zdravia a bezpečnosti sa zaviedlo používanie alternatívnych rozpúšťadiel, ako izopropanol, etanol, uhľovodíky, či voda. Je samozrejmé, že tieto rozpúšťadlá nie sú efektívne ako hexán, čo vedie k menšiemu výťažku a tomu spojenými nákladmi. Výhodami tejto osvedčenej techniky je široká priemyselná aplikácia, lepšia reprodukovateľnosť a účinnosť, avšak veľkými nevýhodami sú čas a rozpúšťadlá. [54]

#### ***Macerácia***

Macerácia je pomerne populárny a lacný spôsob zisku éterických olejov a bioaktívnych látok. Pozostáva z niekoľkých krokov. Rozomletím na malé častice sa zväčší plocha rastlinného materiálu a to umožní správne zmiešanie s vhodným rozpúšťadlom. V prípade, že sa v procese macerácie extrakt pretrepáva, tak to napomáha k zvýšeniu difúzie a k odstráneniu koncentrovaného roztoku z povrchu vzorky. Finálny extrakt sa získa oddelením od výliskov a nečistôt filtráciou. [53] Okrem filtrácie, ako separačného procesu, sa ešte používa dekantácia alebo čírenie. Avšak táto jednoduchá metóda vyžaduje veľké objemy rozpúšťadla a je časovo náročná, čo je veľkou nevýhodou. [55]

#### ***Hydrodestilácia***

Táto tradičná metóda extrakcie látok z rastlinných matric nevyužíva organické rozpúšťadlá. Ako rozpustné činidlo sa používa horúca voda, prípadne sa do vzorky vstrekuje priamo para. Existujú tri typy hydrodestilácie: vodná destilácia, vodná a parná destilácia a priama parná destilácia. Rastlinný materiál sa namočí na nejaký čas do vody a potom sa zmes zahreje. Následne prebehne kondenzácia nepriamym ochladením vodou v chladiči a vzniknutá zmes oleja a vody sa oddelia v zbernej nádobe. [54]

Pri použití vysokej extrakčnej teploty môže dôjsť k strate niektorých prchavých látok, takže sa neodporúča pre extrakciu termolabilných látok. Využíva sa na extrakciu bioaktívnych zlúčenín a éterických olejov z rastlín. [54]

### **2.3.2 Nekonvenčné metódy**

Nekonvenčné extrakčné techniky sa vyvíjajú a zavádzajú a hlavne kvôli odstráneniu obmedzení konvenčných techník, ako je dĺžka extrakcie, potreba vysoko čistého rozpúšťadla a odparovanie jeho veľkého množstva, termický rozklad termolabilných zlúčenín, zvýšila kvalita extraktov a nízka extrakčná selektivita. Niektoré z nich sa považujú za „zelené techniky“. [53]

#### ***Ultrazvuková extrakcia***

Princípom tejto metódy je využitie kavitačného účinku ultrazvuku, teda zvukovej vlny presahujúcej ľudské vnímanie, v rozmedzí 20 kHz až 100 MHz. Kavitácia je jav, pri ktorom sa vytvárajú bubliny v kvapaline, naberajú na objeme až prasknú, explodujú a vzniknú tak lokálne horúce miesta s teplotou až 5000 K a tlakom 1000 atm. Tieto podmienky a energia spôsobujú deštrukciu rastlinných buniek a uľahčuje sa tak extrakcia organických a anorganických zlúčenín z rastlinných matric. [53, 54] Mechanizmus extrakcie zahŕňa prekonanie selektívne priepustnej bunkovej membrány, narušenie stien bunky a uvoľnenie obsahu bunky, intracelulárnych látok do rozpúšťadla. [54]

Pôsobenie ultrazvuku riadi veľa faktorov vrátane frekvencie, tlaku, teploty a času pôsobenia. Je potrebné, aby bola regulovaná teplota extrakcie, kvôli generovanému teplu ultrazvukom a pri nadmerne dlhom pôsobení môže dôjsť k poškodeniu extraktov. Pre priechod ultrazvukových vln a zabráneniu tak stojatým vlnám, či formovaniu voľných pevných miest sa používa miešanie alebo pretrepávanie. [54] Ultrazvuková extrakcia ponúka veľa výhod, medzi tie hlavné patrí zníženie doby extrakcie, energie a použitia rozpúšťadla, taktiež je to lacná, jednoduchá metóda, ktorou sa dosahujú väčšie výťažky. [53]

#### ***Enzýmovo asistovaná extrakcia***

Použitie enzýmov v procese sa považuje za efektívny spôsob uvoľnenie látok a za ekologickú technológiu vďaka využitiu vody ako extrakčného rozpúšťadla. Pridanie špecifických enzýmov počas extrakcie napomáha k regenerácii bunkovej steny po rozbití a hydrolýze polysacharidov. Faktory ovplyvňujúce extrakciu sú zloženie a koncentrácia enzýmov, čas hydrolýzy a veľkosť častíc materiálu a jeho pomer k vode. Okrem toho obsah vlhkosti materiálu je tiež zásadný faktor. [54]

Sú známe dva postupy extrakcie využívajúce enzýmy: enzýmovo asistovaná vodná extrakcia (EAAE) a enzýmovo asistované lisovanie za studena (EACP). [54]

#### ***Superkritická extrakcia***

Superkritická extrakcia (SFE) umožňuje extrakciu v superkritickej tekutine ako rozpúšťadla, ktoré má vlastnosti plynov a kvapalín. Látka sa nachádza v tzv. superkritickom stave, ktorý sa dosiahne v prípade zvýšenia teploty a tlaku látky nad kritické hodnoty. Vďaka dosiahnutiu tohto stavu začne rásť hustota a tým aj schopnosť rozpúšťať látky. [53]



Ako hlavné rozpúšťadlo pre SFE sa používa oxid uhličitý, ktorý dosiahne superkritický stav pri teplote 304 K a tlaku 7,3 MPa. Výhodou je aj, že je nehorľavý a netoxický a je vhodný na extrakciu nepolárnych zlúčenín. V prípade extrakcie polárnych látok je potrebné k CO<sub>2</sub> pridať značné množstvo polárneho modifikátora (etanol, metanol, acetón). [53] Metóda má mimoriadny význam hlavne kvôli čistote poskytovaných extraktov. [56]

### ***Mikrovlňná extrakcia***

Mikrovlňná extrakcia (MAE) je založená ohreve rozpúšťadla pôsobením mikrovln vo frekvenčnom rozsahu od 0,3 do 300 GHz. Na absorpciu mikrovlňného žiarenia je potrebná prítomnosť polárnej látky (napr. voda), s ktorou interagujú v biomateriáloch a vytvárajú tak teplo. Materiál sa ohreje na hĺbku prieniku mikrovln. [53][54]

Pri tejto metóde sa nevzniká veľmi vysoká teplota, preto je vhodná na extrakciu termolabilných látok. [54] Vyššie výťažky je možné dosiahnuť napr. zvlhčením vzorky a pri procese tak dochádza k rozšíreniu a pretrhnutiu bunkových stien matrice, s následným uvoľnením do rozpúšťadla. Účinnosť MAE závisí len od matrice, ale predovšetkým od rozpúšťadla. Výber rozpúšťadla je daný rozpustnosťou sledovaných extraktov, interakciou s matricou a schopnosťou absorbovať mikrovlny. K vyhovujúcim rozpúšťadlám patrí etanol, voda a metanol. [53]

V prípade nepolárnych alebo prchavých zlúčenín sa efektivita MAE znižuje až je veľmi slabá. Avšak metóda ponúka veľa výhod ako kratší čas, lepší výťažok a nižšie objemy rozpúšťadla. [53]

### ***Vysokotlaková extrakcia rozpúšťadlom (Tlakom urýchlená kvapalinová extrakcia)***

Proces vysokotlakovej extrakcie rozpúšťadlom (PFE, ASE) prebieha pri zvýšených teplotách, zvyčajne v rozmedzí 50 až 200 °C a pri tlakoch 10 - 15 MPa. [54] Vďaka tejto kombinácii vysokého tlaku a teploty sa uľahčuje a urýchľuje doba extrakcie, a umožňuje použitie malého množstva rozpúšťadla. [54] A dochádza k uľahčeniu desorpcie a rozpustnosti molekúl. [55]

Zvyčajne sa využívajú organické rozpúšťadlá, ale je možné aj použitie vody. V tom prípade sa táto metóda označuje ako extrakcia stlačenou kvapalnou horúcou vodou (PHWE). Hodnoty teploty a tlaku sa v takomto prípade sa držia v rozmedzí 100°C a 0,1 MPa a pod hodnotami kritického stavu (374°C; 22,1 MPa). [56] Okolo 200°C dôjde k zmene dielektrických vlastností vody, vďaka čomu pôsobí ako štandardné organické rozpúšťadlo a zlepši sa tak kapacita extrakcie. Veľkým pozitívom metódy je čistota extraktov. Z nevýhod sú to obmedzenia ako nízka selektivita analytov počas extrakcie, prítomnosť interferencií počas procesu, vysoká úroveň zriedenia a náklady spojené s prístrojom. [55]

### ***Extrakcia využívajúca pulzné elektrické pole***

Metóda extrakcie využívajúcej pulzné elektrické pole (PEF) sa používa na materiál, ktorý je umiestnený medzi dvoma elektródami. A prebieha pri teplote okolia alebo mierne vyššej teplote po dobu pôsobenia kratšiu ako 1 s (nanosekundy alebo milisekundy). Zariadenie vytvára impulz, ktorého amplitúda sa pohybuje od 100-300 V/cm do 20-80 kV/cm. Elektrické pole

poškodzuje bunkové membrány rastlín, čo má za príčinu vzniku dočasných alebo trvalých pórov – „elektroporácia“. [56]

### 2.3.3 Získavanie rastlinných extraktov – aplikácie na *Echinaceu*

Tsai a kol. [36] vo svojej práci optimalizovali podmienky extrakcie na kvalitu extraktov z kvetov *E. purpurey*. Faktory, ktoré hodnotili, boli teplota (25 – 95°C, ) a koncentrácia etanolu (25 – 95 %, ). Na základe výsledkov zhodnotili, že koncentrácie etanolu významne ovplyvnili výťažok extrakcie (pokles výťažkov z 39,8 % (vodný extrakt) na 3,3 %, pri použití 95% etanolu), obsah celkových fenolických látok, ale i prítomnosť bioaktívnych látok. Efektivitu koncentrácie etanolu zoradili v zostupnom poradí 50>75≅25>0>95. Použité extrakčné teploty taktiež ovplyvňovali extrakty. So zvyšujúcou sa teplotou sa zvyšoval výťažok a obsah fenolických látok, ale po dosiahnutí teploty 65°C došlo k poklesu množstva fenolických látok. Ako optimálne podmienky určili 50% roztok etanolu a teplotu 65°C. [36]

Pri štúdiu rozdielnych extrakčných techník boli v práci Lepojević a kol. [25] skúmané tri metódy – konvenčná extrakcia rozpúšťadlom (SE), vysokotlaková extrakcia (LCDE) a extrakcia superkritickým oxidom (SFE). Extrahovalo sa z nadzemných častí *E. purpurey* v pomere 1:5 a každou metódou sa skúmali rozdielne premenné. K parametrom skúmaným pri macerácii patrili, ako v predchádzajúcom prípade, teplota (40°C, 55°C, 70°C) a koncentrácia etanolu (30%, 50%, 70%). V rámci tejto práce bolo potvrdené, že po dosiahnutí optimálnej hodnoty koncentrácie etanolu a teploty, dochádza ku klesaniu výťažku extrahovaných flavonoidov, resp. fenolických látok. Predpovedali podmienky, pri ktorých by sa dosiahli maximálne výsledky, pre celkové fenolické látky (52,76°C; 56,45% etanol), pre flavonoidy (55,59°C; 46,46% etanolu) a pre antioxidačnú aktivitu extraktu (44,95°C; 42,6 %). [25] Pri využití SFE, ako zelenej metódy, na extrakciu kyseliny kaftarovej a cichorovej boli výsledky porovnateľné s efektivitou tradičnej metódy, dokonca sa vyextrahovalo vyššieho počtu kyselín metódou SFE s využitím iba 10% etanolu. [57]

Vo svojej práci Stanisavljević a kol. [49] skúmali použitie Soxhletovej extrakcie a ultrazvukovej extrakcie s vplyvom na antioxidačnú a na antimikrobiálnu aktivitu extraktov. Pri stanovovaní antioxidačnej aktivity vykazovali vyššie hodnoty extrakty, ktoré boli pripravené Soxhletovou extrakciou. Touto metódou pripravený extrakt obsahoval o 29 % viac fenolických zlúčenín a o 20 % viac flavonoidov. Ultrazvuková extrakcia bola menej efektívna ako klasická metóda, pretože mohlo dôjsť k redukcii látok v dôsledku degradácie počas sonifikácie. Pre maximálny výťažok látok oboma metódami uviedli optimálny čas 40 minút. Pri stanovovaní antimikrobiálnej aktivity sa vytvárali inhibičné zóny v oboch prípadoch, ale extrakt Soxhletovej extrakcie dosahoval väčšie priemery.[49] V rámci porovnávania rozdielnych extrakčných činidiel (voda, n-hexán, dichlormetán, etylacetát, acetón a metanol) s vplyvom na antimikrobiálnu aktivitu došli v práci Coelho a kol. [58] k záveru, že najlepšie výsledky dosahovali dichlormetánové, etylacetátové a acetónové extrakty.

Vo svojej práci Hudai a kol. [18] porovnávali 3 metódy extrakcie a to extrakciu Soxhletom, ultrazvukovú extrakciu a mikrovlnnú extrakciu (MAE), pričom extrahovanou zložkou boli celkové lipofilné látky, alkylamidy a sesquiterpény. Ako extrakčné činidlá boli použité chloroform, n-hexán a metanol (70%), ktorý bol použitý pri ultrazvukovej extrakcii i pri MAE.

Pomocou MAE a ultrazvukovej extrakcie stanovili použitie metanolu ako najlepšieho rozpúšťadla, pretože boli poskytnuté vyššie výtťažky alkylamidov i celkovej lipofilnej frakcie. Súviselo to najmä s polaritou rozpúšťadla a zároveň mikrovlnným efektom, ktorý zvyšoval účinnosť rozpúšťadla. [18] Aj v prípade práce Pellati a kol. [13] určili 70% metanol ako najúčinnšie rozpúšťadlo.

V práci Glavača a kol. [19] bola popísaná optimalizácia extrakčného postupu pre stanovenie polysacharidov z kvetov a listov. Ako izolačné činidlá boli použité petroléter a metanol na odstránenie farebných látok. Následná extrakcia prebehla za použitia hydroxidu sodného ( $c = 2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) ako extrakčného činidla v kombinácií s ultrazvukom. [19] Pre extrakciu derivátov kyseliny kávovej z koreňov *E. purpurey* optimalizovali parametre Wu a kol. [59] Pri použití 60% etanolu a 60°C teploty sa dosiahli výsledky 53,4 mg·g<sup>-1</sup> fenolov; 33,1 mg·g<sup>-1</sup> flavonoidov; 56,6 mg·g<sup>-1</sup> polysacharidov; 4,1 mg·g<sup>-1</sup> kyseliny kaftarovej; 3,6 mg·g<sup>-1</sup> kyseliny chlorogénnej a 28,8 mg/g kyseliny cichorovej. Cieľom štúdie Yildiz a kol. [60] bolo optimalizovať metódy (Soxhletova extrakcia, MAE, SFE, SCW) a ich podmienky na získanie celkových flavonoidov. Pre SFE predstavovali optimum podmienky 30 MPa, 80°C, 13% etanol a získalo sa 0,472 mg·g<sup>-1</sup> (vyjadrené ako ekvivalent rutínu) Pre získanie 0,202 mg·g<sup>-1</sup> (vyjadrené ako ekvivalent rutínu) boli potrebné v MAE podmienky 60°C, 10 min a 300 W.

