



# 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

# ZISK A KOMPLEXNÍ CHARAKTERIZACE EXTRAKTŮ RÝMOVNÍKU (PLECTRANTHUS SPP.)

OBTAINING AND COMPLEX CHARACTERIZATION OF PLECTRANTHUS SPP. EXTRACTS

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Alexandra Boboková

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1423/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Alexandra Boboková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Získ a komplexní charakterizace extraktů rýmovníku (*Plectranthus* spp.)

### Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
  - charakteristika, složení a vlastnosti rýmovníku (*Plectranthus* spp.)
  - účinné látky rýmovníku s antimikrobiálním a antioxidačním potenciálem, jejich význam a možnosti využití v potravinářství a kosmetice
  - těkavé (aromatické) látky rýmovníku
  - možnosti získávání extraktů účinných látek z rostlin
  - možnosti stanovení aromaticky aktivních látek v extraktech z bylin – princip, provedení, přehled aplikací
  - možnosti měření antioxidační aktivity extraktů z bylin – princip, provedení, přehled aplikací
  - možnosti stanovení antimikrobiální aktivity extraktů z bylin – princip, provedení, přehled aplikací
2. Vyzkoušejte různé systémy extrakce/macerace uvedeného rostlinného materiálu pro získání extraktu (esenciálního oleje) s ohledem na max. výtěžnost a optimální složení
3. Získané esenciální oleje charakterizujte z hlediska obsahu účinných látek (antioxidanty, aromatické látky aj.)

### Termín odevzdání diplomové práce: 29.5.2020:

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

-----  
Bc. Alexandra Boboková  
student(ka)

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

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

V Brně dne 31.1.2020

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

## ABSTRAKT

*Plectranthus amboinicus* je rastlina, ktorej sú pripisované mnohé bioaktívne účinky, najviac spájané s obsahom polyfenolických látok. Pre získanie týchto látok a ich následné použitie napríklad v potravinárstve alebo kozmetickom priemysle je nutná ich extrakcia. Boli vyskúšané 3 metódy extrakcie – macerácia, PHWE a PFE extrakcia. Najlepšia z hľadiska obsahu vyextrahovaných celkových polyfenolických látok sa ukázala macerácia, ktorá bola následne optimalizovaná pomocou matematickej štatistickej metódy plánovania experimentu.

Ako optimálne podmienky pre maceráciu boli zistené: teplota 60 °C, rozpúšťadlo 40% etanol, doba 90 minút a pomer navážky a rozpúšťadla 1:10. V takto pripravenom extrakte bol zistený obsah celkových polyfenolov  $0,18 \pm 0,05 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{ml}^{-1}$ , čo je v prepočte  $1,83 \pm 0,53 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  rastliny a antioxidačná aktivita  $148,69 \pm 26,92 \text{ } \mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Percento zhášania radikálu ABTS<sup>•+</sup> v optimálnom extrakte bolo vypočítané na  $30,03 \pm 5,44 \%$ . Ďalej bolo v extrakte identifikovaných 27 prchavých aromatických látok, z ktorých najvýznamnejšie boli: β-selinén (16,67 %), trans-α-bergamotén (14,22 %), karyofylén (14,11 %), 3-karén (8,22 %), α-kopaén (7,55 %), γ-terpinén (6,28 %), humulén (5,87 %), kadina-1(10)-4-dién (5,19 %).

## ABSTRACT

*Plectranthus amboinicus* is a herb that was found to have a lot of bioactive compounds, most of them are polyphenolic compounds. Extraction is necessary to obtain bioactive compounds and to use them subsequently in food or cosmetic industry. Three methods of extraction – maceration, PHWE and PFE, were used in this study. The best yield of extracted polyphenols was observed by maceration. Maceration was, in the next step, optimized using mathematical statistical method of planned experiment (DOE).

The optimal conditions found for extraction were: temperature 60 °C, solvent 40% ethanol, time 90 minutes, solid-solvent ratio 1:10. Total phenolic compounds content in this extract was  $0,18 \pm 0,05 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{ml}^{-1}$ , which means  $1,83 \pm 0,53 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  of plant. The antioxidant activity was  $148,69 \pm 26,92 \text{ } \mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Percentage of radical scavenging activity ABTS<sup>•+</sup> was  $30,03 \pm 5,44 \%$ . Further, 27 of volatile aroma compounds were identified in optimal extract, the most important were: β-selinene (16,67 %), trans-α-bergamotene (14,22 %), caryophyllene (14,11 %), 3-carene (8,22 %), α-copaene (7,55 %), γ-terpinene (6,28 %), humulene (5,87 %), cadina-1(10)-4-diene (5,19 %).

## KLÚČOVÉ SLOVÁ

rýmovník, aromatické látky, antioxidanty, extrakcia, SPME, GC-MS, plánovaný experiment

## KEY WORDS

*Plectranthus* spp., aroma compounds, antioxidants, extraction, SPME, GC-MS, DOE

BOBOKOVÁ, Alexandra. Zisk a komplexní charakterizace extraktů rýmovníku (*Plectranthus spp.*). Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124109>. 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 správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá na komerčné účely len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....  
Bc. Alexandra Boboková

## POĎAKOVANIE

Rada by som sa poďakovala pani doc. Ing. Eve Vítovej, Ph.D. za pomoc, ochotu a pripomienky pri písaní tejto práce. Ďakujem Ing. Lenke Burdějovej, Ph.D z Ústavu analytickej chémie Akadémie vied v Brne za poskytnutie prístroju k meraniu, za ochotu, pomoc, cenné rady a za priateľský prístup. V neposlednom rade ďakujem rodine a blízkym za podporu počas celého štúdia.

## OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická časť.....	9
2.1	Chemické zloženie liečivých rastlín.....	9
2.1.1	Biologicky aktívne látky.....	9
2.1.1.1	Fenolické látky.....	10
2.1.1.2	Terpény.....	13
2.2	Extrakty rastlín.....	14
2.3	Biologické účinky rastlinných látok.....	15
2.3.1	Antioxidanty a antioxidačná aktivita.....	15
2.3.1.1	Mechanizmus pôsobenia antioxidantov.....	16
2.3.2	Antimikrobiálna aktivita.....	18
2.4	<i>Plectranthus</i> spp.....	18
2.4.1	Chemická kompozícia rýmovníku ( <i>Plectranthus amboinicus</i> ).....	20
2.4.1.1	Antioxidačné účinky rýmovníku.....	20
2.4.1.2	Antimikrobiálna aktivita rýmovníku.....	21
2.4.1.3	Aromaticky aktívne látky rýmovníku.....	22
2.4.2	Potenciál čeľade <i>Lamiaceae</i> .....	23
2.5	Používané metódy a experimentálne techniky.....	24
2.5.1	Metódy získavania extraktov.....	24
2.5.1.1	Konvenčné extrakčné metódy.....	24
2.5.1.2	Nekonvenčné extrakčné metódy.....	26
2.5.2	Metódy merania antioxidačnej aktivity.....	29
2.5.2.1	Metóda ORAC – Oxygen Radical Absorbance Capacity.....	29
2.5.2.2	Metóda FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Potential.....	30
2.5.2.3	Metóda TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.....	30
2.5.2.4	DPPH test.....	30
2.5.2.5	Folin-Ciocalteu metóda, stanovenie celkových fenolov.....	30
2.5.3	Molekulová absorpčná spektrometria v oblasti UV-VIS.....	31
2.5.4	Metódy merania antimikrobiálnej aktivity.....	31
2.5.4.1	Agarová difúzna metóda.....	32
2.5.4.2	Dilučná metóda.....	33
2.5.5	Metódy stanovenia aromaticky aktívnych látok v extraktoch z bylín.....	33
2.5.5.1	Mikroextrakcia tuhou fázou.....	33
2.5.5.2	Plynová chromatografia.....	34
3	Experimentálna časť.....	36
3.1	Použité prístroje.....	36
3.2	Použité chemikálie.....	36
3.3	Analyzované vzorky.....	36
3.4	Získavanie extraktov.....	37

3.4.1	Macerácia .....	37
3.4.2	Vysokotlaká extrakcia rozpúšťadlom .....	37
3.4.3	Extrakcia stlačenou kvapalnou horúcou vodou .....	37
3.5	Stanovenie vybraných vlastností extraktu .....	37
3.5.1	Stanovenie koncentrácie celkových polyfenolov .....	37
3.5.2	Stanovenie aromatických látok .....	38
3.5.3	Stanovenie antioxidantnej aktivity získaného extraktu .....	39
3.6	Štatistické spracovanie výsledkov .....	40
4	Výsledky a diskusia .....	41
4.1	Multivariačná optimalizácia extrakcie .....	41
4.2	Získavanie extraktov z rýmovníka maceráciou .....	42
4.2.1	Úvodný skrining vplyvujúcich faktorov .....	42
4.2.1.1	Vplyv navážky rastlinného materiálu na celkový obsah polyfenolov .....	43
4.2.1.2	Vplyv teploty extrakcie/macerácie na celkový obsah polyfenolov .....	44
4.2.1.3	Vplyv rozpúšťadla na celkový obsah polyfenolov .....	46
4.2.1.4	Vplyv doby extrakcie/macerácie na celkový obsah polyfenolov .....	47
4.2.2	Plánovaný experiment .....	49
4.3	Extraktory získavané PFE a PHWE .....	53
4.3.1	Vysokotlaká extrakcia rozpúšťadlom, teplotná závislosť .....	53
4.3.2	Extrakcia stlačenou horúcou vodou, teplotná závislosť .....	55
4.4	Aromatický profil PHWE extraktov z rýmovníka .....	57
4.4.1	Porovnanie počtu zlúčenín identifikovaných v extraktoch .....	57
4.4.2	Porovnanie obsahu zlúčenín identifikovaných v extraktoch .....	59
4.5	Charakterizácia „optimálneho“ extraktu .....	63
4.5.1	Celkový obsah polyfenolov .....	63
4.5.2	Antioxidantná aktivita .....	64
4.5.3	Aromatické látky .....	65
5	Záver .....	68
6	Použitá literatúra .....	70
7	Použité skratky .....	87
8	Zoznam príloh .....	89
9	Prílohy .....	90

# 1 ÚVOD

Do čeľade hluchavkovitých rastlín (*Lamiaceae*) patrí mnoho aromatických a liečivých rastlín, napríklad šalvia, oregano, tymián, bazalka, rozmarín či mäta. Do tejto čeľade patrí aj ďalší, všeobecne menej známy, no významný rod *Plectranthus* obsahujúci viac ako 300 rôznych druhov, mnohé z nich doposiaľ neidentifikované.

Z *Plectranthus* spp. je najviac v Česku známy *Plectranthus amboinicus* pod názvom rýmovník, prípadne na Slovensku známy ako nádchovník, či častejšie mexické oregano. Pestuje sa v domácnostiach ako bylinka pre uvoľnenie dýchacích ciest, ako už samotný názov napovedá. Prospešnosť rýmovníka sa od pradávna využíva vo veľkej miere v ľudovom liečiteľstve, napríklad pri astme, chrípke, bolesti hlavy, teplote, kašli či kožných ochoreniach. Rýmovník má terapeutické a nutričné vlastnosti spojené s prítomnosťou prírodných fytochemických zlúčenín, ktoré sú vysoko cenené vo farmaceutickom priemysle.

Tejto rastline sú pripisované antioxidantné a antivírusové vlastnosti, bioaktívne látky sú predovšetkým účinné ako prevencia proti rôznym ochoreniam, okrem iného aj chronickým či nádorovým ochoreniam. Medzi najvýznamnejšie biologicky aktívne látky, nachádzajúce sa v rýmovníku, patria terpenové zlúčeniny a polyfenolické látky.

Rastlinné extrakty či esenciálne oleje z rýmovníka je možné potenciálne využiť v potravinárskom či kozmetickom priemysle. Hlavnou výhodou priemyselného použitia bylinných extraktov je ich pôvod. V súčasnosti mnohé potravinárske, ale aj kozmetické spoločnosti dbajú na čo najprirodzenejšie zloženie výrobkov s minimálnym obsahom syntetických zlúčenín. Extrakty získané z liečivých rastlín tak môžu v budúcnosti byť využívané nielen ako vonné oleje v aromaterapii (esenciálne oleje), ale napríklad aj ako konzervanty v potravinách (rastlinné extrakty). Prvým takýmto príkladom je v súčasnosti používané potravinárske aditívum – E392 extrakt z rozmarínu (*Rosmarinus officinalis*) ako antioxidantné činidlo.