## 2.4 Metódy stanovenia antioxidačnej aktivity

Stanovenie antioxidantov zahŕňa veľa metód, ktorými sa hodnotí celková antioxidačná aktivita, ale i individuálna identifikácia a kvantifikácia antioxidačných látok. Kvantifikácia antioxidantov prebieha pomocou jednej metódy, prípadne viacerými technikami naraz, pričom sa využívajú metódy in vitro, in vivo, elektrochemické, chemiluminiscenčné, elektrónová spinová rezonancia, chromatografia, kapilárna elektroforéza, nukleárna magnetická rezonancia, metódy, hmotnostná spektrometria alebo blízka infračervená spektrometria. [30]

Medzi in vitro metódy patrí DPPH, TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Zahŕňujú reakcie ROS s činidlami a vzniknutý komplex je následne detegovaný UV-VIS spektrometriou pri rôznych vlnových dĺžkach, poprípade sa tiež využíva fluorometrická detekcia. [30]

### 2.4.1 DPPH test

DPPH (2,2-difenyl-β-pikrylhydrazyl) je nebiologický, voľný radikál, ktorý patrí k jedným z mála stabilných, komerčne dostupných radikálov organického dusíka. Stanovenie spočíva v tom, že radikál interaguje s antioxidačnou zlúčeninou, pričom dôjde k zníženiu absorpcie. Koniec reakcie sa vyznačuje vyblednutím farby roztoku a detekcia sa sleduje spektrofotometricky pri 517 nm. Použitie metódy DPPH je technicky jednoduché. [29, 33]

### 2.4.2 Metóda TEAC

Táto metóda využíva intenzívne sfarbených kationových radikálov ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis(3-etylneozthiazolin-6-sulfonová kyselina)). Keďže radikál má intenzívne modré sfarbenie, po reakcii s antioxidačnou zlúčeninou dôjde k zníženiu prítomnosti radikálu, a teda

dôjde k poklesu sfarbenia, ktoré sa meria pri charakteristických vlnových dĺžkach (734 nm). Výsledky sú vyjadrené ako ekvivalent štandardu Trolox. [61]

Jestvujú dva spôsoby prevedenia tejto reakcie a to buď vzorka priamo reaguje už so vzniknutým, predpripraveným radikálovým kationom, alebo je pridávaná do zmesi pred sformovaním radikál kationu a zachytáva počiatočnú oxidáciu a zabraňuje tým jeho produkcií. Preferuje sa stanovovanie v presnom časovom úseku, no môžu existovať odlišné výsledky pre tú istú zlúčeninu (napr. GSH) v závislosti na použítom oxidačnom činidle. [61]

### 2.4.3 FRAP

Pri metóde FRAP sa využíva ako oxidant železitá soľ ( $\text{Fe}^{3+}$ -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazín) ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ)). Dá sa povedať, že nie je veľký rozdiel medzi metódami FRAP a TEAC, pretože redoxný potenciál soli je porovnateľný s potenciálom radikálu  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Rozdielom v podmienkach, pri ktorých sa testy vykonávajú, je pH. FRAP prebieha za kyslých podmienok (pH=3,6). Jednotka FRAP je definovaná ako redukcia 1 molu  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$ . Zmena absorpcia sa meria už po 4 minútach pri 593 nm. [33]

Touto metódou nie je možné testovať antioxidačnú aktivitu karotenoidov a tiolov. Najmä z dôvodu neschopnosti účinne oxidovať biotiole sa nedá efektívne využiť pri hodnotení celkovej antioxidačnej aktivity. Taktiež u polyfenolov, ako napr. kyselina kávová, trieslová, ferulová, kvercerín, nie je schopná zmerať antioxidačnú aktivitu v protokolovanom čase (4 min), pretože vykazujú pomalé kinetické správanie alebo v kyslom prostredí nie sú disociované a preto môžu byť výsledky celkovej antioxidačnej aktivity nižšie ako v skutočnosti sú. [61]

### 2.4.4 ORAC

Fluorescein, syntetická neproteinová sonda, reaguje s kyslíkovými radikálmi vyskytujúcimi sa vo vzorke a postupne klesá intenzita fluorescencie úmerne so znižovaním množstva prítomného fluoresceinu. Meria sa teda schopnosť látky zastaviť alebo spomaliť radikálovú reakciu. [33]

Pred pridaním roztoku AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropán)dihydrochlorid) najprv prebehne inkubácia pri konštantne udržiavanej teplote (37°C). Roztok AAPH sa používa ako iniciátor na generovanie radikálov. Fluorescencia sa meria každú minútu po dobu 35 minút pri laboratórnych podmienkach. K vyhodnoteniu získaných dát sa používa výpočet plochy fluorescenčného signálu pod krivkou, poprípade porovnanie krivky vzorky a krivky štandardu, najčastejšie Troloxu. ORAC je vhodná metóda pre analýzu lipofilných vzoriek. [33]

Je potrebné, aby sa kontrolovali 2 parametre – teplota a koncentrácia kyslíku, na ktoré je táto metóda veľmi citlivá. V prípade, že nie je dosiahnutá požadovaná teplota na tepelný rozklad azozlúčeniny, reakcie sú pomalé a neúplné. I nedostatočne rozpustený kyslík môže viesť k predĺženiu reakcií a k nereprodukateľným výsledkom. [29]

## 2.4.5 Folin-Ciocalteuová metóda

Pôvodný účel Folin-Ciocalteuového činidla bola analýza proteínov. V súčasnosti je všeobecne známy ako test na celkové fenolické látky. [33] Podstatou stanovenia antioxidačnej aktivity je oxidácia fenolových zlúčenín v alkalickom roztoku, čím sa získa farebný produkt. Vychádza z Folin-Denisovej metódy. [61]

Výroba činidla začína varením zmesi wolfrámanu sodného ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), molybdenanu sodného ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej, 85% kyseliny fosforečnej a vody. Následne sa pridá síran lítny ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ) a získa svoje žlté sfarbenie. Keďže fenolové zlúčeniny reagujú s Folin-Ciocalteuovým činidlom iba v zásaditých podmienkach, pre úpravu pH sa pridáva do roztoku uhličitan sodný a získava sa typické modré sfarbenie. [33] Maximum absorbancie tohto produktu leží v rozmedzí 750 – 765 nm. [61]

Nie je presne definovaná chemická povaha a redoxný potenciál Folin-Ciocalteuova činidla. Je to silné oxidačné činidlo, ktoré môže nešpecificky oxidovať i veľké množstvo nefenolových látok. Za výhody tejto metódy sa dajú považovať rýchlosť, jednoduchosť, robustnosť a že nevyžaduje špecifické vybavenie. Avšak nevýhodou je, že redukčné činidlá ako je kyselina askorbová, kyselina citrónová alebo niektoré aminokyseliny môžu ovplyvňovať analýzu a tým navyšovať obsah fenolových zlúčenín. Bežne sa používa vo výskumných laboratóriách na testovanie rastlinných a potravinových extraktov. [61]

## 2.5 Metódy stanovenia antimikrobiálnej aktivity

### 2.5.1 Difúzne metódy

Difúzna metóda je štandardizovaná kvalitatívna technika využívaná v mnohých klinických mikrobiologických laboratóriách, ktorou sa testuje antimikrobiálna citlivosť. Spočíva v difúzii antimikrobiálnej látky do agaru s naočkovaným inokulum mikroorganizmu. V prípade inhibície rastu sa vytvoria tzv. inhibičné rastové zóny a meria sa veľkosť ich priemeru. Na základe porovnania výsledkov vyhodnocovania s normovanými tabuľkami sa potom kategorizujú mikroorganizmy ako citlivé, stredne citlivé alebo rezistentné. Avšak, keďže ide o inhibíciu mikrobiálneho rastu, táto metóda neumožňuje rozlíšenie bakteriocidných a bakteriostatických účinkov. [62]

Podľa spôsobu nanášania testovanej látky rozoznávame: jamkovú, diskovú, kvapkovú a komínkovú metódu. [62]

#### 2.5.1.1 Disková difúzna metóda

U diskovej difúznej metódy sú ukladané disky z filtračného papiera nasýtené skúmanou látkou v požadovanej koncentrácii na agar. Na stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) nie je tento postup vhodný, pretože sa nedá určiť obsah činidla, ktorý difundoval do agaru. [62]

Polarita zlúčenín, ich koncentrácia a molekulová hmotnosť priamo súvisia s priemerom zóny. Disková difúzna metóda je ideálna pre vysoko polárne zlúčeniny, u nepolárnych môže viesť k falošným výsledkom. Veľkosť zóny závisí od rastu buniek a od rýchlosti difúzie, pričom rôzne zlúčeniny budú difundovať rôznymi rýchlosťami. [63]

Napriek tomu poskytuje veľa výhod – je to jednoduchá metóda s nízkymi nákladmi a umožňuje študovať obrovské množstvo mikroorganizmov a antimikrobiálnych zlúčenín s ľahkou interpretáciou výsledkov.[62]

### **2.5.1.2 Difúzna jamková metóda**

Podobne ako pri diskovej metóde je u jamkovej najskôr celý povrch agaru zaočkovaný mikrobiálnym inokulom. Potom sa do agaru vyhlbia otvory s priemerom 6 až 8 mm pomocou sterilného korkového vrtáku (korkovrtom). Tieto jamky vytvárajú priestor pre nadávkovanie antimikrobiálneho činidla alebo roztoku extraktu v požadovanej koncentrácii. Inkubácia prebieha za vhodných podmienok v závislosti od testovaného mikroorganizmu. [62]

### **2.5.1.3 E-test**

Metóda antimikrobiálneho gradientu je kvantitatívnou modifikáciou diskovej difúznej metódy s kombináciou princípu dilučných metód. Pre diagnostiku sa využívajú prúžky na jednej strane s napusteným antimikrobiálnym činidlom so zvyšujúcim sa koncentračným gradientom. Na opačnej strane prúžku je vyznačená stupnica s hodnotami MIC. Ak je činidlo účinné voči naočkovanému mikroorganizmu vytvorí sa zóna inhibície rastu v tvare elipsy a hodnota MIC sa odčíta v mieste pretnutia s prúžkom. Tento postup môže byť značne nákladný. [62]

## **2.5.2 Dilučné metódy**

Jedná sa o kvantitatívne testy, ktoré slúžia k zistení hodnôt MIC, ktoré sú definované ako minimálna koncentrácie testovanej látky, schopné zastaviť rast mikroorganizmu. Dilučná metóda v bujóne má dve možnosti prevedenia a je jednou zo základných metód stanovovania antimikrobiálnej citlivosti. Môže sa jednať o makrodilučné stanovenie v skúmavkách alebo o použitie 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky. [62]

Výsledky získané z dilučnej metódy sa považujú za presnejšie ako výsledky z difúznej metódy. Nevýhodou je, že tepelne labilné extrakty na báze vody sú spoľahlivo sterilované iba membránovou filtráciou, takže môže dôjsť k ovplyvneniu aktivity a je nevhodná na štúdium vysoko nepolárnych zlúčenín a extraktov. [63]

Alternatívnou metódou je dilučná metóda v agare, kedy agar sa zmieša so vzorkou a naočkuje sa mikroorganizmom. Je oveľa zdĺhavejšia, predovšetkým pri práci s veľkým počtom vzoriek. [63]

## **2.6 Metódy stanovovania prchavých látok**

### **2.6.1 Mikroextrakcia tuhou fázou**

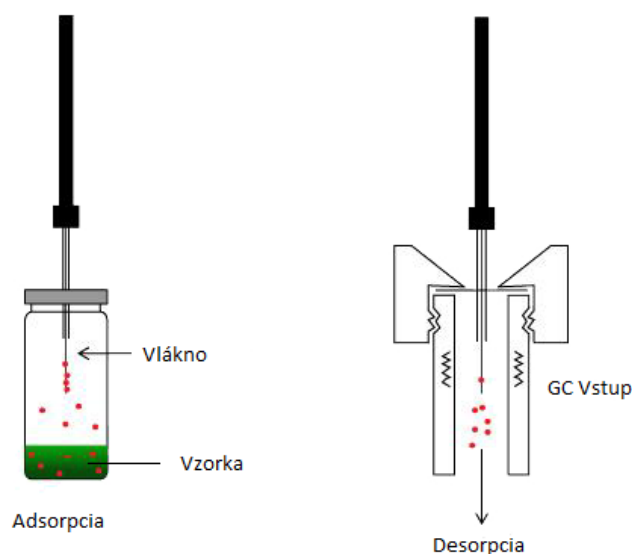
Pri mikroextrakcii tuhou fázou (SPME) nie je potrebné akokoľvek upravovať vzorku pred samotnou analýzou a je možné ju využiť na rôzne skupenstvá vzoriek – kvapalné i pevné. Túto techniku vyvinula Pawliszynova skupina v roku 1990 a bola prijatá ako rýchla, jednoduchá, zelená technika. Kombinuje niekoľko krokov v jednom ako odber vzoriek, extrakciu, koncentráciu, čistenie a zavedenie vzorky. Princípom metódy je, že po zahriatí vzorky vo vialke, dochádza k sorpcii látok na kremenné vlákno pokryté vrstvou polyméru (napr.

nepolárny polydimetylsiloxan (PDMS), semipolárny polydimetylsiloxandivinylbenzén (PDMS-DVB), polárny polyakrylát (PA), ...). [64]

Podľa polohy vlákna v extrakčnom priestore sa rozlišujú dva typy metód SPME:

- DI (priame extrakcia) – vlákno je úplne ponorené
- HS („hlavný priestor“) – vlákno sa zastaví nad matricou, extrakcia prebieha z priestoru nad vzorkou

Pri aplikácii DI-SPME je dôležitý krok predúpravy, pretože vlákna sú krehké a môže dôjsť k poškodeniu pri styku so vzorkou, ale vďaka priamemu kontaktu má technika vyššiu efektívnosť a je vhodnejšia pre semiprchavé zlúčeniny. V HS-SPME ovplyvňuje efektívnosť metódy množstvo vzorky a používa sa predovšetkým na analýzu prchavých látok. Aj v tejto metóde sa využíva úprava pred samotnou analýzou, kvôli zlepšeniu citlivosti (podpora prenosu analytov do plynnej fázy a zvýšenie ich množstva). [64]



Obrázok 7 Schematické zobrazenie mikroextrakcie tuhou fázou [65]

## 2.6.2 Plynová chromatografia

Plynová chromatografia je separačná technika, ktorá sa využíva na kvantitatívnu i kvalitatívnu analýzu prchavých a semiprchavých látok viaczložkových zmesí ako sú éterické oleje, uhl'ovodíky a rozpúšťadlá. Výhodami tejto techniky je jednoduchosť, citlivosť a účinnosť separácie jednotlivých zložiek zmesí. [66]

Princípom tejto metódy je separácia látok (v plynnej forme) medzi dve nemiešateľné fázy – mobilnú a stacionárnu. Transport látky kolónou je zaistený prútokom inertného plynu (mobilnej fázy). Látky sa sorbujú na stacionárnu fázu, ktorá sa nachádza v kolóne, podľa afinity a následne sa desorbujú s novo prichádzajúcim nosným plynom. [66, 67]

Ako detektory sa používajú plameňový ionizačný detektor (FID) alebo ECD (detektor elektrónového záchytu), ktoré majú vysokú citlivosť a dokážu detegovať látky v materiáloch prítomné i vo veľmi nízkych koncentráciách. [66] K ďalším častým spojeniam patrí metóda GC-MS. Toto spojenie sa začalo používať v 50. rokoch 20. storočia. Detekcia drog, vyšetovanie požiarov, analýza životného prostredia, vyšetovanie výbušnín, patria k príkladom

aplikácie GC-MS. [67] Vo všeobecnosti sa touto technikou analyzujú estery, mastné kyseliny, alkoholy, aldehydy, terpény a iné. [66]

V hmotnostnej spektrometrii (MS – Mass Spectrometry) dochádza k rozlíšeniu iónov podľa pomeru hmotnosti a náboja ( $m/z$ ). Medzi najbežnejšie používané typy MS patria kvadrupólový analyzátor (Q), iónová past' (IT) lebo analyzátor doby letu (TOF). [67]



## **3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ**

### **3.1 Laboratórne vybavenie**

#### **3.1.1 Prístroje a vybavenie**

- Analytické digitálne váhy (Helago, GR–202–EC, Taliansko)
- UV-VIS Spektrofotometer (Helios  $\gamma$ , Thermo Spectronic; Anglicko)
- Vortex (Reax Top, Heidolph, Nemecko)
- Sušiareň (Mettler UFE 550, Mettler; Nemecko)
- Plynový chromatograf TraceTM 1310 so split/splitless injektorom (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Hmotnostný detektor ISQTM LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Knihovňa spektier NIST/EPA/NIH, Verzia 2.0 (Gaithersburg, Maryland, USA)
- Vyhodnocovací systém Xcalibur 2.2 (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Mikropipety (Biohit a Thermo Scientific; USA)
- Bežné laboratórne sklo a vybavenie

#### **3.1.2 Použité chemikálie**

- Destilovaná voda (FCH VUT; Česko)
- Ethanol 96% (Penta; Česko)
- Kyselina gallová (Penta; Česko)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma–Aldrich; USA)
- Uhličitan sodný bezvodý (Lachema; Česko)
- ABTS (Sigma-Aldrich; USA)
- Trolox (Sigma-Aldrich; USA)
- Peroxosíran draselný (Penta; Česko)
- Hélium čistota 4.8, vtlakovej nádobe s redukčným ventilom (SIAD)

#### **3.1.3 Analyzované vzorky**

V experimentálnej časti diplomovej práce boli analyzované vzorky *Echinacey purpurey*. Boli použité sušené kvety *Echinacey* (Obrázok 8), ktoré boli získané od súkromného pestovateľa.

Obrázok 8 Sušené kvety *E. purpurey*



### ***Príprava extraktov – macerácia***

Pre získanie extraktov z *Echinacey* bola v rámci tejto práce použitá macerácia. Navážené množstvo vzorky sa premiestnilo do Erlenmayerových baniek a bolo zaliate vodným roztokom etanolu. Vždy na začiatku boli banky premiešané pomocou tyčinky, aby došlo k ponoreniu celého obsahu do rozpúšťadla. Následne boli banky zakryté alobalom a ponechali sa stáť po určitú dobu. Po ukončení macerácie bol extrakt sfiltrovaný. Vzorky boli skladované v chladničke až do ďalšej analýzy.

### **3.2 Metódy a postup práce**

V tejto práci bol optimalizovaný proces získavania alkoholového extraktu zo sušených kvetov *E. purpurey* s ohľadom na čo najvyšší obsah fenolických (Folin-Ciocalteuova metóda) a aromatických látok (HS-SPME-GC-MS). Faktory, ktoré boli optimalizované, sú rozpúšťadlo, čas, teplota a navážka a v Tabuľke 5 sú uvedené podmienky, pri ktorých prebiehali optimalizácie.

Tabuľka 5 Prehľad podmienok využitých pri optimalizácii extrakcii

Otimalizovaný faktor	Pomer navážka/ rozpúšťadlo	Rozpúšťadla	Doba extrakcie	Teplota
<b>Rozpúšťadlo</b>	1:10	Voda	60 min	labor.
	1:10	40 % EtOH	60 min	labor.
	1:10	80 % EtOH	60 min	labor.
<b>Doba</b>	1:10	40 % EtOH	20 min	labor.
	1:10	40 % EtOH	40 min	labor.
	1:10	40 % EtOH	60 min	labor.
<b>Navážka</b>	1:10	40 % EtOH	60 min	labor.
	1:5	40 % EtOH	60 min	labor.
	1:3,33	40 % EtOH	60 min	labor.
<b>Teplota</b>	1:10	40 % EtOH	60 min	labor.
	1:10	40 % EtOH	60 min	40°C
	1:10	40 % EtOH	60 min	60°C

Po stanovení najvhodnejšieho extrakčného systému bol pripravený optimalizovaný extrakt, ktorý bol ďalej skúmaný. Prebiehalo stanovení aromatických látok, stanovoval sa obsah celkových fenolických látok a merala sa antioxidačná a antimikrobiálna aktivita extraktu.

### 3.2.1 Optimalizácia typu rozpúšťadla

K stanoveniu vhodného rozpúšťadla bola použitá voda a zároveň boli pripravené zásobné roztoky 40% a 80% etanolu zriedením 96% etanolu. Do Erlenmayerových baniek bolo navážených 5 g rastlinného materiálu. Následne bolo pridané 50 ml rozpúšťadla. Vzorka bola extrahovaná po dobu 60 minút pri laboratórnej teplote. Po uplynutí času bol extrakt prefiltrovaný. V takto pripravenom extrakte bola stanovovaná koncentrácia fenolických látok spektrofotometrickou metódou a zároveň prebehlo stanovenie aromatických látok metódou HS-SPME-GC-MS. Každá hodnota rozpúšťadla sa stanovovala 3-krát.

### 3.2.2 Optimalizácia navážky

Zriedením 96% etanolu bol pripravený zásobný roztok etanolu o koncentrácií 40%. K stanoveniu optimálnej navážky bolo do Erlenmayerových baniek postupne navážených 5 g, 10 g a 15 g kvetov *E. purpurey*. Potom bol materiál zaliaty 50 ml rozpúšťadla a extrakcia prebiehala pri laboratórnej teplote po dobu 60 minút. Po ukončení macerácie bola vzorka prefiltrovaná a následne sa stanovovala celková koncentrácia fenolických látok spektrofotometrickou metódou a stanovenie aromatických látok pomocou HS-SPME-GC-MS. Každá hodnota navážky bola vykonaná 3-krát.

### 3.2.3 Optimalizácia doby extrakcie

Zriedením 96% etanolu bol pripravený zásobný roztok etanolu o koncentrácií 40%. Optimálna doba extrakcie bola vyhodnocovaná v časoch 20 minút, 40 minút a 60 minút. Do Erlenmayerových baniek bolo navážených 5 g vzorky rastliny a k materiálu bolo pridaných 50 ml rozpúšťadla. Extrakcia prebiehala pri laboratórnej teplote. V stanovenom čase bol

ukončený proces a extrakt sa prefiltraval, aby sa oddelila pevná forma materiálu. Pripravené vzorky boli analyzované na celkovú koncentráciu fenolických látok spektrofotometrickou metódou a na aromatické látky pomocou HS-SPME-GC-MS. Každý extrakt v danom čase bol pripravený 3-krát.

### 3.2.4 Optimalizácia teploty extrakcie

Zriedením 96% etanolu bol pripravený zásobný roztok etanolu o koncentrácií 40%. Pre stanovenie optimálnej teploty extrakcie boli vybraté hodnoty laboratórna teplota, 40°C a 60°C. 5 g vzorky bolo navážených do Erlenmayerových baniek a postupne sa pridávalo 50 ml rozpúšťadla. Banky boli uložené do sušiarne na dosiahnutie 40°C a 60°C. Extrakcia prebiehala 60 minút a potom boli vzorky prefiltrované. Stanovovala sa celková koncentrácia fenolických látok spektrofotometrickou metódou a aromatické látky pomocou HS-SPME-GC-MS. Každý extrakt pri rozdielnych teplotách bol pripravený 3-krát.

### 3.2.5 Stanovenie celkových fenolických látok

Celkový obsah fenolických látok bol stanovovaný pomocou Folin-Ciocalteuova činidla spektrofotometricky.

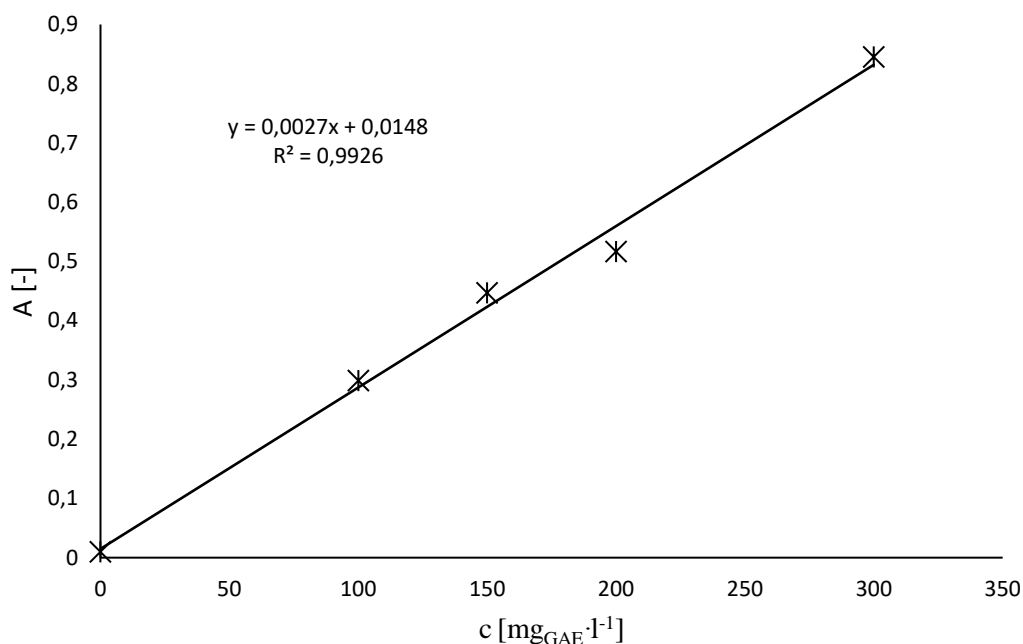
#### *Príprava chemikálií:*

Najprv boli pripravené roztoky. Roztok nasýteného uhličitanu sodného bol pripravený navážením 7,5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , ktorý bol prevedený do 100 ml odmernej banky a doplnený destilovanou vodou po rysku. Roztok Folin-Ciocalteuového činidla bol pripravený zriedením v pomere 1:9 destilovanou vodou.

#### *Príprava kalibračnej krivky:*

Pre prípravu kalibračnej krivky bol použitá kyselina gallová (

Graf 1). Zo základného štandardu o koncentrácií  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  boli postupným riedením pripravené 4 roztoky o koncentráciách 100, 150; 200, 300  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Do skúmaviek bolo napipetovaných vždy po 1 ml Folin-Ciocalteuového činidla, 1 ml destilovanej vody a 100  $\mu\text{l}$  jednotlivých roztokov štandardu. Obsah bol premiešaný a nechal sa stáť po dobu 5 minút. Potom bol pridaný 1 ml roztoku uhličitanu sodného a bol znova premiešaný. Po 35 minútach v tme bola zmeraná absorbanca pri 750 nm proti slepej vzorke.



Graf 1 Kalibračná krivka – závislosť koncentrácie na absorbancii

#### Vlastné meranie:

Vlastné meranie prebiehalo obdobne ako príprava kalibračnej krivky. Do skúmaviek bolo napipetovaných vždy po 1 ml Folin-Ciocalteuového činidla, 1 ml destilovanej vody a 100 µl extraktu vzorky. Obsah bol premiešaný a nechal sa stáť po dobu 5 minút. Potom bol pridaný 1 ml roztoku uhličitanu sodného a bol znova premiešaný. Po 35 minútach v tme bola zmeraná absorbancia pri 750 nm proti slepej vzorke. Pri príprave slepej vzorky sa na miesto extraktu vzorky pridalo rozpúšťadlo (40% etanol).

### 3.2.6 Stanovenie aromatických látok

Na stanovovanie aromatických látok bola použitá metóda HS-SPME-GC-MS. Do vialky bol napipetovaný objem 3 ml extraktu a uzatvorená kovovým uzáverom. Takto pripravená vialka bola umiestnená do autosampleru a pomocou programu Xcalibur 2.2 bola vykonaná analýza. K identifikácii látok bola využitá dostupná knihovňa spektier, pomocou ktorej sa porovnávali retenčný čas a hmotnostné spektrá. Na základe plôch píkovo bol vyjadrený semikvantitatívne obsah látok. Každá vzorka bola stanovená 3-krát.

#### 3.2.6.1 Podmienky SPME extrakcie

- Doba inkubácie: 10 minút
- Doba extrakcie: 20 minút
- Teplota extrakcie a inkubácie: 40 °C
- Agitátor: zapnutý 5 s, vypnutý 60 s
- Množstvo vzorky: 3 ml
- Hĺbka ponorenia vlákna do vialky: 20 mm

#### 3.2.6.2 Podmienky GC-MS analýzy

- Kapilárna kolóna TG-WaxMS (30 m × 0,25 mm × 0,5 µm)

- Teplota injektoru (desorpcia): 240°C
- Doba desorpcie: 40 minút
- Dávkovanie: splitless, ventil uzavretý 10 minút
- Hĺbka ponorenia vlákna do injektoru: 40 mm
- Nosný plyn: Hélium
- Prietok nosného plynu: 1 ml·min<sup>-1</sup>
- Teplotný program: 40 °C s výdržou 2 minút, vzostupný gradient 3 °C/min do 130°C s výdržou 0 minút, vzostupný gradient 5 °C·min<sup>-1</sup> do 200°C s výdržou 0 minút, celková doba analýzy 50 minút
- Hmotnostný detektor v móde EI
  - Energia ionizačných elektrónov: 70 eV
  - Teplota iónového zdroja 200°C
  - Skenovací rozsah m/z 30–370 amu
  - Rýchlosť skenovania 0,2 s

### 3.2.7 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Antioxidačná aktivita bola stanovená pomocou metódy využívajúcu radikál katiónu ABTS<sup>•+</sup>. Zhášanie radikálu sa sleduje spektrofotometricky na základe zmien absorpčného spektra. Výsledná aktivita vzorky je porovnávaná s antioxidačnou aktivitou syntetickej látky Troloxu.

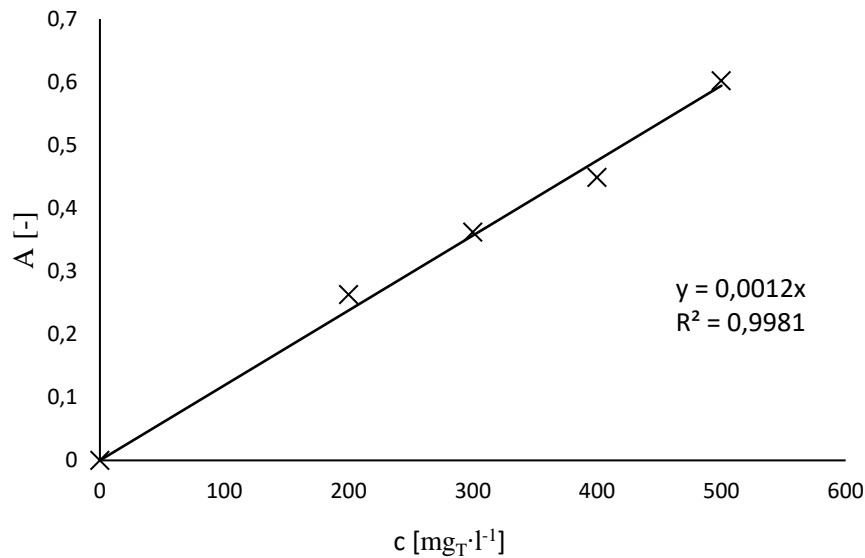
#### *Príprava chemikálií:*

Bol pripravený roztok ABTS v 10 ml odmernej banke o koncentrácií 7 mmol l<sup>-1</sup>. Odmerná banka bola doplnená po rysku destilovanou vodou. Reakciou s 2,45 mmol·l<sup>-1</sup> peroxodisíranom draselným (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) bol pripravený radikálový katión ABTS<sup>•+</sup>. Roztok bol ponechaný v chladničke, v tme po dobu 12 hodín.

#### Príprava kalibračnej krivky:

Bola pripravená kalibračná krivka Troloxu v rozmedzí koncentrácií 100-500 µg ml<sup>-1</sup> (

Graf 2). Štandard Troloxu bol rozpustený v 60% etanole a bola zmeraná kalibračná závislosť absorbancie na koncentrácií.



Graf 2 Kalibračná krivka – závislosť absorbančie Troloxu na koncentrácii

#### Vlastné meranie:

Pred samotným použitím bol zásobný roztok  $\text{ABTS}^{++}$  zriedený 60% etanolom na absorbanciu  $0,7 \pm 0,02$  pri 734 nm (merané proti etanolu pri UV-VIS). Potom bol do kyvety napipetovaný 1 ml zriedeného roztoku  $\text{ABTS}^{++}$  a 10  $\mu\text{l}$  rozpúšťadla a ihneď sa zmerala absorbancia v čase 0 ( $A_0$ ). Následne pre stanovenie antioxidačnej aktivity vzorky bolo do kyvety napipetovaný 1 ml zriedeného  $\text{ABTS}^{++}$  a k nemu pridaných 10  $\mu\text{l}$  extraktu. Obsah bol premiešaný na Vortexe a na 10 minút ponechaný v tme. Po uplynutí času bola zmeraná absorbancia ( $A_{10}$ ).

#### Výpočet:

Pre výpočet výslednej absorbančie bola použitá rovnica (1) a výsledná antioxidačná aktivita bola vyjadrená parametrom TEAC, j. ekvivalentným množstvom Troloxu. Zhášanie radikálu sa vypočíta podľa vzorca (2).

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

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

### 3.2.8 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity

Antimikrobiálna aktivita bola stanovená difúznou jamkovou metódou, testované boli 3 mikroorganizmy – grampozitívna baktéria *Bacillus cereus*, gramnegatívna baktéria *Escherichia coli* a kvasinka *Candida glabrata*. Mikroorganizmy pochádzali z Českej zbierky mikroorganizmov v Brne.

Kultivácia baktérií prebiehala na masopeptonovom agare Nutrient Agar No. 2 a pre kultiváciu kvasinky bol použitý sladínový agar (Malt Extract Agar BASE).

### Zloženie živných médií

- *Masopeptonový agar*: Masový peptón  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , hovädzí extrakt  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , chlorid sodný  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , agar  $15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- Sladinový agar: sladový extrakt  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , mykologický peptón  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , agar  $15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Pred zahájením stanovovania boli mikroorganizmy preočkované na šikmý agar a kultivované pri optimálnej teplote týždeň. Následne boli zo šikmého agaru preočkované do tekutej živnej pôdy (5 ml skúmavka s bujónom) a kultivované pri  $25^{\circ}\text{C}$ , 24 hodín.

### Difúzna jamková metóda:

Živné média (MPA, SA) boli pripravené podľa návodu na obale do Erlenmayerových baniek (200 ml) a vysterilizované. Banky boli následne ochladené, tak aby pôda ostala ešte tekutá a pipetou boli pridané 2 ml suspenzie bujónu s príslušnou kultúrou mikroorganizmu. Pripravené médium bolo rozliate do Petriho misiek. V prípade *E. coli* bolo už stuhnuté médium preliate ešte jednou vrstvou agaru. Po stuhnutí boli sterilným korkovrtom vyvrtané 4 jamky. 3 z nich boli naplnené  $100 \mu\text{l}$  extraktu. Do poslednej bolo napipetované  $100 \mu\text{l}$  rozpúšťadla a slúžila ako kontrolná jamka. Petriho misky s médiami boli kultivované pri optimálnej teplote  $25^{\circ}\text{C}$  pre *Bacillus cereus* a *Candida glabrata*, a pri  $37^{\circ}\text{C}$  pre *Escherichia coli*, po dobu 3 dní. Následne boli zmerané inhibičné zóny.