V súčasnosti sa vedci zameriavajú na izoláciu špecifických bioaktívnych látok *P. amboinicus* a snažia sa preukázať ich farmakologickú dôležitosť. Avšak, chemický profil a akumulácia bioaktívnych látok v rastlinách závisí na viacerých parametroch, hlavne na podmienkach pestovania, geografickej polohe, klíme a na štádiu rastliny v čase zberu. Získanie špecifických bioaktívnych látok závisí aj na metóde extrakcie.

Diplomová práca sa zaoberá optimalizáciou extrakčného procesu rastliny rýmovníku (*Plectranthus amboinicus*) pre maximálny zisk spomenutých bioaktívnych zlúčenín, získaný optimálny extrakt je následne charakterizovaný z pohľadu obsahu polyfenolických a aromatických látok pre prípadné použitie v potravinárskom alebo kozmetickom priemysle. Pre optimalizáciu extrakcie bola vyžitá matematická štatistická metóda plánovania experimentu.



## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

Táto práca je zameraná na možnosti získavania extraktov z rýmovníku (*Plectranthus* spp.) so zachovaním čo najvyššieho množstva nutrične a sensoricky cenných zložiek. V nasledujúcich kapitolách je charakterizovaný rýmovník a jeho účinné látky predovšetkým s antimikrobiálnym a antioxidačným potenciálom, ďalej sú popísané možnosti získavania extraktov z rýmovníku, resp. všeobecne z rastlín, a v neposlednom rade metódy vhodné pre meranie ukazovateľov, ktoré boli vybrané a sledované ako hlavné charakterizujúce parametre získaného extraktu.

### 2.1 Chemické zloženie liečivých rastlín

Rastliny všeobecne obsahujú vodu, organické a anorganické látky. Z organických zlúčenín sa vyskytujú primárne metabolity (sacharidy, aminokyseliny, bielkoviny, nukleové kyseliny, mastné kyseliny, steroidy, lipidy a organické kyseliny) a sekundárne metabolity (alkaloidy, flavonoidy, taníny, saponíny, fytosteroly, terpény, glykozidy a vitamíny). Sekundárne metabolity plnia v rastline celú radu funkcií: prispievajú k vytvoreniu farby, arómy a chuti, chránia rastliny proti škodcom, patogénom, konkurenčným rastlinám, znečisteniu, stresu a ultrafialovému žiareniu. Sú považované za biologicky aktívne a sú známe svojimi biologickými vlastnosťami. Anorganickými zlúčeninami liečivých rastlín sú hlavne minerálne látky, ktoré sú dôležité pri biologických, chemických a metabolických procesoch či enzymatických reakciách.

Chemické zloženie rastlín sa môže líšiť u konkrétnych rodov, čeladi, odrôd a druhov. Je značne ovplyvnené environmentálnymi a geografickými faktormi, vplyv môže mať množstvo dostupných živín, podmienky pri pestovaní, vitalita alebo vek rastliny (Burdějová, 2018).

#### 2.1.1 Biologicky aktívne látky

Biologicky aktívne látky (BAC – *Biologically Active Compounds*) sú sekundárne metabolity rastlín, ktoré sa prirodzene nachádzajú v malých množstvách v rastlinách, cereáliách, strukovinách, orechoch, olivovom oleji, zelenine, ovocí, čajoch či červenom víne (Kris-Etherton a kol., 2002).

Majú množstvo vlastností, z ktorých antioxidačné vlastnosti sú považované za najdôležitejšie. Ich pozitívny dopad na zdravie človeka bol dokázaný mnohými štúdiami, vo významnej miere pomáhajú aj pri liečbe chronických ochorení. Hrajú dôležitú rolu pri prevencii kardiovaskulárnych ochorení, cukrovke, obezite, hypertenzií a stimulácií obranného imunitného systému (Giacometti a kol., 2018).

Rastliny patriace do čelade hluchavkovitých (*Lamiaceae*) sú takisto zdrojom BAC. Najčastejšie sa získavajú vo forme extraktov a esenciálnych olejov, ktoré sú charakteristické obsahom nízkomolekulárnych terpenoidov a fenolických látok. Obe tieto skupiny sú cenené a považované za biologicky aktívne (Barba a kol., 2014; Karamanoli a kol., 2000).

Bioaktívne látky extrahované z rastlín, prečistené a použité separátne alebo ako zmesi, sú vhodné pre potravinárske použitie, kde ovplyvňujú nutričnú, chemickú, mikrobiologickú a sensorickú kvalitu potravín. Používajú sa napríklad ako fortifikujúce látky, antioxidanty, konzervanty, farbivá atď. (Giacometti a kol., 2018). Vzhľadom k tomu, že syntetické látky, ako napr. syntetické antioxidanty, môžu mať nepredvídateľné toxické účinky, zvyšuje sa záujem konzumentov a priemyslu o využitie extraktov z rastlín do potravinárskeho, farmaceutického a kozmetického priemyslu ako náhrada syntetických látok (Granato a kol., 2017).

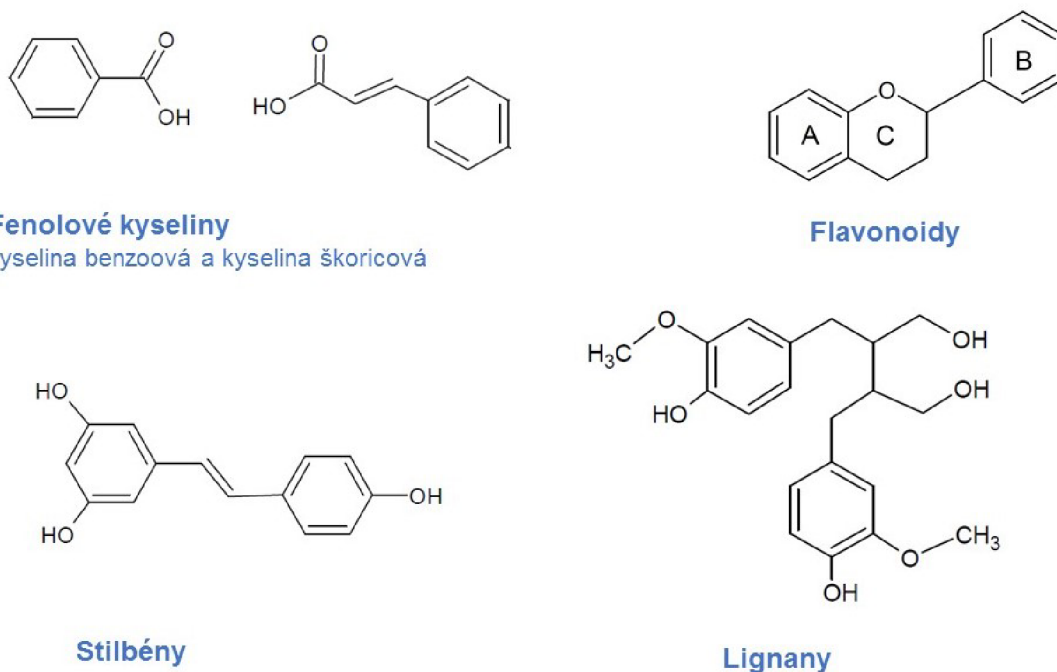
### 2.1.1.1 Fenolické látky

Fenolické látky obsahujú vo svojej štruktúre jeden (fenoly) alebo viac benzénových kruhov (polyfenoly), na ktorý/ktoré je naviazaná minimálne jedna hydroxylová skupina. V potravinách sa fenolické látky nachádzajú najmä ako sekundárne metabolity jedlých rastlín. V súčasnosti bolo popísaných viac ako 500 rôznych fenolických látok v potravinách, medzi najviac študované vlastnosti fenolických látok patrí ich bioaktivita, ktorá spočíva najmä v antimikrobiálnom a antioxidačnom účinku. Bola však už rozpoznaná aj schopnosť antimutagénnych a antikarcinogénnych účinkov (Sandoval-Acuña a kol., 2014). Ako prvé boli pozorované účinky založené na odstraňovaní a zabraňovaní vzniku reaktívnych kyslíkových zlúčenín (ROS – *Reactive Oxygen Species*). V poslednej dekáde sa však vyskytujú poznatky, že fenolické látky sú účinné aj iným mechanizmom ako „bojom proti ROS“. Niektoré fenolické látky sú schopné ovplyvňovať mitochondriálne procesy – biogénu, udržiavanie membránového potenciálu, elektrónový transportný reťazec, syntézu ATP, a tým ovplyvňovať vitalitu buniek (Sandoval-Acuña a kol., 2014).

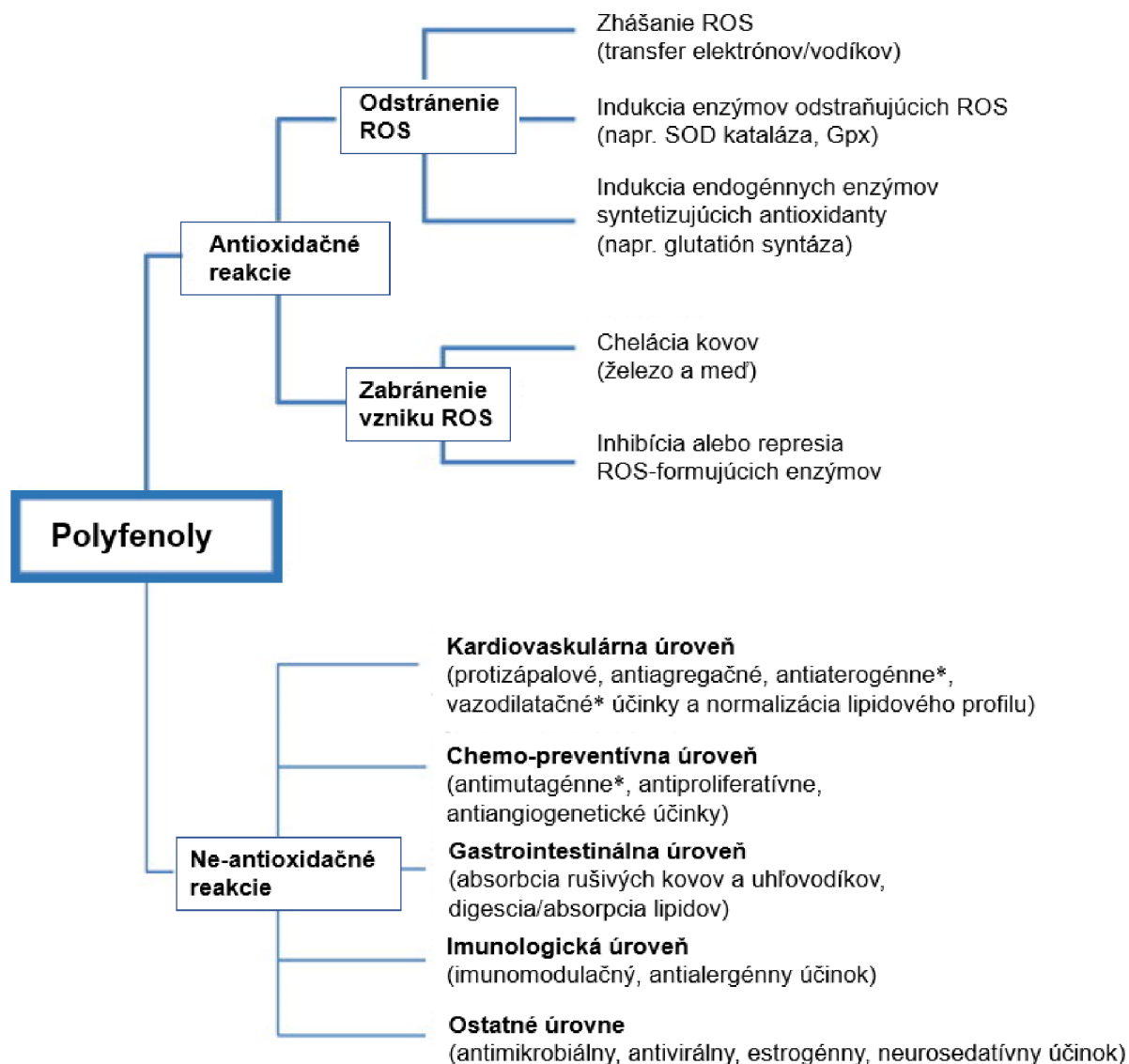
Polyfenolické látky v rastlinách pôsobia aj ako regulátory rastu, hormonálne regulátory, pH regulátory, majú antimikrobiálnu aktivitu a v rámci regulácie metabolizmu pôsobia pri navodzovaní stavu dormancie (Inácio a kol., 2013).

Vo všeobecnosti sa fenolické látky delia do týchto hlavných skupín: fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbény a lignany (viď Obrázok 1).