### 3.3 Štatistické spracovanie výsledkov

Výsledky boli spracované a vyhodnotené pomocou MS Excel 2016 a programom STATISTICA 13 a sú vyjadrené v tvare priemer  $\pm$  smerodajná odchýlka, príp. graficky, kde chybové úsečky vyjadrujú smerodajné odchýlky. Merania boli vykonané trikrát ( $n = 3$ ).

Pre zistenie rozdielov medzi vzorkami bol použitý Kruskal-Wallisova metóda (jednofaktorová neparametrická ANOVA).



## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Táto práca je súčasťou rozsiahlej štúdie zaoberajúcou sa možnosťou získavania extraktov biologicky aktívnych látok z vybraných druhov prírodných rastlinných materiálov a ich aplikácií do potravín, príp. iných výrobkov.

Cieľom tejto práce bola optimalizácia extrakčného systému na zisk extraktu z *E. purpurey*, ktorý by bol bohatý na biologicky aktívne látky. Ako typ použitej extrakcie bola vybraná macerácia, kvôli jej jednoduchosti. Po stanovení vhodných extrakčných podmienok bol pripravený extrakt. Tento „optimálny“ extrakt bol ďalej skúmaný z hľadiska jeho antioxidačnej a antimikrobiálnej aktivity, a zároveň z hľadiska profilu prchavých látok a celkového obsahu koncentrácie fenolických látok.

### 4.1 Optimalizácia macerácie

Na základe štúdia literatúry a vykonaných predbežných experimentov boli pre optimalizáciu vybrané 4 faktory, a to teplota a doba macerácie, koncentrácia rozpúšťadla a pomer navážky k rozpúšťadlu. Prehľad podmienok využitých pri optimalizácii je uvedený v kapitole 3.2 v Tabuľke 5.

Každá extrakcia pozostávala z dvoch paralelných meraní. Získané výluhy boli hodnotené na obsah celkových polyfenolických látok pomocou Folin-Ciocalteuového činidla. Druhou analýzou bolo semikvantitatívne stanovovanie aromatických látok pomocou metódy HS-SPME-GC-MS. Vhodné podmienky boli vybrané na základe dosiahnutého čo najväčšieho množstva fenolických látok v extrakte, a zároveň čo najvyššieho počtu a obsahu prchavých látok.

#### 4.1.1 Optimalizácia typu (koncentrácie) rozpúšťadla

Prvým stanovaným parametrom pre optimalizáciu extrakcie kvetu *E. purpurey* bolo rozpúšťadlo, resp. jeho vhodná koncentrácia. Bol zvolený etanol (40% a 80%) a voda, pretože sú vhodné pre použitie v potravinárstve. Macerácia prebiehala pri laboratórnej teplote, 60 minút a navážených bolo 10 g sušeného materiálu na 100 ml rozpúšťadla. Pre ilustráciu pripravených extraktov je uvedený Obrázok 9.

V takto získaných extraktoch boli stanovované celkové polyfenoly a aromatické látky. Výsledky získané z týchto meraní boli priemerované a spracované. Vypočítané hodnoty je možné vidieť v Tabuľke 6 pre stanovenie polyfenolov a v Tabuľke 7 pre stanovenie prchavých látok.



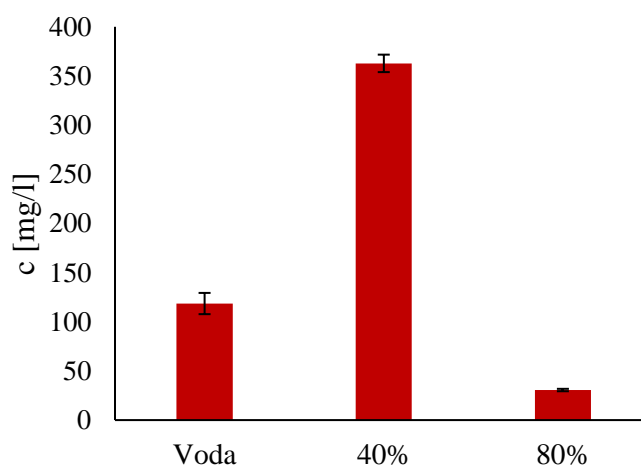
Obrázok 9 Pripravené extrakty pre optimalizáciu rozpúšťadla, zľava - voda, 40% etanol, 80% etanol

Tabuľka 6 Celkový obsah fenolických látok v extrakte pripravenom pre optimalizáciu rozpúšťadla

Koncentrácia rozpúšťadla	Absorbancia $\pm$ SD [-]	Obsah fenolických látok $\pm$ SD [ $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
Voda	$0,335 \pm 0,030$	$118,53 \pm 10,80$
40% etanol	$0,994 \pm 0,024$	$362,80 \pm 8,89$
80% etanol	$0,097 \pm 0,003$	$30,57 \pm 1,23$

Pomocou štatistickej metódy bolo zistené, že získané parametre nie sú normálne distribuované. Bola zvolená Kruskal-Wallisovova metóda a na základe výsledkov z nej získaných ( $p = 0,005$ ) sa dá tvrdiť, že maceráty sa štatisticky významne líšia, čo je možné vidieť z ich jednoduchého vizuálneho porovnania (Obrázok 9). Následne bolo vykonané porovnanie skupín. Najväčší rozdiel bol medzi 40% a 80% etanolom.

V Grafe 3 sú vyobrazené získané výťažky polyfenolov a je zreteľné, že najvyššie výťažky boli získané 40% etanolom ( $362,80 \pm 8,89 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ). V porovnaní s najnižšou hodnotou ( $30,57 \pm 1,23 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), ktorá bola získaná použitím 80% etanolu, je rozdiel viac než 11-násobný.



Graf 3 Celkový obsah fenolických látok v rozdielnych koncentráciách rozpúšťadiel

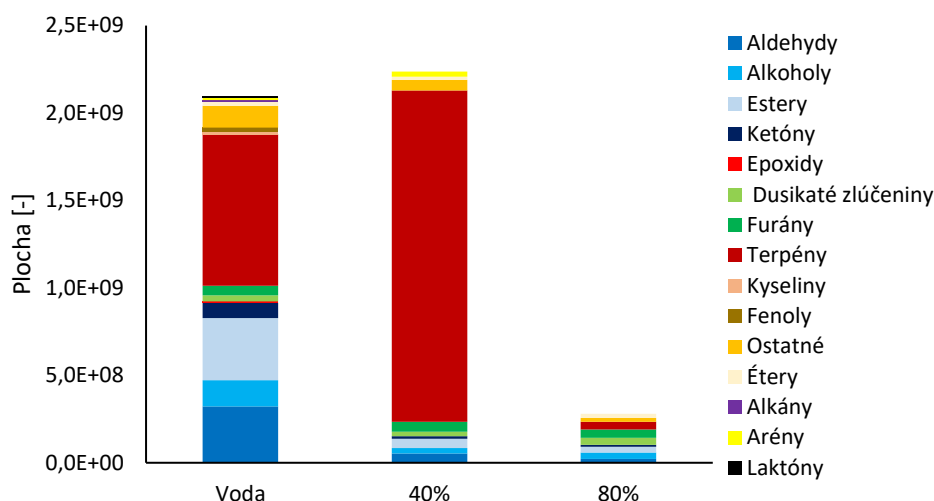
Identifikované aromatické látky boli rozdelené do skupín podľa ich chemickej štruktúry : aldehydy, alkoholy, ketóny, estéry, epoxidy, dusíkaté zlúčeniny, furány, terpény, kyseliny,

fenoly, étery, alkány, arény, laktóny, alkény a ostatné. V Tabuľka 7 sa nachádza vypočítané percentuálne zastúpenie skupín v jednotlivých rozpúšťadlách.

*Tabuľka 7 Percentuálne zastúpenie aromatických látok v extraktoch pripravených pre optimalizáciu rozpúšťadla*

Skupina	Percentuálne zastúpenie [%]		
	Voda	40% etanol	80% etanol
<b>Aldehydy</b>	15,70	2,43	8,17
<b>Alkoholy</b>	7,32	1,33	13,49
<b>Estery</b>	17,27	2,38	12,19
<b>Ketóny</b>	4,26	0,70	4,55
<b>Epoxydy</b>	0,42	-	-
<b>Dusíkaté zlučeny</b>	1,63	1,17	14,75
<b>Furány</b>	2,65	2,52	17,53
<b>Terpény</b>	42,24	85,22	16,75
<b>Kyseliny</b>	0,71	-	-
<b>Fenoly</b>	1,15	-	-
<b>Ostatné</b>	6,03	2,78	8,21
<b>Étery</b>	1,26	0,79	8,73
<b>Alkány</b>	0,33	-	-
<b>Arény</b>	0,63	1,35	-
<b>Laktóny</b>	0,32	-	-

Obsah zlučeny bol stanovený semikvantitatívne na základe plôch píkov (relatívny obsah). Najvyšší obsah vyextrahovaných aromatických látok bol zistený v 40% etanole, čo je možné vidieť i na Grafe 4. Vo vode aj v 40% etanole boli terpény najzastúpenejšou zložkou, čo bolo očakávané, keďže sa jedná o rastlinný materiál. Do 80% etanolu bolo vyextrahované niekoľkonásobne menšie množstvo aromatických látok ako do zvyšných dvoch rozpúšťadiel. Najväčšie skupiny látok v ňom predstavovali furány a terpény.

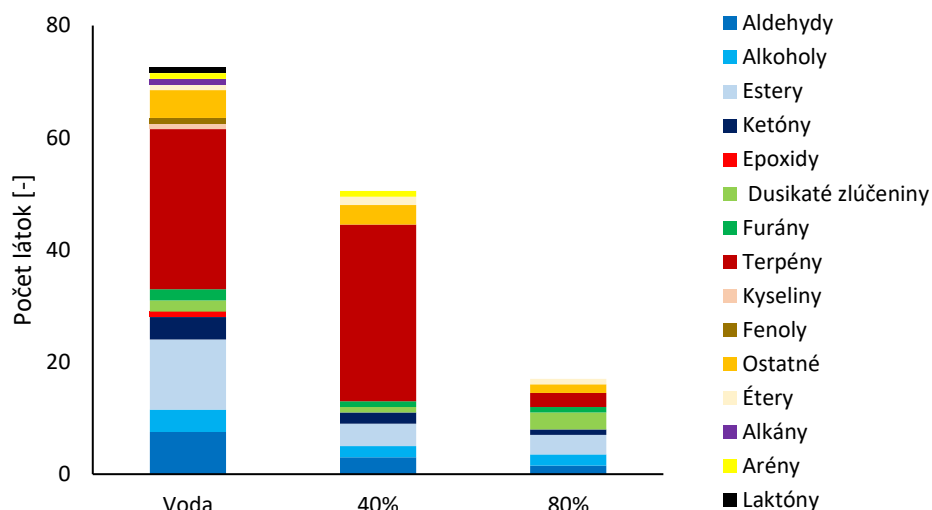


Graf 4 Grafické zobrazenie relatívneho obsahu skupín aromatických látok pre rozdielne koncentrácie rozpúšťadla

Porovnanie počtu identifikovaných látok je možné vidieť v Grafe 5. Na základe získaného počtu látok sa voda javí ako optimálne rozpúšťadlo s najväčšou dosiahnutou hodnotou a predstavovala by aj výhodné rozpúšťadlo z ekonomického hľadiska. Avšak je riziková z hľadiska mikrobiálnej kontaminácie. Tvrdenie, že voda obsahovala najviac látok je možné zhodnotiť i pomocou Obrázku 9, kde je krásne vidieť farebnú zmenu s pribúdajúcou koncentráciou. Preto bola voda zhodnotená ako nevyhovujúca. Najmenšia hodnota bola znova dosiahnutá pre 80% etanol.

Na základe výsledkov získaných zo skúmania obsahu fenolických látok, počtu a obsahu aromatických látok, bol stanovený 40% etanol ako optimálne rozpúšťadlo pre extrakciu sušených kvetov *E. purpurey*.

V práci Wu a kol. [59] boli testované koncentrácie etanolu v rozmedzí 20 – 100 % a ako vyhovujúce rozpúšťadlo pre získanie fenolických látok určili 60% etanol. Avšak výsledky neboli zhodné s výsledkami získanými v tejto práci. Pretože aj keď bol detegovaný pokles látok s rastúcou koncentráciou, v 80% etanole bol stanovený väčší obsah fenolických látok ako v 40% etanole. Podobné výsledky poklesu látok fenolických látok so zvyšujúcou sa koncentráciou etanolu boli zaznamenané aj v štúdií Tsai a kol. [36], ale ako optimálnu koncentráciu určili 50% etanol. V práci Lepojevic a kol. [25] bol pozorovaný najvyšší obsah polyfenolov v 50% roztoku etanolu. Aj keď údaje z literatúry nie sú zhodné s výsledkami tejto práce, predstavuje to istý základ pre ďalší výskum optimalizácie rozpúšťadla.



Graf 5 Grafické zobrazenie počtu látok v skupinách v extraktoch pripravených pre optimalizáciu rozpúšťadla

#### 4.1.2 Optimalizácia navážky materiálu

Pre optimalizáciu navážky rastlinného materiálu boli vybrané 3 hodnoty - 1:10, 1:5 a 1:3,33 v pomere ku rozpúšťadlu. Macerácia prebehla pri laboratórnej teplote 40% etanolom a po dobu 60 minút. Pripravené rastlinné extrakty pre analýzy je možné vidieť na Obrázku 10. Získané hodnoty boli spriemerované a spracované.



Obrázok 10 Pripravené extrakty pre optimalizáciu navážky, zľava (v pomere navážky ku rozpúšťadlu) - 1:10, 1:5, 1:3,33

Výsledky stanovenia celkových fenolických látok sú uvedené v Tabuľke 8 a ich grafické zobrazenie v Grafe 6. V grafe je možné viditeľne pozorovať nárast koncentrácie s narastajúcou navážkou. Takže najvyššie hodnoty množstva fenolických látok boli stanovené v navážke 30 g na 100 ml rozpúšťadla a to  $382,30 \pm 14,07 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ .

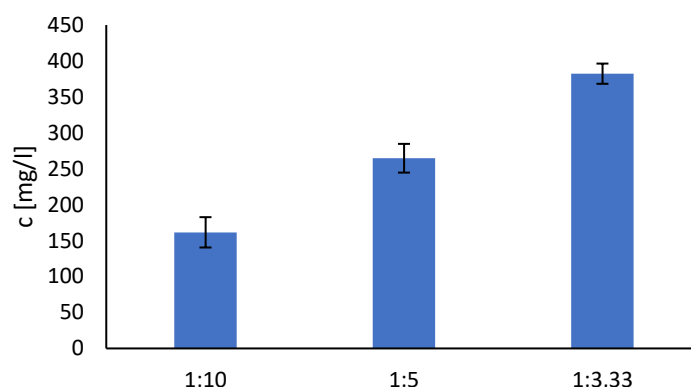
Na základe štatistického zhodnotenia bolo zistené, že dáta nie sú normálne distribuované. Bola použitá Kruskal-Wallisovova metóda ( $p = 0,005$ ) a na základe výsledkov sa dá tvrdiť, že maceráty sa štatisticky významne líšia. Následne bolo vykonané porovnanie skupín a vyhodnotené, že parametre sa medzi sebou odlišovali. Najväčší rozdiel bol medzi pomerom

1:10 a 1:3,33. Na základe získaných dát sa javí ako najlepšie použitie parametra pomeru navážky k rozpúšťadlu 1:3,33.

Tabuľka 8 Celkový obsah fenolických látok v extrakte pripravenom pre optimalizáciu navážky

<b>Pomer navážka/ rozpúšťadlo</b>	<b>Absorbancia ± SD [-]</b>	<b>Obsah fenolických látok ± SD [mg<sub>GAE</sub> · l<sup>-1</sup>]</b>
1:10	0,451 ± 0,057	161,56 ± 21,11
1:5	0,729 ± 0,054	264,64 ± 20,00
1:3,33	1,047 ± 0,038	382,30 ± 14,07

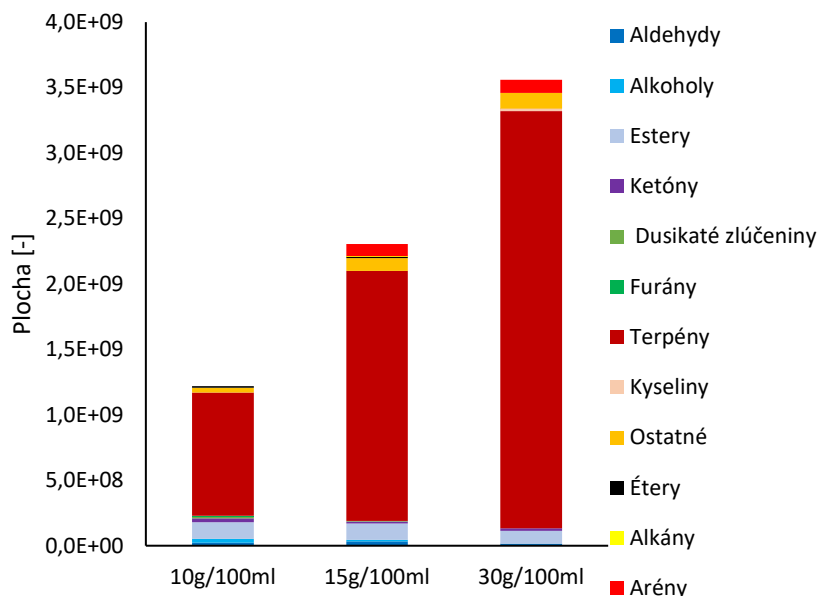
Graf 6 Celková koncentrácia fenolických látok pri rozdielnych navážkach



Identifikované prchavé látky boli zaradené na základe chemickej štruktúry do skupín v Tabuľke 7 sa nachádza vypočítané percentuálne zastúpenie skupín pre jednotlivé navážky.