Obrázok 2 zhrňuje účinky polyfenolov a prehľadne rozdeľuje dôsledky antioxidačných a ne-antioxidačných reakcií.



Obrázok 1: Základná chemická štruktúra fenolických látok.



Obrázok 2: Zhrnutie doteraz preukázaných účinkov polyfenolov. Účinky ne-antioxidačných reakcií označené hviezdíčkou môžu (a nemusia) byť dosiahnuté len v kooperácii spolu s antioxidačnými účinkami. ROS – Reaktívne kyslíkové zlúčeniny (Reactive Oxygen Species). SOD – Superoxid dismutáza (Superoxide Dismutase), GPx – Glutatión peroxidáza (Glutathione Peroxidase) (upravené podľa Sandoval-Acuña a kol., 2014).

### Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny sa nachádzajú v rastlinách a potravinách v početnom množstve, obsahujú minimálne jednu karboxylovú skupinu a delia sa ďalej do dvoch hlavných podskupín: hydroxyderiváty kyseliny benzoovej a kyseliny škoricovej.

Biosyntéza fenolových kyselín v rastlinách prebieha najmä cez šikimátovú dráhu, kedy z cukrových substrátov získaných v glykolyze a pentózovej dráhe vznikajú postupne cez kyselinu šikimovú a chorizmovú aromatické aminokyseliny fenylyalanín a tryptofán, z ktorých sú následne tvorené kyselina škoricová, benzoová či salicylová (Mandal a kol., 2010).

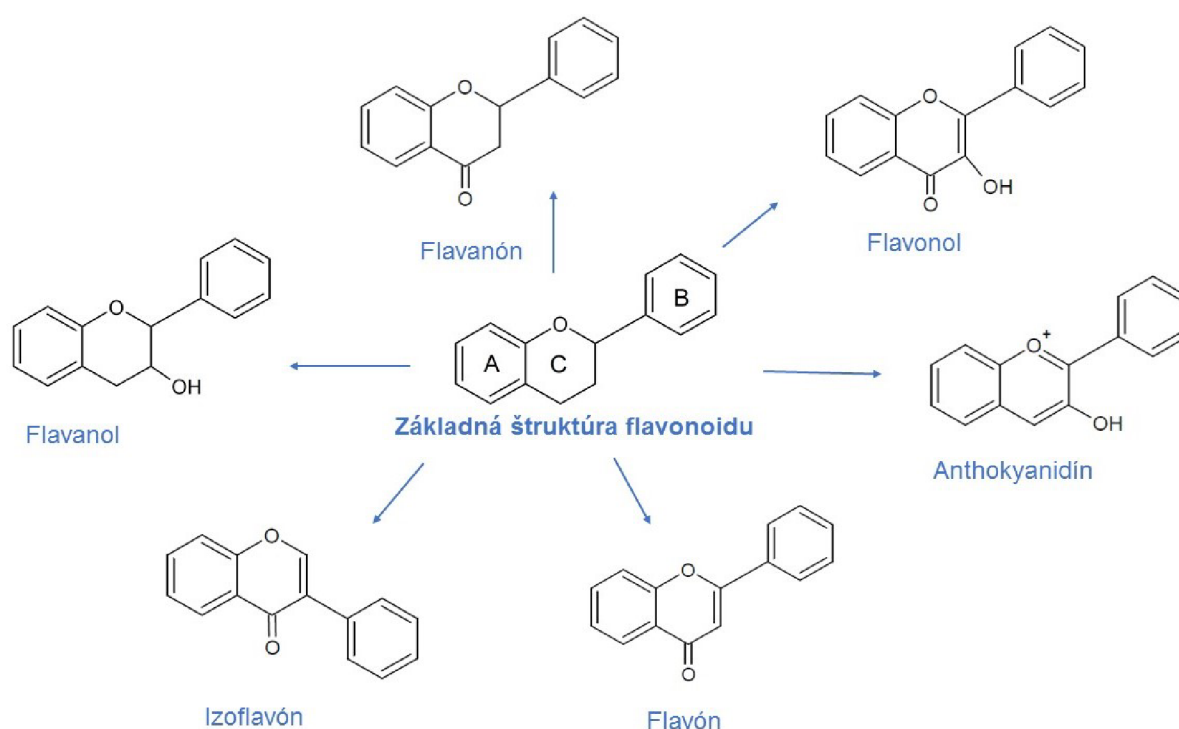
Výskyt hydroxyderivátov kyseliny škoricovej je častejší, najviac v zastúpení kyseliny *p*-kumárovej, kávovej, ferulovej a kyseliny sinapovej (Sandoval-Acuña a kol., 2014).

## Flavonoidy

Flavonoidy tvoria jednu z najviac študovaných skupín fenolických látok. Ich základná štruktúra pozostáva z dvoch aromatických jadier spojených tromi uhlíkovými atómami, ktoré tvoria kyslíkový heterocyklus.

Flavonoidy sa ďalej rozdeľujú na základe typu heterocyklu na flavonoly, flavóny, flavanóny, flavanoly, anthokyanidíny a izoflavóny (viď Obrázok 3). Individuálne rozdiely medzi týmito podskupinami spočívajú v rozdielnosti počtu a usporiadania hydroxylových skupín a ich alkylácie a/alebo glykozylácie. Flavonoidy, okrem iného, často vytvárajú v ovocí, kvetoch a listoch atraktívne farby. Najčastejšie vyskytujúce sa flavonoidy sú kvercetín, myricetín, katechíny atď. (Sandoval-Acuña a kol., 2014).

Flavonoidy sú syntetizované z malonyl-CoA a *p*-kumaroyl-CoA, ktoré vznikajú opäť v šikimátovej dráhe z cukrových prekurzorov (Mandal a kol., 2010).



Obrázok 3: Základná štruktúra flavonoidu rozdelenie podľa typu heterocyklu.

## Stilbény a lignany

Stilbény obsahujú dve fenylové jednotky spojené dvojuhlíkatým metylénovým mostíkom. Prítomnosť stilbénov v strave človeka je celkom nízka. Väčšina stilbénov v rastlinách pôsobí ako protiplesňové fytoalexíny – zlúčeniny, ktoré sú syntetizované len ako odozva na infekciu alebo poranenie. Jeden z najlepšie preštudovaných, prírodne sa vyskytujúcich polyfenolov – stilbénov, je resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbén) vyskytujúci sa v hrozne. Červené víno taktiež obsahuje značné množstvo resveratrolu (Sandoval-Acuña a kol., 2014).

Lignany sú difenolické zlúčeniny obsahujúce 2,3-dibenzylbutánovú štruktúru, ktorá vzniká dimerizáciou dvoch zvyškov kyseliny škoricovej. Mnohé lignany, ako napríklad secoisolariciresinol, sú považované za fytoestrogény. Jeho najbohatším zdrojom sú ľanové semiačka (do 3,7 g·kg<sup>-1</sup> suchej váhy) (Sandoval-Acuña a kol., 2014).

### 2.1.1.2 Terpény

Terpény sú látky, ktoré obsahujú rôzne štruktúrne a funkčné skupiny. Sú tvorené z viacerých 5-uhlíkatých ( $C_5$ ), tzv. izoprénových jednotiek. Terpény sú syntetizované v cytoplazme rastlinných buniek, pričom dráha syntézy prebieha cez syntézu kyseliny mevalonovej s počiatočnou molekulou acetyl-CoA. Terpény obsahujú uhlíkové základné štruktúry, ktoré sa môžu pomocou cykláz zacykliť a vytvoriť tak monocyklické a bicyklické štruktúry (Hyldgaard a kol., 2012). Najbežnejšie terpény sú monoterpény ( $C_{10}$ ) a seskviterpény ( $C_{15}$ ), ale vyskytujú sa aj hemiterpény ( $C_5$ ), diterpény ( $C_{20}$ ), triterpény ( $C_{30}$ ) či tetraterpény ( $C_{40}$ ). Terpen obsahujúci vo svojej štruktúre kyslík sa nazýva terpenoid (Bakkali a kol., 2008).

Z monoterpenov možno uviesť niektoré konkrétne príklady: myrcén, ocimén, limonén, *p*-cymén,  $\alpha$ -pinén, 3-karén, kamfén, sabinén (Bakkali a kol., 2008).

Seskviterpény sú tvorené z troch izoprénových jednotiek ( $C_{15}$ ), pričom zvýšenie počtu uhlíkov umožňuje zvýšiť počet cyklizácií s možnosťou veľkej rozmanitosti štruktúr. Štruktúra a funkcia seskviterpenov je podobná ako pri monoterpenoch. Ako príklady možno uviesť azulén,  $\beta$ -bisabolén,  $\beta$ -karyofylén, kurkumény (Bakkali a kol., 2008).

Rastliny, ktoré obsahujú tieto látky, sú napríklad bergamot, koriander, eukalyptus, geranium, levanduľa, citrón, citrónová tráva, mäta, pomaranč, peppermint, rozmarín, šalvia, tymián (Bakkali a kol., 2008). Posledné menované patria do čeľade hluchavkovitých, tak isto ako sledovaný rýmovník (*P. amboinicus*), preto je vysoko pravdepodobné, že tieto látky budú takisto súčasťou extraktu získaného z tejto rastliny.

Príklady niektorých štruktúr terpenov je možné vidieť na Obrázku 4.

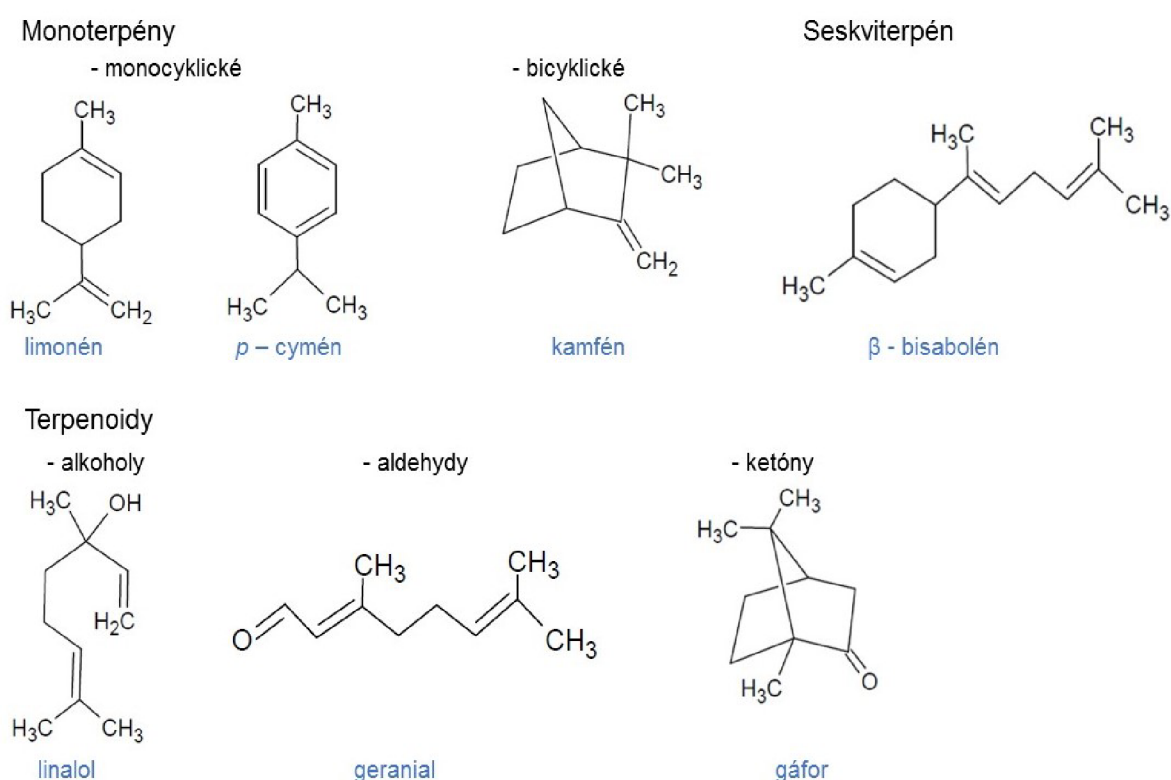
### Terpenoidy

Terpenoidy sú terpény, ktoré vznikajú pomocou pôsobenia enzýmov, ktoré sú schopné pridať do štruktúry molekuly kyslík a odstrániť alebo presunúť metylovú skupinu. Podľa prítomnosti funkčnej skupiny sa dajú rozdeliť na alkoholy, estery, aldehydy, ketóny, étery, fenoly a epoxidy. Príklady terpenoidov možno podľa funkčných skupín uviesť (Bakkali a kol., 2008):

- alkoholy
  - o acyklické – geraniol, linalol, citronellol, lavandulol, nerol
  - o monocyklické – mentol,  $\alpha$ -terpineol
  - o bicyklické – borneol, fenchol
- aldehydy
  - o acyklické – geranial, neral, citronellal
- ketóny:
  - o acyklické – tegetón
  - o monocyklické – mentóny, karvény
  - o bicyklické – gáfór, fenchón, tujón
- estery:
  - o acyklické – linalyl acetát/propionát, citronellyl acetát
  - o monocyklické – mentyl acetát
  - o bicyklické – izobornyl acetát
- étery:
  - o 1,8 – cineol, mentofurán
- peroxidy:
  - o askaridol
- fenoly:
  - o tymol, karvakrol.