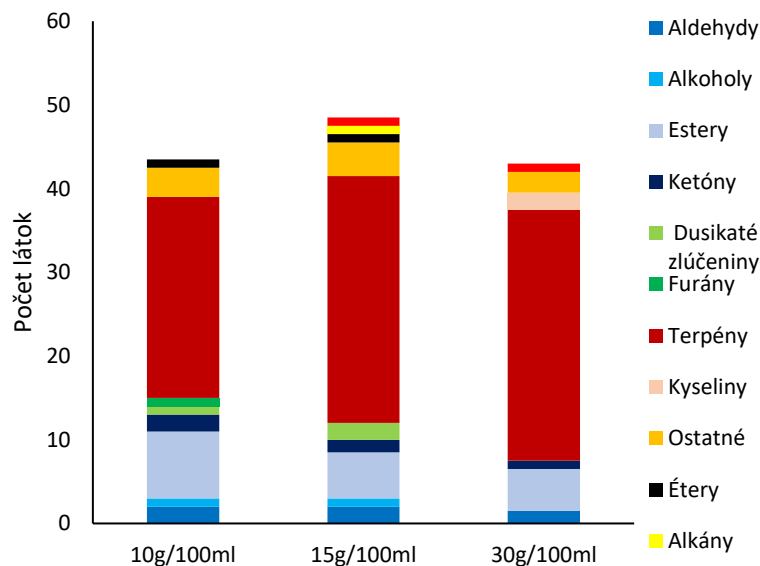
Tabuľka 9 Percentuálne zastúpenie skupín prchavých látok v extrakte pripravenom pre optimalizáciu navážky

<b>Skupina</b>	<b>Percentuálne zastúpenie [%]</b>		
	<b>1:10</b>	<b>1:5</b>	<b>1:3,33</b>
<b>Aldehydy</b>	1,88	1,43	0,47
<b>Alkoholy</b>	2,54	0,61	-
<b>Estéry</b>	10,50	5,48	2,73
<b>Ketóny</b>	2,41	0,66	0,58
<b>Dusíkaté zlúčeniny</b>	1,33	0,23	-
<b>Furány</b>	0,44	-	-
<b>Terpény</b>	78,44	84,83	89,79
<b>Kyseliny</b>	-	-	0,54
<b>Ostatné</b>	3,09	4,42	3,35
<b>Étery</b>	0,86	0,44	-
<b>Alkány</b>	-	0,23	-
<b>Arény</b>	-	4,03	-



Graf 7 Grafické zobrazenie relatívneho obsahu skupín aromatických látok pre rozdielne navážky

Tak isto ako v prípade fenolických látok i tu je z Grafu 7 vidieť jednoznačný nárast obsahu fenolických látok s pribúdajúcou navážkou rastlinného materiálu. Najbohatším extraktom na obsah aromatických látok bol teda určený výťažok s navážkou 30 g na 100 ml. V každom z extraktov predstavovali najväčšiu skupinu terpény, pričom ich množstvo sa viac ako zdvojnásobilo.



Graf 8 Grafické zobrazenie počtu prchavých látok v extraktoch pripravených pre optimalizáciu navážky

Pri stanovovaní počtu látok však bolo zistené, že sa výsledky líšia. Najväčší počet látok bol zistený pre navážku 15 g sušeného kvetu *E. purpurey*.

Aj keď analýzy obsahu polyfenolov a aromatických látok preukázali, že najvyššie hodnoty boli dosiahnuté u navážky 30 g na 100 ml rozpúšťadla. Prírastok extrahovaných látok je vidieť i na Obrázku 10 (stmavnutie výluhu). Ako optimálna hodnota bola vybraná – 20 g na 100 ml, z dôvodu úspory rastlinného materiálu. Taktiež boli spojené problémy s maceráciou, pretože

pri 30 g sušeného kvetu nebolo možné dostatočné ponorenie, teda celej navážky, daným objemom rozpúšťadla. Literatúra pre porovnanie vplyvu navážky na koncentráciu bioaktívnych látok nebola nájdená.

#### 4.1.3 Optimalizácia doby extrakcie

Celkovo boli vykonané pre optimalizáciu doby extrakcie 3 merania, a to v čase 20 min, 40 min, 60 min. Extrakcia prebehla pri podmienkach uvedených v kapitole 3.2 v Tabuľke 5. Pre ilustráciu pripravených extraktov je priložený Obrázok 11.



Obrázok 11 Pripravené extrakty použité pri stanovovaní optimalizácie doby, zľava - 20 min, 40 min, 60 min

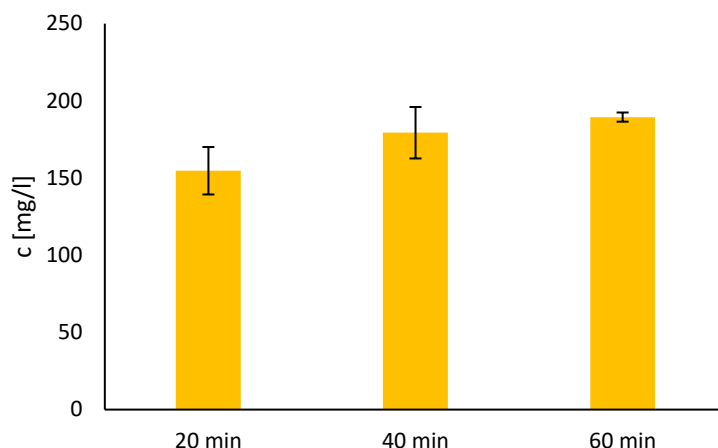
Pri stanovení celkového obsahu fenolických látok boli medzi výsledkami zaznamenané malé rozdiely. Najmä v grafickom zobrazení je vidieť, že rozdiely nie sú tak zjavné ako boli v predchádzajúcich prípadoch. Najvyššia hodnota bola dosiahnutá pri 60 minútach ( $189,46 \pm 2,96 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Všetky výsledky sú uvedené v Tabuľke 10 a zobrazené v Grafe 9.

Na základe štatistickej analýzy bolo zistené, že dáta nie sú normálne distribuované. Bola použitá Kruskal-Wallisovova metóda ( $p = 0,0361$ ) a na základe výsledkov sa dá tvrdiť, že maceráty sa štatisticky významne líšia. Bolo vyhodnotené, že extrakty získané pri 40 min a 60 min sú si podobné a najväčší rozdiel bol zaznamenaný medzi macerátmi pripravenými pri 20 min a pri 60 min. Na základe štatistickej analýzy sa javí ako najlepšie použitie 60 minút.

Tabuľka 10 Celkový obsah fenolických látok pre rozdielne hodnoty doby extrakcie

Doba	Absorbancia $\pm$ SD [-]	Obsah fenolických látok $\pm$ SD [ $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
20 min	$0,433 \pm 0,042$	$154,7037 \pm 15,37$
40 min	$0,499 \pm 0,045$	$179,3333 \pm 16,67$
60 min	$0,526 \pm 0,008$	$189,4568 \pm 2,96$



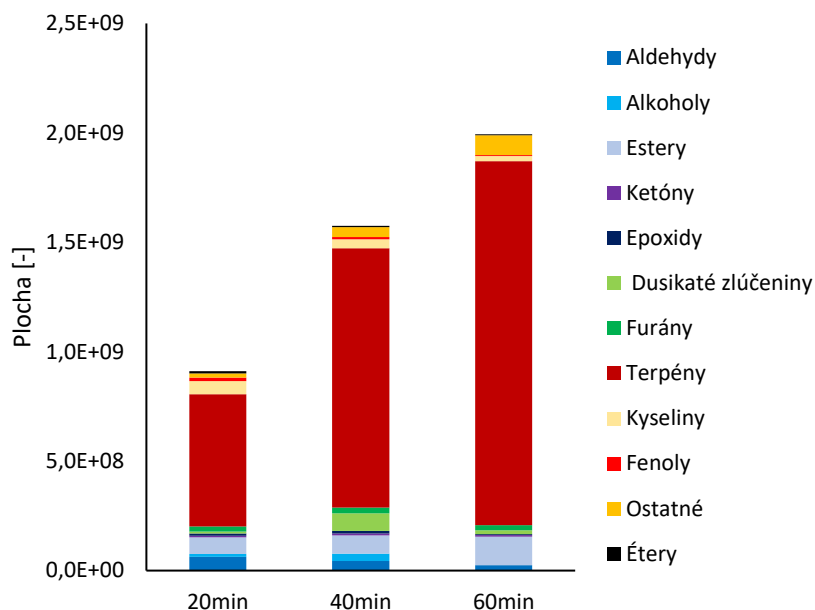


Graf 9 Zobrazenie porovnania koncentrácie polyfenolov v extraktoch pripravených pri rozdielnej dobe

Aromatické látky boli opäť roztriedené do chemických skupín na základe štruktúry v Tabuľke 11 sa nachádza vypočítané percentuálne zastúpenie skupín pre jednotlivé doby extrakcie.

Tabuľka 11 Percentuálne zastúpenie skupín prchavých látok v extrakte pripravenom pre optimalizáciu doby

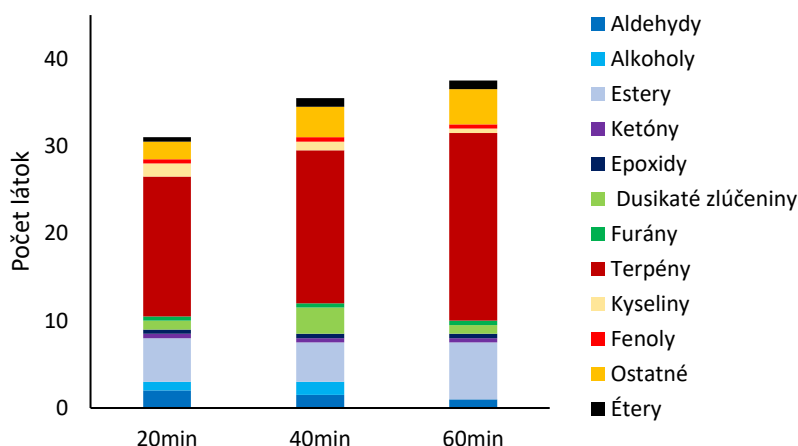
Skupina	Percentuálne zastúpenie [%]		
	20 min	40 min	60 min
<b>Aldehydy</b>	6,87	2,77	1,23
<b>Alkoholy</b>	1,41	2,17	-
<b>Estery</b>	8,46	5,31	6,52
<b>Ketóny</b>	0,75	0,52	0,35
<b>Epoxidy</b>	1,08	0,78	0,28
<b>Dusíkaté zlúčeniny</b>	1,02	5,09	0,86
<b>Furány</b>	2,50	1,63	1,20
<b>Terpény</b>	66,30	75,29	83,44
<b>Kyseliny</b>	6,57	2,60	1,13
<b>Fenoly</b>	1,80	0,59	0,22
<b>Ostatné</b>	2,14	2,93	4,60
<b>Étery</b>	1,09	0,33	0,17



Graf 10 Grafické zobrazenie relatívneho obsahu skupín aromatických látok pre rozdielne doby extrakcie

Obsah aromatických látok sa, na rozdiel obsahu polyfenolov, javil jednoznačne. V Grafe 10 je vidieť zvyšujúce sa množstvo aromatických látok s dlhším časom extrakcie. Takže najvyššie hodnoty boli dosiahnuté pri 60 minútach. Pri každej extrakcii predstavovali terpény najväčší podiel z obsahu a ostatné skupiny boli v minoritnom zastúpení.

Obdobné výsledky boli zistené i pri stanovení počtu aromatických látok (Graf 11), i keď rozdiel medzi extrakciami nebol tak výrazný. Najvyšší počet látok bol dosiahnutý pri 60 minútach a najnižší pri 20 minútach. Tento nárast je vidieť aj na Obrázok 11, s rastúcim časom je farba extraktu tmavšia. Keďže pri každom stanovovaní vyšli najvyššie hodnoty pre čas 60 minút, bola táto doba stanovená ako optimálna. V dostupnej literatúre boli použité rozdielne časy (30 min [36], 15 min [13], 1 hod [59]), ale v žiadnej práci nebola skúmaná doba macerácie a jej vplyv na fenolické alebo aromatické látky.



Graf 11 Grafické zobrazenie počtu látok v skupinách v extraktoch pripravených pre optimalizáciu doby extrakcie

#### 4.1.4 Optimalizácia teploty extrakcie

Stanovovanie optimálnej teploty extrakcie bolo vykonané pri 20°C (laboratórna teplota), 40°C a 60°C. Vyššie hodnoty teploty boli dosiahnuté umiestnením materiálu s rozpúšťadlom v Erlenmayerových bankách do sušiarne, ktorá bola zahriata na požadovanú teplotu. Macerácia prebehla pri parametroch uvedených v kapitole 3.2 v Tabuľke 5. Na Obrázku 12 je možné vidieť pripravené extrakty.



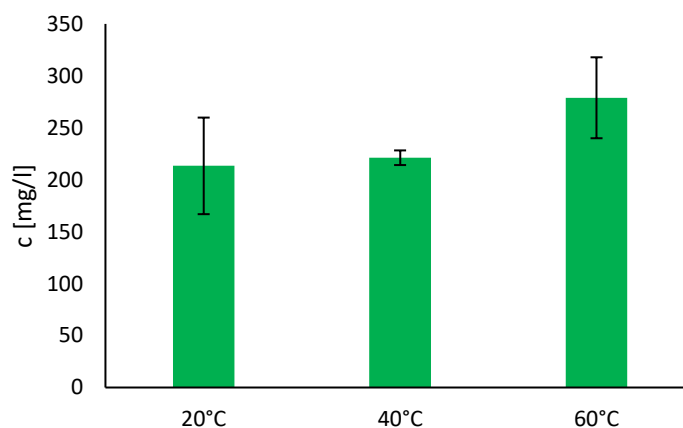
Obrázok 12 Pripravené extrakty použité pri stanovovaní optimalizácie doby, zľava - 20 °C, 40°C, 60°C

Najväčší nárast obsahu polyfenolov bol detegovaný pri 60 C. V ostatných dvoch prípadoch nárast nebol až taký prudký a opticky sa môže zdať, že medzi hodnotami 20°C a 40°C nie je rozdiel (Graf 12). Je očakávané, že s narastajúcou teplotou dochádza k zvyšovaniu vyextrahovaných látok. Toto tvrdenie je možné pozorovať i na Obrázku 12, kde s pribúdajúcou teplotou sa menilo i sfarbenie extraktov. Výsledky koncentrácie fenolických látok sú uvedené v Tabuľke 12.

Štatistická analýza preukázala, že dáta nie sú normálne distribuované. Bola použitá Kruskal-Wallisovova metóda ( $p = 0,0357$ ), podľa ktorej bolo určené, že sa extrakty od seba štatisticky líšia. Bolo vyhodnotené, že extrakty získané pri 20°C a 40°C sú si podobné a najväčší rozdiel bol zaznamenaný medzi macerátmi pripravenými pri 40°C a pri 60°C. Na základe získaných dát sa dá povedať, že parameter 60°C je najvhodnejší z hľadiska získaných polyfenolov.

Tabuľka 12 Celkový obsah fenolických látok v extrakte pripravenom pre optimalizáciu teploty

Teplota	Absorbancia $\pm$ SD [-]	Obsah fenolických látok $\pm$ SD [ $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
20°C	0,591 $\pm$ 0,126	213,3457 $\pm$ 46,48
40°C	0,612 $\pm$ 0,019	221,1852 $\pm$ 7,04
60°C	0,768 $\pm$ 0,105	278,9012 $\pm$ 38,95

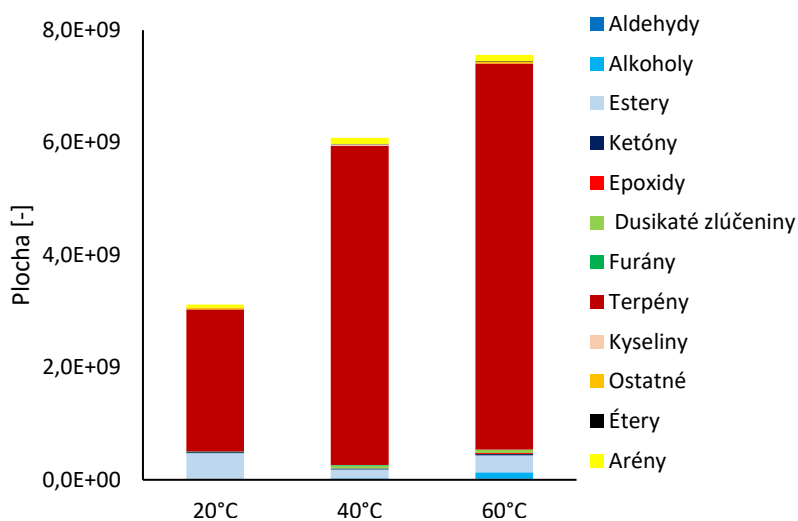


Graf 12 Zobrazenie porovnania koncentrácie polyfenolov v extraktoch pripravených pri rozdielnej teplote extrakcie

Skupiny, do ktorých boli roztriedené aromatické látky na základe štruktúry sú obdobné ako vyššie. V Tabuľke 13 sa nachádza vypočítané percentuálne zastúpenie skupín pre jednotlivé teploty .

Tabuľka 13 Percentuálne zastúpenie skupín prchavých látok v extrakte pripravenom pre optimalizáciu teploty

Skupina	Percentuálne zastúpenie [%]		
	20°C	40°C	60°C
<b>Aldehydy</b>	0,63	0,25	0,27
<b>Alkoholy</b>	-	0,19	1,47
<b>Estery</b>	14,67	2,59	4,01
<b>Ketóny</b>	0,42	0,28	0,31
<b>Epoxidy</b>	-		0,26
<b>Dusíkaté zlučneniny</b>	-	0,88	0,83
<b>Furány</b>	0,43	0,15	-
<b>Terpény</b>	81,20	93,61	90,83
<b>Kyseliny</b>	0	0,40	-
<b>Ostatné</b>	1,15%	-	0,39
<b>Étery</b>	-	0,12	0,12
<b>Arény</b>	1,70%	1,78	1,52

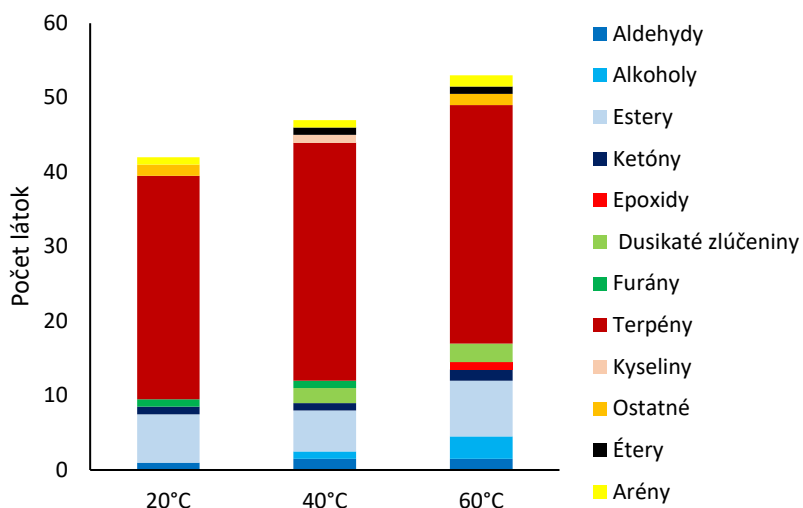


Graf 13 Grafické zobrazenie relatívneho obsahu skupín aromatických látok pre rozdielne teploty extrakcie

Znova, z hľadiska obsahu látok je vidieť nemalé rozdiely medzi extraktmi získanými pri jednotlivých teplotách. V Grafe 13 je možné pozorovať značný nárast obsahu aromatických látok so zvyšujúcou sa teplotou. Takže pri 60°C bolo množstvo aromatických látok viac ako dvakrát väčšie ako pri 20°C. Obsah terpénov bol pri každej teplote majoritný, ale tiež je možné poznamenať, že s pribúdajúcou sa teplotou sa ich koncentrácia zdvojnásobila.

Toto tvrdenie, ale nie je možné povedať o počtu aromatických látok. Tu sa nárast javil skôr lineárne (Graf 14) a najvyšší počet bol určený pre 60°C extrakciu. V prípade terpénov nebolo detegované nejaké výrazné navýšenie. Skôr pribudli iné typy zlučnenín.

Vďaka získaným dátam bola teplota 60°C určená ako optimálna pre extrakciu zo sušených kvetov *E. purpurey*. Podobné výsledky boli nájdené aj v literatúre. V práci Tsai. a kol. [36] určili ako optimálnu teplotu 65°C. Wu a kol. [59] skúmali taktiež vplyv teploty na extrakciu látok z *E. purpurea* a vyhodnotili ako optimálnu teplotu 60°C. Hodnoty teploty extrakcie 40°C, 55°C a 70°C boli z jedným zo stanovovaných parametrov v práci Lepojevic a kol. [25] a najvyššie hodnoty obsahu polyfenolov boli pri teplote 55°C. Dá sa ale tvrdiť, že hodnota teploty okolo 60°C je vyhovujúca pre extrakciu látok z *E. purpurey*.



Graf 14 Grafické zobrazenie počtu látok v skupinách v extraktoch pripravených pre optimalizáciu teploty extrakcie

## 4.2 Charakterizácia optimalizovaného extraktu

Na základe získaných výsledkov z kapitoly 414.1 bol stanovený optimálny extrakčný systém pre prípravu extraktu zo sušeného kvetu *E. purpurey*. Ako optimálne podmienky boli určené: teplota 60°C, 40% etanol, 60 minút a navážka v pomere 20 g na 100 ml. Vzorky extraktu boli pripravené maceráciou v troch paralelných meraniach a je možné ich vidieť na Obrázoku 13. Charakterizácia extraktu prebehla z hľadiska obsahu celkových fenolických látok, semikvantitatívneho stanovenia aromatických látok, antimikrobiálnej a antioxidačnej aktivity.



Obrázok 13 Optimalizovaný extrakt kvetu *E. purpurey*

#### 4.2.1 Stanovenie celkovej koncentrácie fenolických látok a antioxidačnej aktivity

Celkový obsah polyfenolov v optimálnom extrakte bol stanovený s využitím Folin-Ciocalteuho činidla spektrofotometricky, rovnako ako v priebehu optimalizácie. Dochádza k redukcií fenolických látok prítomných vo vzorke za vzniku modrého sfarbenia.

Vzorky neboli nijak upravované a ihneď boli stanovované koncentrácie fenolických látok. Priemerná hodnota z troch meraní bola dosadená do rovnice lineárnej regresie kalibračnej krivky kyseliny gallovej. Vypočítaný obsah polyfenolov bol vyjadrený ako ekvivalent množstva kyseliny gallovej ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Získané výsledky je možné vidieť v Tabuľke 14.

Pre stanovenie antioxidačnej aktivity pripraveného extraktu bola aplikovaná metóda TEAC, ktorá je založená na princípe zhasania radikál-kationu  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  pôsobením látok vykazujúcich túto schopnosť. Vyhodnotenie vlastností vzoriek prebiehalo spektrofotometricky stanovením absorpcie pri 734 nm.

Pre výpočet antioxidačnej aktivity bola použitá priemerná hodnota absorpcie z troch meraní, ktorá bola dosadená do rovnice lineárnej regresie kalibračnej krivky Troloxu. Výsledná hodnota je vyjadrená ako ekvivalentné množstvo Troloxu ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Rovnice pre výpočet antioxidačnej aktivity pomocou nameranej absorpcie a percentuálneho zhasania radikálu je možné vidieť v kapitole 4.2.1. Výsledná hodnota antioxidačnej aktivity extraktu sušeného kvetu *E. purpurea* je  $507,5 \pm 6,90 \text{ mg}_{\text{Trolox}} \cdot \text{l}^{-1}$ .

V literatúre sa pre stanovovanie celkovej koncentrácie polyfenolov najčastejšie používa metóda Folin-Ciocalteu. V práci Pires a kol. [35] bola dosiahnutá koncentrácia polyfenolov  $229,22 \pm 4,38 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{l}^{-1}$  v čerstvej rastline. V prípade analýzy sušeného materiálu bola koncentrácia iba  $49,26 \pm 1,34 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{l}^{-1}$  s použitím 80% etanolu ako rozpúšťadla, čo mohlo mať za príčinu nižšiu stanovenú hodnotu ako v tejto práci. Antioxidačná aktivita *Echinacej purpurej* je veľmi pravdepodobne spojená s vysokým obsahom fenolických látok.

Tabuľka 14 Antioxidačná aktivita a obsah fenolických látok optimálneho extraktu

<b>Antioxidačná aktivita</b>	
Absorbancia [-]	$0,609 \pm 0,008$
Koncentrácia [ $\text{mg}_T \cdot \text{l}^{-1}$ ]	$507,50 \pm 6,898$
% zhasanie radikálu	$95,45 \pm 1,297$
<b>Obsah fenolických látok</b>	
Absorbancia [-]	$0,988 \pm 0,010$
Koncentrácia [ $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{l}^{-1}$ ]	$365,177 \pm 3,510$

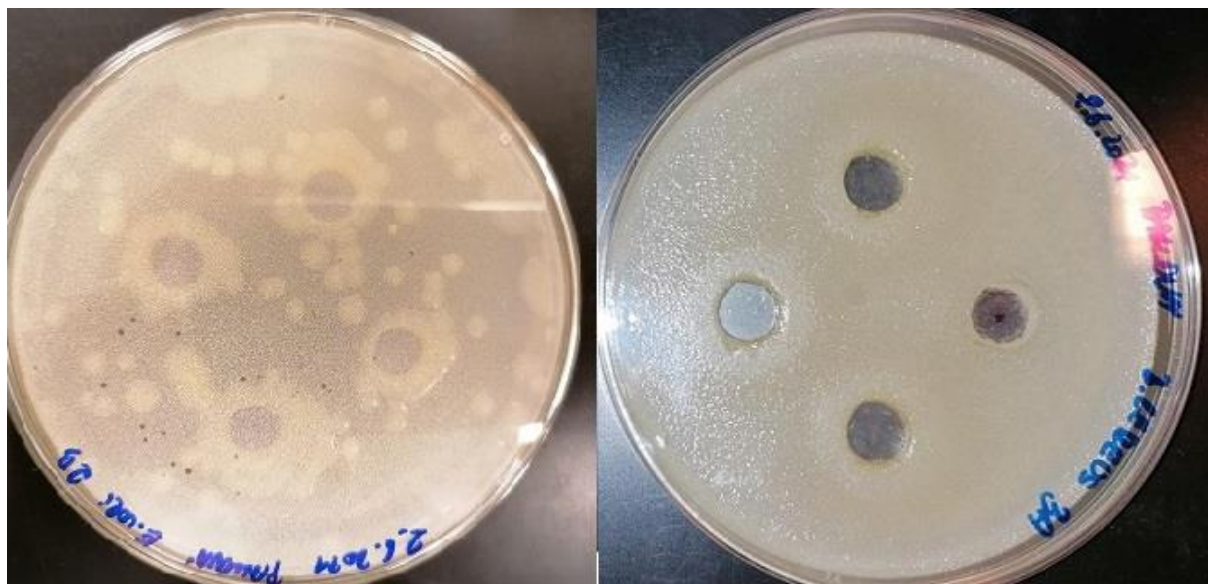
#### 4.2.2 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity

Overenie antimikrobiálnej aktivity optimálneho extraktu bolo vykonané difúznou jamkovou metódou a bol sledovaný potenciálny inhibičný účinok extraktu voči vybraným mikroorganizmom.

Antimikrobiálne vlastnosti *Echinacej purpurovej* sú spojené s vysokým obsahom fenolických látok. Aj napriek stanovenému značnému množstvu v optimálnom extrakte, neboli

prejavené antimikrobiálne vlastnosti rastliny. Je možné tvrdiť, na základe výsledkov experimentu, že testovaný extrakt nemal v danej koncentrácii a objeme žiaden inhibičný účinok voči baktériám *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* a kvasinke *Candida glabrata*. V prípade baktérie *Bacillus cereus* bola detegovaná difúzia extraktu do agaru, ale bez pozorovania inhibície rastu. Rast *Escherichia coli* bol dokonca podporený, čo sa prejavilo vytvorením rastových zón v okolí vyvŕtaných jamiek. Výsledky sú je možné vidieť na Obrázku 14, Obrázku 15.

V dostupnej literatúre sú opísané účinky *E. purpurey* voči *E. coli* aj *B. subtilis*. V práci Stanisavljevic a kol [49] boli preukázané antimikrobiálne vlastnosti extraktu (v koncentrácii  $20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) z *E. purpurey* proti *E. coli* (11,2 mm) aj proti *B. subtilis* (10,9 mm). V práci Hassana a kol. [48] bolo zistené, že metanolový extrakt dokázal v koncentrácii  $0,03 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  inhibovať rast *E. coli*. Pre porovnanie inhibície extraktu voči kvasinke *C. glabrata* neboli nájdené žiadne zdroje, v ktorých by boli skúmané antimikrobiálne vlastnosti *E. purpurey* s touto kvasinkou.



Obrázok 14 Ukážka pozorovania antimikrobiálnej aktivity optimálneho extraktu; zľava - *E. coli*, *Bacillus cereus*





Obrázok 15 Ukážka pozorovania antimikrobiálnej aktivity optimálneho extraktu voči *Candide glabrata*

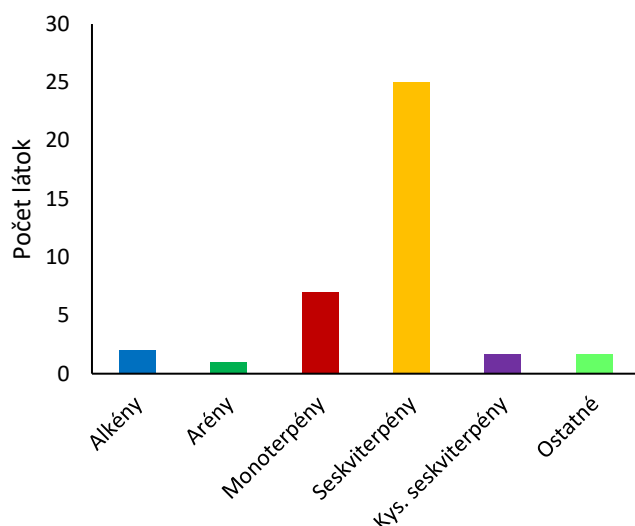
#### 4.2.3 Stanovenie aromatických látok

Vzorky optimalizovaného extraktu boli analyzované pomocou metódy HS-SPME-GC-MS pre identifikáciu a semikvantifikáciu prítomných prchavých látok. Identifikácia prebehla na základe porovnávania hmotnostných spektier s dostupnou knihovňou spektier.

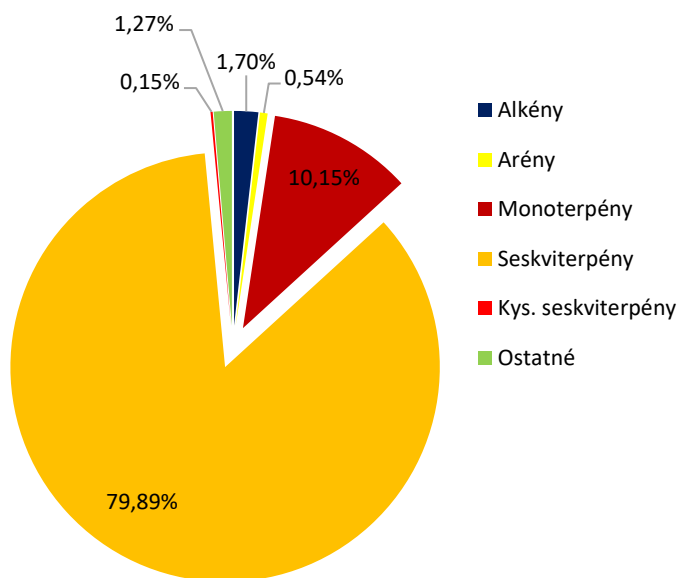
V Tabuľke 15 je uvedený prehľad identifikovaných látok spolu s ich chemickým zaradením. Táto tabuľka bola zostavená z hodnôt priemeru retenčného času a plochy píkov z troch meraní. Ich percentuálne zastúpenie je vyjadrené na základe plôch píkov vzt'ahom: plocha jedného píku k súčtu plôch všetkých píkov v percentách.

Celkovo bolo v pripravených extraktoch identifikovaných 39 zlúčenín, čo činí 93,69 % z celkového množstva identifikovaných látok, pričom neboli započítané látky so stopovým množstvom. Prchavé látky boli rozdelené do nasledujúcich skupín: alkény, arény, monoterpény, seskviterpény, kyslíkaté seskviterpény a ostatné.