Terpenoidy sú pomerne veľká skupina látok s antimikrobiálnym účinkom proti širokému spektru mikroorganizmov, pričom najúčinnnejšie identifikované monoterpenoidy sú karvakrol a tymol (viď kap. 2.4.1.2) (Hyldgaard a kol., 2012).

Dorman a Deans (2000) skúmali efekt viacerých esenciálnych olejov s vysokým obsahom terpenoidov proti 25 rôznym bakteriálnym kmeňom a preukázali, že všetky terpenoidy okrem borneolu a metylesterkarvakrolu vykazovali antimikrobiálnu aktivitu. Antimikrobiálna aktivita karvakrolu, tymolu, linaloolu a mentolu bola preukázaná voči *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. To potvrdzuje vysokú antimikrobiálnu aktivitu terpenoidov, pričom v chemickej štruktúre v porovnaní s terpénmi nie je veľká odlišnosť, zvýšenú antimikrobiálnu aktivitu je možné pripísať práve prítomnosti kyslíku. Podstata antimikrobiálneho účinku fenolických monoterpenoidov spočíva v štruktúrnych a funkčných poškodeniach cytoplazmatickej membrány (Hyldgaard a kol., 2012).



Obrázok 4: Chemické štruktúry niektorých terpénových zlúčenín.

## 2.2 Extrakty rastlín

Vo všeobecnosti sú rastlinné extrakty mixom stoviek zlúčenín, ktoré často vykazujú synergické vlastnosti. Pri získavaní hrubých extraktov z rastlín je prvým krokom extrakcia, pričom kvalita a kvantita získaných extraktov závisí od štruktúry daných zlúčenín, prírodných zdrojov a typu procesu.

„Esenciálny olej“, nazývaný tiež „éterický olej“ alebo „silica“, je extrakt prchavých (vonných), ale aj prípadne ďalších biologicky aktívnych látok, získaný z vhodného prírodného materiálu. Zloženie esenciálnych olejov závisí od viacerých faktorov, biotických aj abiotických, pričom najdôležitejšie z nich sú genetická predispozícia rastliny a niektoré stresujúce faktory (prístup vody, svetla, prítomnosť pesticídov prípadne škodcov). I napriek tomu by mali v kvalitatívnej analýze vykazovať zástupcovia jedného druhu veľmi podobnú

kompozíciu (Silvestre a kol., 2019). Z prítomných prchavých zlúčenín možno menovať napríklad monoterpény, seskviterpény, aldehydy, alkoholy, estery a ketóny (Tohidi a kol., 2019).

Esenciálne oleje sa získavajú z rastlín a z ich častí, ako sú kvety, puky, semiačka, listy, konáre, kôra, byliny, môžu sa nachádzať aj v dreve, ovocí a koreňoch. Esenciálne oleje môžu zásadným spôsobom prispievať k prežitiu príslušného organizmu, avšak názov „esenciálny“ je z hľadiska významu v biologickom prežití zavádzajúci (Tohidi a kol., 2019). Esenciálne oleje sú rozpustné v alkoholoch, éteroch a olejoch, ale prakticky nerozpustné vo vode a schopné disperzie len za prídavku emulgátora (Balz, 1996). Môžu byť viac či menej kvapalné, miestami až živicovej konzistencie. Často majú farbu v rozmedzí svetlá žltá až smaragdovo zelená cez tmavú modrú až hnedo červenú. Až na niektoré výnimky sú esenciálne oleje ľahšie ako voda s hustotou medzi 0,75 a 0,98 g·cm<sup>-3</sup>. Esenciálne oleje navyše veľmi rapídne prechádzajú z kvapalnej do plynnej fázy – sú horľavé so žiarivým plameňom (Balz, 1996).

Množstvo esenciálnych olejov v rastlinách sa môže líšiť od 0,1 do 10 % hm. Svetový konzum esenciálnych olejov rastie vďaka záujmu o ich antimikrobiálne, antioxidačné, antivírusové a protinádorové účinky (Giacometti a kol., 2018). Väčšina rastlinných materiálov obsahuje esenciálne oleje, avšak pre ich malé množstvo nie je vždy výhodné ich praktické získavanie v porovnaní s cenou. Rastliny, ktoré majú vysokú výťažnosť a ich extrakcia je aj ekonomicky výhodná, sú napríklad levanduľa, tymián, mäta, aníz, fenikel, rozmarín, eukalyptus a pod.

Esenciálne oleje sa často pridávajú do kozmetiky, ktorú obohacujú arómami. Napríklad limonén z citrusovej kôry je často súčasťou mydiel, mycích a čistiacich prostriedkov či detergentov. Esenciálne oleje sú mnohé považované za vhodné pre aplikáciu vo funkčných potravinách, pokiaľ vezmeme do úvahy status GRAS (Generally Recognised As Safe). Boli testované napríklad rôzne funkčné obaly s integrovanými esenciálnymi olejmi a boli sledované ich antimikrobiálne účinky. Mnohé esenciálne oleje sú limitované ich aromatickými vlastnosťami (Hashemi a kol., 2018).

Získ extraktu z rastliny vo forme esenciálneho oleja je podmienený spôsobom extrakcie. Pre získanie esenciálneho oleja z rastlín sa využíva najčastejšie destilácia (hydrodestilácia, parná destilácia) a extrakcia subkritickými tekutinami (CO<sub>2</sub>, voda) (Tongnuanchan a kol., 2014)

Rastlinné extrakty sa používajú aj ako konzervanty v už existujúcich procesných technológiách, napríklad rozmarín lekárske (viď kap. 2.4.2), alebo ako arómy napríklad v cukrovinkách, kde sú nositeľmi chutí citrón, pomaranč, škorica či muškátový orech. Ich ďalšie využitie je v aromaterapii.