Seskviterpény boli hlavnou skupinou identifikovanou v extrakte z kvetu *E. purpurea* a zároveň predstavovali najväčší podiel z celkového obsahu (79,89 %). Celkovo bolo identifikovaných 25 seskviterpénov. Druhou najzastúpenejšou skupinou boli monoterpény (10,15 %) s počtom látok 7. Ostatné skupiny aromatických látok sa vyskytovali ako minoritné zložky. Jednotlivé počty látok boli: 2 pre alkény, 1 pre arény, 2 pre kyslíkaté seskviterpény a 2 pre ostatné. Grafické porovnanie počtu látok je možné vidieť v Grafe 15 a percentuálne vyjadrenie obsahu je možné vidieť v Grafe 16.



Graf 15 Porovnanie počtu identifikovaných látok jednotlivých skupín v optimálnom extrakte



Graf 16 Koláčový graf percentuálneho zastúpenia jednotlivých skupín v optimálnom extrakte

Najväčší obsah bol zaznamenaný pre karyofylén (19,15 %), ktorý predstavoval hlavnú zlúčeninu zo seskviterpénov. Z monoterpénov bol identifikovaný s najväčším zastúpením  $\alpha$ -felandrén v 4,46 %. Okrem karyofylénu boli ešte v extrakte nájdené vo vyššom množstve látky ako  $\gamma$ -muuroolén (12,22 %), kadina-1(10),4-dién (8,24 %) a D-germacrén (7,46 %).

V porovnaní s literatúrou boli dosiahnuté rovnaké výsledky, v ktorých boli určené seskviterpény ako hlavná skupina nachádzajúca sa v *E. purpuree*. V práci Mazza a kol. [20] identifikovali v kvete *E. purpuree* 83 terpénov a druhou najzastúpanejšiu skupinou boli aldehydy, ktoré v optimalizovanom extrakte tejto práce neboli detegované. V práci Mirjalili a kol. [22] identifikovali v kvete 36 aromatických látok, čo približne odpovedá výsledkom tejto práce. Obdobné hodnoty boli i v obsahu seskviterpénov (70,9 %). Hlavnou zlúčeninou bol germacrén D (57 %), ktorý ale v tejto práci bol až štvrtým najzastúpanejším. Obsah

karyofylénu bol zaznamenaný iba v obsahu 4,6 %, čo je značný rozdiel oproti výsledkom tejto práce.

Tabuľka 15 Identifikované zlúčeniny spolu so zaradením a percentuálnym zastúpením

RT	Zlúčenina	Skupina	Percentá [%]	Referencie
5,59	$\alpha$ -Pinén	Monoterpén	2,63	[24, 22, 26, 20, 27, 28]
6,53	Kampfén	Monoterpén	0,43	[20, 24, 28]
7,34	$\beta$ -Pinén	Monoterpén	1,28	[20, 22, 24, 26, 28]
7,80	Tuja-2,4(10)-dién	Monoterpén	0,29	-
8,89	$\alpha$ -Felandrén	Monoterpén	4,46	[22, 24, 26, 28]
9,80	Limonén	Monoterpén	0,38	[20, 24, 26, 28]
11,90	m-Cymén	Monoterpén	2,96	-
12,04	1,2-Dietylbenzén	Arény	0,54	-
16,64	$\gamma$ -Gurjunén	Seskviterpény	0,12	-
16,74	$\alpha$ -Kubebén	Seskviterpény	0,67	[24, 28]
17,05	2,8,8-Trimetyl-4-metylén-2-vinylbicyklo[5,2,0]nonán	Ostatné	0,78	-
17,44	Ylangén	Seskviterpény	1,36	[27]
17,68	Kopaén	Seskviterpény	2,76	[22, 26, 27, 28]
18,82	$\alpha$ -Isokomén	Seskviterpény	2,36	-
18,83	9-Eikosén	Alkény	1,41	-
19,48	1,13-Tetradecadién	Alkény	1,84	-
19,99	trans- $\alpha$ -Bergamotén	Seskviterpény	0,81	[22, 26, 27]
20,19	$\beta$ -Copaene	Seskviterpény	1,99	[27]
20,38	Karyofylén	Seskviterpény	19,1	[22, 24, 26, 27, 28]
20,78	3-Amino-2-metyl-3-(4-metylfenyl)-1-fenyl-1-propánol	Ostatné	0,73	-
21,37	Kadina-3,5-dién	Seskviterpény	1,32	-
21,84	Kadina-1(6),4-dién	Seskviterpény	0,98	-
22,12	Humulén	Seskviterpény	4,43	[22, 24, 26, 27, 28]
22,54	$\gamma$ -Muuroolén	Seskviterpény	12,22	[24]
23,04	D-Germacrén	Seskviterpény	7,46	[22, 24, 26, 27, 28]
23,28	$\beta$ -Selinén	Seskviterpény	1,01	-
23,37	$\alpha$ -Muuroolén	Seskviterpény	4,32	[26, 27, 28]
24,13	Kadina-1(10),4-dién	Seskviterpény	8,24	-
24,19	$\gamma$ -Kadinén	Seskviterpény	2,23	[22, 26, 27]
24,46	$\alpha$ -Kurkumén	Seskviterpény	3,05	[22, 26]
24,70	Kubenén	Seskviterpény	2,13	[24, 26, 27, 28]
24,91	$\alpha$ -Kadinén	Seskviterpény	4,27	[28]
25,83	cis-Kalamenén	Seskviterpény	1,53	[28]
27,65	$\alpha$ -Kalacorene	Seskviterpény	1,27	-

Tabuľka 16 Identifikované zlučieniny spolu so zaradením a percentuálnym zastúpením – pokračovanie

<b>RT</b>	<b>Zlučienina</b>	<b>Skupina</b>	<b>Percentá [%]</b>	<b>Referencie</b>
28,07	Globulol	Kyslíkové seskviterpény	0,15	[22, 26]
29,59	Salvial-4(14)-én-1-ón	Seskviterpény	0,33	-
30,38	Karyofylénol	Kyslíkové seskviterpény	0,05	-
30,59	$\alpha$ -Korocalén	Seskviterpény	0,17	-
33,72	Kadalén	Seskviterpény	0,32	-

## 5 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo vytvoriť optimálny extrakčný systém pre získanie biologicky aktívnych látok zo sušených kvetov *Echinaceae purpureae*. Vyhodnotenie sledovaných parametrov prebiehalo na základe obsahu celkových fenolických látok a aromatických látok.

Ako prvá bola vykonaná optimalizácia typu použitého rozpúšťadla. Testovanými hodnotami boli destilovaná voda, 40% a 80% roztok etanolu. Ako najlepšie rozpúšťadlo bol stanovený 40% etanol. Ďalším parametrom bola navážka vzorky. Množstvo rastlinného materiálu bolo použité v pomere 1:3,33, 1:5, 1:10 k rozpúšťadlu. Pomer 1:5 bol vyhodnotený ako najlepší, predovšetkým kvôli lepšiemu prestupu rozpúšťadla materiálom. Následne bola hodnotená doba (20 minút, 40 minút, 60 minút) a teplota (20°C – laboratórna, 40°C a 60°C) extrakcie. Najvyššie hodnoty fenolických a aromatických látok boli dosiahnuté pre maceráciu v čase 60 minút a pri teplote 60°C.

Následne bol pripravený extrakt podľa vybraných parametrov, ktorý bol skúmaný na obsah polyfenolov, antioxidačnú aktivitu a obsah a počet aromatických látok.

Najprv prebehlo stanovenie obsahu polyfenolických látok pomocou metódy s Folin-Ciocalteuovým činidlom. Koncentrácia bola vyjadrená ako ekvivalent kyseliny gallovej a činila  $365,18 \pm 3,51$  [ $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{l}^{-1}$ ]. Antioxidačná aktivita bola stanovená pomocou metódy TEAC, ktorá využíva schopnosť látky zhasť kation-radikál. Antioxidačná aktivita bola vyjadrená ako ekvivalent štandardu (Troloxu) -  $507,50 \pm 6,89$  [ $\text{mg}_{\text{T}} \cdot \text{l}^{-1}$ ].

Antimikrobiálny účinok voči baktériám *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* a kvasinke *Candida glabrata* bol zisťovaný pomocou jamkovej difúznej metódy. Vzorky etanolového extraktu nevykazovali žiadny inhibičný účinok voči ani jednému z použitých mikroorganizmov. V prípade *E. coli* bol naopak zaznamenaný zvýšený rast v okolí jamiek s extraktami, čo nasvedčuje, že boli prítomné látky, ktoré podporovali rast mikroorganizmu.

Poslednou analýzou bolo semikvantitatívne stanovovanie aromatických látok pomocou metódy mikroextrakcie tuhou fázou v spojení s plynovou chromatografiou a hmotnostnou detekciou. Celkovo bolo identifikovaných 39 zlúčenín, z toho seskviterpény predstavovali majoritnú zložku (79,89 %). Podľa obsahu je možné zoradiť skupiny látok zostupne: seskviterpény > monoterpény > alkány > ostatné > arény > kyslíkaté seskviterpény. Toto poradie, ale nie je v súlade s počtom identifikovaných látok, v ktorom arény vystupujú ako posledná skupina. V extrakte bol najzastúpenejšou aromatickou látkou karyofylén (19,15 %). Z monoterpénov najvyššie množstvo dosahoval  $\alpha$ -felandrén (4,46 %).

Výsledky získané v tejto práci by mohli predstavovať základ pre budúce experimenty, v ktorých by sa optimalizovali ďalšie faktory v rámci extrakčného systému, ako napr. využitie miešania počas extrakcie alebo veľkosť častíc materiálu. Zároveň by sa upresnili už stanovované podmienky pre získanie bioaktívnych látok v kvete *Echinaceae purpureae*.

Dá sa taktiež povedať, že pripravený extrakt *Echinaceae* má potenciál pre prípadné využitie v potravinárstve ako prírodný zdroj nutrične i sensoricky cenných látok, čo bolo preukázané i jeho úspešnou aplikáciou do vzoriek syrov a cukroviniek.

## 6 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] KINDSCHER, Kelly, ed. *Echinacea* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016 [cit. 2021-04-22]. ISBN 978-3-319-18155-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-18156-1
- [2] KELLER, H.W. The genus *Echinacea* (Asteraceae): Floral, stem, and petiole morphology. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas* [online]. Botanical Research Institute of Texas, 2014, 8(1), 87-126 [cit. 2021-04-22]. ISSN 19345259.
- [3] MCKEOWN, Kathleen A. A Review of the Taxonomy of the Genus *Echinacea* [online]. 1999 [cit. 2021-5-12]
- [4] MILLER, Sandra Carol a He-Ci YU. *Echinacea: the genus Echinacea*. Boca Raton: CRC Press, c2004. ISBN 9780415288286
- [5] Removal of *Echinacea tennesseensis* (Tennessee purple coneflower) from the federal list of endangered and threatened plants [online]. , U.S. Fish and Wildlife Service. *Federal Register*, 2011 [cit. 2021-6-14]. Dostupné z: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2011-08-03/pdf/2011-19674.pdf>
- [6] *Echinacea pallida* [online]. [cit. 2021-6-20]. Dostupné z: [https://appeltern.nl/nl/tuinadvies/plantenencyclopedie/echinacea\\_pallida\\_-\\_egelzonnehoed\\_zonnehoed](https://appeltern.nl/nl/tuinadvies/plantenencyclopedie/echinacea_pallida_-_egelzonnehoed_zonnehoed)
- [7] *Echinacea angustifolia* DC. [online]. [cit. 2021-6-20]. Dostupné z: <https://swbiodiversity.org/seinet/taxa/index.php?taxon=18155&clid=69>
- [8] *Echinacea purpurea* [online]. [cit. 2021-5-20]. Dostupné z: <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/echinacea-purpurea/>
- [9] Integrated Taxonomic Information System [online]. [cit. 2021-4-14]. Dostupné z: [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=37281#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=37281#null)
- [10] Pestovanie echinacey [online]. [cit. 2021-5-12]. Dostupné z: <http://www.echinacea.sk/pestovanie-echinacey/>
- [11] BRUNI, Renato, Virginia BRIGHENTI, Lindsay K. CAESAR, Davide BERTELLI, Nadja B. CECH a Federica PELLATI. Analytical methods for the study of bioactive compounds from medicinally used *Echinacea* species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2018, 160, 443-477 [cit. 2021-04-22]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2018.07.044
- [12] BARNES, Joanne, Linda A ANDERSON, Simon GIBBONS a J David PHILLIPSON. *Echinacea* species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties†. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2005, 57(8), 929-954 [cit. 2021-04-22]. ISSN 0022-3573. Dostupné z: doi:10.1211/0022357056127

- [13] PELLATI, Federica, Stefania BENVENUTI, Lara MAGRO, Michele MELEGARI a Fabrizia SORAGNI. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2004, 35(2), 289-301 [cit. 2021-7-14]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/S0731-7085(03)00645-9
- [14] Chicoric Acid [online]. [cit. 2021-6-14]. Dostupné z: <http://www.caymanchem.com/product/24960>
- [15] LIN, Sheng-Dun, Jih-Min SUNG a Chung-Li CHEN. Effect of drying and storage conditions on caffeic acid derivatives and total phenolics of *Echinacea Purpurea* grown in Taiwan. *Food Chemistry* [online]. 2011, 125(1), 226-231 [cit. 2021-6-10]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2010.09.006
- [16] KURKIN, V. A., A. S. AKUSHSKAYA, E. V. AVDEEVA, E. I. VELMYAIKINA, E. D. DAEVA a V. I. KADENTSEV. Flavonoids from *Echinacea purpurea*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* [online]. 2011, 37(7), 905-906 [cit. 2021-7-24]. ISSN 1068-1620. Dostupné z: doi:10.1134/S1068162011070120
- [17] MISTRÍKOVÁ, INGRID a ŠTEFÁNIA VAVERKOVÁ. *Echinacea* – chemical composition, immunostimulatory activities and uses. *Thaiszia – J. Bot.* 16. 2006, , 11-26. ISSN 1210-0420.
- [18] HUDAIB, Mohammad, Roberto GOTTI, Romeo POMPONIO a Vanni CAVRINI. Recovery evaluation of lipophilic markers from *Echinacea purpurea* roots applying microwave-assisted solvent extraction versus conventional methods. *Journal of Separation Science* [online]. 2003, 26(1-2), 97-104 [cit. 2021-6-14]. ISSN 1615-9306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200390021
- [19] GLAVAČ, Nina, Iztok KOŠIR, Janko RODE a Samo KREFT. Optimization and use of a spectrophotometric method for determining polysaccharides in *Echinacea purpurea*. *Open Life Sciences* [online]. 2012, 7(1), 126-131 [cit. 2021-7-22]. ISSN 2391-5412. Dostupné z: doi:10.2478/s11535-011-0091-z
- [20] MAZZA, G. a T. COTTRELL. Volatile Components of Roots, Stems, Leaves, and Flowers of *Echinacea* Species †. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1999, 47(8), 3081-3085 [cit. 2021-5-27]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf981117y
- [21] A-Phellandrene [online]. [cit. 2021-6-19]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7180.html>
- [22] MIRJALILI, Mohammad Hossein, Peyman SALEHI, Hassanali Naghdi BADI a Ali SONBOLI. Volatile constituents of the flowerheads of three *Echinacea* species cultivated in Iran. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. 2006, 21(2), 355-358 [cit. 2021-5-24]. ISSN 0882-5734. Dostupné z: doi:10.1002/ffj.1657
- [23] Germacrene D [online]. [cit. 2021-5-19]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.28288426.html>

- [24] NYALAMBISA, M., I.A. OYEMITAN, R. MATEWU, O.O. OYEDEJI, O.S. OLUWAFEMI, S.P. SONGCA, B.N. NKEH-CHUNGAG a A.O. OYEDEJI. Volatile constituents and biological activities of the leaf and root of Echinacea species from South Africa. Saudi Pharmaceutical Journal [online]. 2017, 25(3), 381-386 [cit. 2021-5-24]. ISSN 13190164. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsps.2016.09.010
- [25] LEPOJEVIĆ, Ivana, Žika LEPOJEVIĆ, Branimir PAVLIĆ, Mihailo RISTIĆ, Zoran ZEKOVIĆ a Senka VIDOVIĆ. Solid-liquid and high-pressure (liquid and supercritical carbon dioxide) extraction of Echinacea purpurea L. The Journal of Supercritical Fluids [online]. 2017, 119, 159-168 [cit. 2021-5-24]. ISSN 08968446. Dostupné z: doi:10.1016/j.supflu.2016.09.002
- [26] KAYA, Meltem, Melek MERDIVAN, Paniz TASHAKKORI, Pelin ERDEM a Jared L. ANDERSON. Analysis of Echinacea flower volatile constituents by HS-SPME-GC/MS using laboratory-prepared and commercial SPME fibers. Journal of Essential Oil Research [online]. 2019, 31(2), 91-98 [cit. 2021-5-24]. ISSN 1041-2905. Dostupné z: doi:10.1080/10412905.2018.1545707
- [27] AHMADI, Fatemeh, Abbas SAMADI, Ebrahim SEPEHR, Amir RAHIMI a Sergey SHABALA. Optimizing hydroponic culture media and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ratio for improving essential oil compositions of purple coneflower (Echinacea purpurea L.). Scientific Reports [online]. 2021, 11(1) [cit. 2021-6-25]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-87391-9
- [28] THAPPA, R. K., S. K. BAKSHI, P. L. DHAR, S. G. AGARWAL, S. KITCHLU, M. K. KAUL a K. A. SURJ. Significance of changed climatic factors on essential oil composition of Echinacea purpurea under subtropical conditions. Flavour and Fragrance Journal [online]. 2004, 19(5), 452-454 [cit. 2021-5-24]. ISSN 0882-5734. Dostupné z: doi:10.1002/ffj.1352
- [29] CÖMERT, Ezgi Doğan a Vural GÖKMEN. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. Food Research International [online]. 2018, 105, 76-93 [cit. 2021-04-18]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2017.10.056
- [30] OROIAN, Mircea a Isabel ESCRICHE. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. Food Research International [online]. 2015, 74, 10-36 [cit. 2021-04-18]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2015.04.018
- [31] FRANKEL, Edwin N. a John W. FINLEY. How To Standardize the Multiplicity of Methods To Evaluate Natural Antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2008, 56(13), 4901-4908 [cit. 2021-04-16]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf800336p
- [32] JEREMY ASTIER. Interplay between NO Signalling, ROS, and the Antioxidant System in Plants. Frontiers Media, 2017. ISBN 9782889450695.
- [33] HUANG, Dejian, Boxin OU a Ronald L. PRIOR. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2005, 53(6), 1841-1856 [cit. 2021-04-22]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf030723c



- [34] LUCARINI, Marco a Gian Franco PEDULLI. Free radical intermediates in the inhibition of the autoxidation reaction. *Chemical Society Reviews* [online]. 2010, 39(6) [cit. 2021-6-20]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/b901838g
- [35] PIRES, Cristiana, Natália MARTINS, Ana Maria CARVALHO, Lillian BARROS a Isabel C.F.R. FERREIRA. Phytopharmacologic preparations as predictors of plant bioactivity: A particular approach to *Echinacea purpurea* (L.) Moench antioxidant properties. *Nutrition* [online]. 2016, 32(7-8), 834-839 [cit. 2021-04-16]. ISSN 08999007. Dostupné z: doi:10.1016/j.nut.2016.01.005
- [36] TSAI, Yu-Ling, Shiow-Ying CHIOU, Kung-Chi CHAN, Jih-Min SUNG a Sheng-Dun LIN. Caffeic acid derivatives, total phenols, antioxidant and antimutagenic activities of *Echinacea purpurea* flower extracts. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2012, 46(1), 169-176 [cit. 2021-04-16]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2011.09.026
- [37] JUKIĆ, Huska, S. HABEŠ, Asmir ALDŽIĆ, K. DURGO a I. KOSALEC. Antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds of the extracts of *Echinacea purpurea* (L.) [online]. 2015 [cit. 2021-6-20]. Dostupné z: <http://hemija.pmf.unsa.ba/glasnik/files/Issue%2044/5-43-52-Juki.pdf>
- [38] ERENLER, Ramazan, Isa TELCI, Musa ULUTAS, Ibrahim DEMIRTAS, Fatih GUL, Mahfuz ELMASTAS a Omer KAYIR. Chemical Constituents, Quantitative Analysis and Antioxidant Activities of *Echinacea purpurea* (L.) Moench and *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. *Journal of Food Biochemistry* [online]. 2015, 39(5), 622-630 [cit. 2021-5-20]. ISSN 01458884. Dostupné z: doi:10.1111/jfbc.12168
- [39] THYGESEN, Line, Johanna THULIN, Alan MORTENSEN, Leif H. SKIBSTED a Per MOLGAARD. Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea*, alone and in combination. *Food Chemistry* [online]. 2007, 101(1), 74-81 [cit. 2021-04-16]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2005.11.048
- [40] HU, C, D D KITTS a C HU. Studies on the antioxidant activity of *Echinacea* root extract. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2000, 48(5), 1466-1472 [cit. 2021-04-19]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf990677+
- [41] MOHAMED SHARIF, Khawla Omran, Enis Fuat TUFEKCI, Buket USTA OGLU, Yasemin Celik ALTUNOGLU, Gokhan ZENGIN, E.J. LLORENT-MARTÍNEZ, Kerim GUNEY a Mehmet Cengiz BALOGLU. Anticancer and biological properties of leaf and flower extracts of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Food Bioscience* [online]. 2021, 41 [cit. 2021-04-16]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2021.101005
- [42] GÜNEŞ, Adem, Şaban KORDALI, Metin TURAN a Ayşe USANMAZ BOZHÜYÜK. Determination of antioxidant enzyme activity and phenolic contents of some species of the Asteraceae family from medicinal plants. *Industrial Crops and Products* [online]. 2019, 137, 208-213 [cit. 2021-4-20]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2019.05.042

- [43] WOJDYLO, A, J OSZMIANSKI a R CZEMERYYS. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* [online]. 2007, 105(3), 940-949 [cit. 2021-7-20]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.038
- [44] GEORGIEVA, Silviya, Valentina CHRISTOVABAGDASSARIAN a Maria ATANASSOVA. Comparative evaluation of the polyphenol composition and antioxidant capacity of propolis and *Echinacea purpurea*. *Journal of Experimental and Integrative Medicine* [online]. 2014, 4(1) [cit. 2021-7-20]. ISSN 1309-4572. Dostupné z: doi:10.5455/jeim.050913.or.089
- [45] ARSLAN BURNAZ, Nesibe, Murat KÜÇÜK a Zeynep AKAR. An on-line HPLC system for detection of antioxidant compounds in some plant extracts by comparing three different methods. *Journal of Chromatography B* [online]. 2017, 1052, 66-72 [cit. 2021-6-20]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2017.03.003
- [46] FAN, Xuotong, Helen NGO a Changqing WU. Natural and Bio-based Antimicrobials: A Review. FAN, Xuotong, Helen NGO a Changqing WU, ed. *Natural and Bio-Based Antimicrobials for Food Applications* [online]. Washington, DC: American Chemical Society, 2018, 2018-01-04, s. 1-24 [cit. 2021-04-22]. ACS Symposium Series. ISBN 9780841233058. Dostupné z: doi:10.1021/bk-2018-1287.ch001
- [47] SHARMA, S.M., M. ANDERSON, S.R. SCHOOP a J.B. HUDSON. Bactericidal and anti-inflammatory properties of a standardized *Echinacea* extract (Echinaforce®): Dual actions against respiratory bacteria. *Phytomedicine* [online]. 2010, 17(8-9), 563-568 [cit. 2021-5-21]. ISSN 09447113. Dostupné z: doi:10.1016/j.phymed.2009.10.022
- [48] HASSAN, R., Safaa ALI, Azza MOHAMED a Sahar HAMED. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Echinacea purpurea* L. Extracts. الأنشطة المضادة للأكسدة والانتشطة المضادة للبكتيريا في مستخلصات نبات القنفذية الأرجوانية. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology* [online]. 2020, 11(10), 279-283 [cit. 2021-04-23]. ISSN 2090-3707. Dostupné z: doi:10.21608/jacb.2020.123553
- [49] STANISAVLJEVIĆ, Ivana, Saša STOJIČEVIĆ, Dragan VELIČKOVIĆ, Vlada VELJKOVIĆ a Miodrag LAZIĆ. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Echinacea* (*Echinacea purpurea* L.) Extracts Obtained by Classical and Ultrasound Extraction. *Chinese Journal of Chemical Engineering* [online]. 2009, 17(3), 478-483 [cit. 2021-04-23]. ISSN 10049541. Dostupné z: doi:10.1016/S1004-9541(08)60234-7
- [50] COSS, Emily, Carmel KEALEY, Damien BRADY a Patrick WALSH. A laboratory investigation of the antimicrobial activity of a selection of western phytomedicinal tinctures. *European Journal of Integrative Medicine* [online]. 2018, 19, 80-83 [cit. 2021-5-20]. ISSN 18763820. Dostupné z: doi:10.1016/j.eujim.2018.02.008
- [51] RADY, Mohamed, Ahmed ABOUL-ENEIN a Mona IBRAHIM. Active compounds and biological activity of in vitro cultures of some *Echinacea purpurea* varieties. *Bulletin of the National Research Centre* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018, 42(1), 1-12 [cit. 2021-04-23]. Dostupné z: doi:10.1186/s42269-018-0018-1

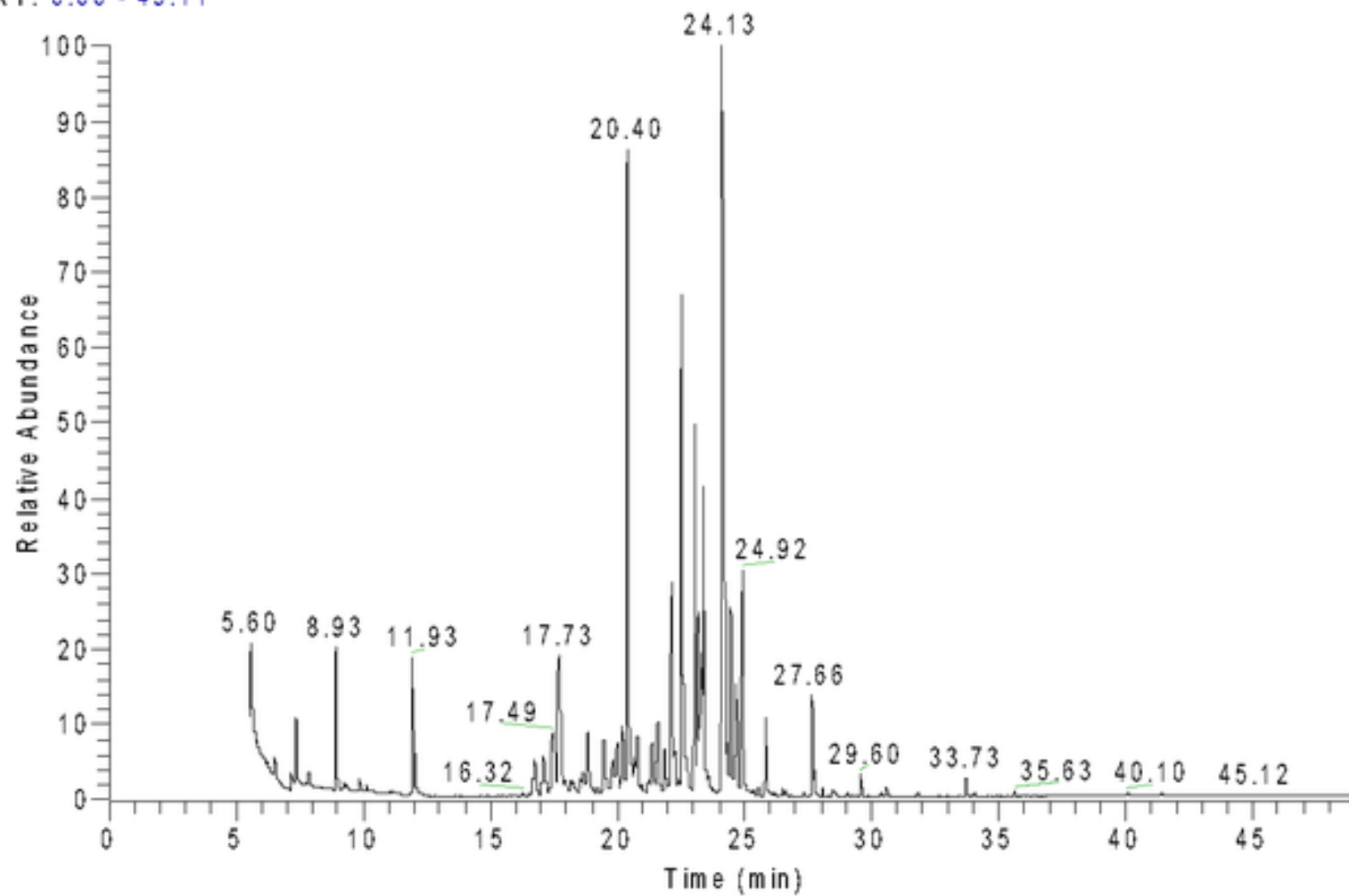
- [52] ZAZHARSKYI, V. V., P. O. DAVYDENKO, O. M. KULISHENKO, I. V. BOROVİK a V. V. BRYGADYRENKO. Antimicrobial activity of 50 plant extracts. *Biosystems Diversity* [online]. 2019, 27(2), 163-169 [cit. 2021-04-23]. ISSN 2520-2529. Dostupné z: doi:10.15421/011922
- [53] WANG, Lijun a Curtis L. WELLER. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2006, 17(6), 300-312 [cit. 2021-7-18]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2005.12.004
- [54] AZMIR, J., I.S.M. ZAIDUL, M.M. RAHMAN, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* [online]. 2013, 117(4), 426-436 [cit. 2021-04-22]. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
- [55] ALARA, Oluwaseun Ruth, Nour Hamid ABDURAHMAN a Chinonso Ishamel UKAEGBU. Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science* [online]. 2021, 4, 200-214 [cit. 2021-7-24]. ISSN 26659271. Dostupné z: doi:10.1016/j.crf.2021.03.011
- [56] BARBA, Francisco J., Zhenzhou ZHU, Mohamed KOUBAA, Anderson S. SANT'ANA a Vibeke ORLIEN. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2016, 49, 96-109 [cit. 2021-7-24]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2016.01.006
- [57] LEKAR', A. V., S. N. BORISENKO, O. V. FILONOVA, E. V. VETROVA, E. V. MAKSIMENKO, N. I. BORISENKO a V. I. MINKIN. Extraction of caftaric and cichoric acids from *Echinacea purpurea* L. in subcritical water. *Russian Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2013, 7(8), 968-975 [cit. 2021-5-20]. ISSN 1990-7931. Dostupné z: doi:10.1134/S199079311308006X
- [58] COELHO, Joana, Lillian BARROS, Maria Inês DIAS, et al. *Echinacea purpurea* (L.) Moench: Chemical Characterization and Bioactivity of Its Extracts and Fractions. *Pharmaceuticals* [online]. 2020, 13(6) [cit. 2021-04-23]. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph13060125
- [59] WU, C.H., H.N. MURTHY, E.J. HAHN, H.L LEE a K.Y. PAEK. Efficient extraction of caffeic acid derivatives from adventitious roots of *Echinacea purpurea*/I. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2008, 26(4), 254-258 [cit. 2021-5-20]. ISSN 12121800. Dostupné z: doi:10.17221/1120-CJFS
- [60] YILDIZ, Ece, Dilan KARABULUT a Ozlem YESIL-CELIK TAS. A bioactivity based comparison of *Echinacea purpurea* extracts obtained by various processes. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2014, 89, 8-15 [cit. 2021-7-24]. ISSN 08968446. Dostupné z: doi:10.1016/j.supflu.2014.02.005
- [61] APAK, Reşat, Mustafa ÖZYÜREK, Kubilay GÜÇLÜ a Esra ÇAPAN OĞLU. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry [online]. 2016, 64(5), 997-1027 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.5b04739
- [62] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad Koraichi IBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis [online]. 2016, 6(2), 71-79 [cit. 2021-04-22]. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- [63] TAN, Joash Ban Lee a Yau Yan LIM. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. Food Chemistry [online]. 2015, 172, 814-822 [cit. 2021-04-22]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.141
- [64] YANG, Cui, Juan WANG a Donghao LI. Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review. Analytica Chimica Acta [online]. 2013, 799, 8-22 [cit. 2021-6-18]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2013.07.069
- [65] Sample Preparation: Headspace SPME [online]. [cit. 2021-5-24]. Dostupné z: [http://2014.igem.org/Team:Valencia\\_UPV/Project/modules/methodology/sample\\_preparation](http://2014.igem.org/Team:Valencia_UPV/Project/modules/methodology/sample_preparation)
- [66] AL-RUBAYE, Abeer Fauzi, Imad Hadi HAMEED a Mohanad Jawad KADHIM. A Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants. INTERNATIONAL JOURNAL OF TOXICOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL RESEARCH [online]. 2017, 9(01) [cit. 2021-6-19]. ISSN 0975-5160. Dostupné z: doi:10.25258/ijtpr.v9i01.9042
- [67] HIMABINDU, M.R. Lakshmi, S. Angala PARAMESWARI a Chakka GOPINATH. A Review on GC-MS and Method Development and Validation. International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance. 4(3), 42-51. ISSN 0975 9506

## **7 ZOZNAM PRÍLOH**

Príloha 1 Ukážka chromatogramu aromatických látok v optimálnom extrakte

RT: 0.00 - 49.11



NL:  
7.76E8  
TIC MS  
EOPT3

Priloha 1 Ukážka chromatogramu aromatických látok v optimálnom extrakte