## 2.3 Biologické účinky rastlinných látok

### 2.3.1 Antioxidanty a antioxidačná aktivita

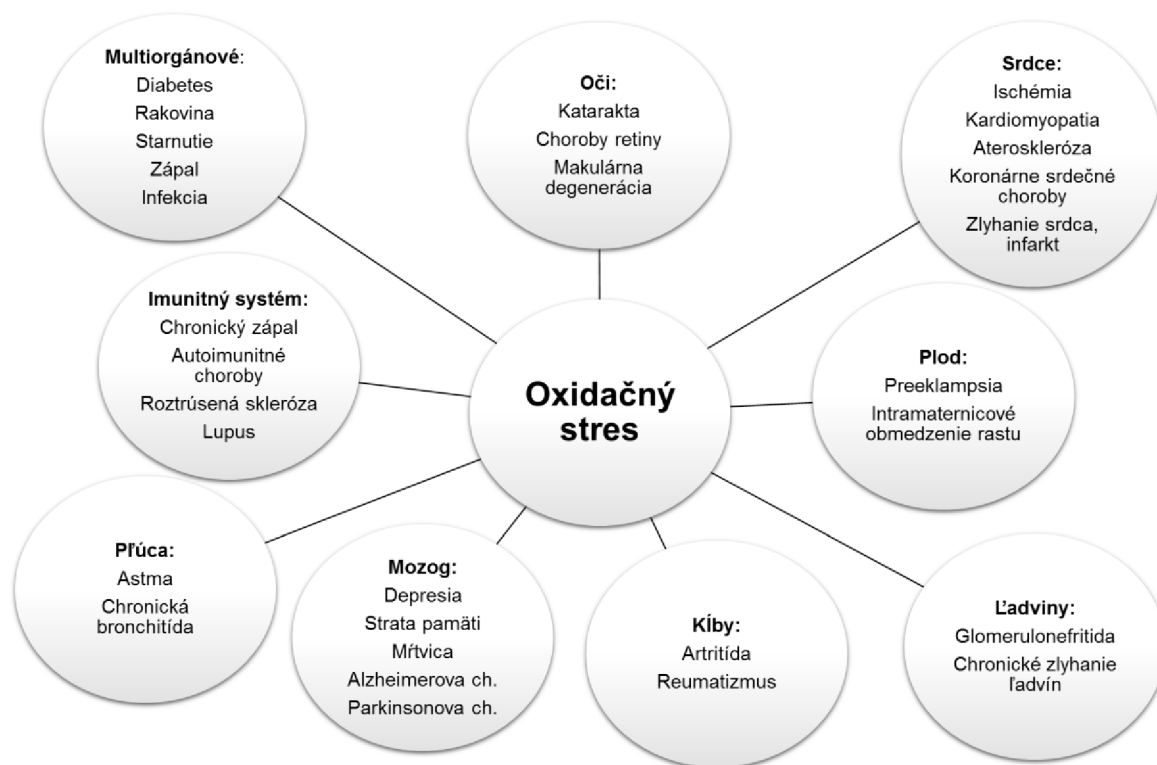
Antioxidanty ako také sa dostali do povedomia v 90. rokoch 20. storočia, kedy vedci postupne objavovali, akú významnú rolu v rôznych chronických ochoreniach a starnutí hrajú voľné radikály (Halliwell a kol., 1990).

V súčasnosti sa ako antioxidanty definujú akékoľvek zlúčeniny, ktoré sú schopné eliminovať reaktívne formy kyslíka ROS a ich deriváty dusíka či síry (RNS – *Reactive Nitrogen Species*, RSS – *Reactive Sulfur Species*) priamo alebo nepriamo. Buď pôsobia priamo ako inhibítor ROS, alebo pôsobia ako regulátor antioxidačného procesu (Mut-Salud a kol., 2016).

ROS sú skupinou molekúl, ktoré sú prirodzene produkované v metabolizme buď v dôsledku pôsobenia mitochondriálnych oxidáz, alebo inými bunkovými časťami. Produkcia ROS sa zvyšuje s mitochondriálnym poškodením. RNS a RSS vznikajú v dôsledku reakcie ROS s oxidmi dusíka a iolmi (Mut-Salud a kol., 2016). ROS/RNS môžu spôsobovať poškodenie bunky kovalentnými väzbami s inými molekulami a následnou stimuláciou abnormálneho bunkového rastu, alebo môžu indukovať starnutie, čo môže viesť k pretrvávajúcej populácii buniek, ktorá vo veľkom množstve produkuje zápalové cytokíny (Cheynier a kol., 2013). Vzhľadom k doterajším výskumom, antioxidanty sú schopné blokovat produkciu ROS a teda inhibovat starnutie, vznik zápalov a rakovinotvorných buniek.

### 2.3.1.1 Mechanizmus pôsobenia antioxidantov

ROS zahŕňajú napríklad singletový kyslík, superoxydy, peroxylové radikály, hydroxylové radikály a peroxynitrity. Ak je nedostatočná rovnováha medzi produkciou ROS a ochrannými mechanizmami, dochádza k vzniku tzv. oxidačného stresu. Medzi ochranné mechanizmy okrem antioxidantov patria aj enzýmy (napr. superoxid dismutáza, kataláza a glutatión peroxidáza) a vitamín E, kyselina močová a sérové albumíny (Antolovich a kol., 2002). Oxidačný stres v konečnom dôsledku ovplyvňuje funkcie buniek a vedie k rôznym patologickým zmenám – starnutie, artritída, astma, karcinogenéza, diabetes, reumatizmus a rôzne neurodegeneratívne choroby (Patel a kol., 2010). Obrázok 5 zhrňuje prehľad porúch metabolizmu a ochorení spôsobených v súvislosti s najčastejšie dlhodobým oxidačným stresom.



Obrázok 5: Prehľad najvýznamnejších zdravotných problémov spojených s tvorbou reaktívnych kyslíkových radikálov (upravené podľa Stratil a Kubáň, 2018).

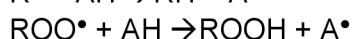
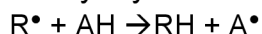


Mechanizmus pôsobenia antioxidantov voči bunke je založený na schopnosti neutralizovať reaktívnu časticu prenosom elektrónu a/alebo vodíku na reaktívnu časticu. Antioxidanty sú schopné zhášať aktivitu voľných radikálov pred tým než poškodia funkciu lipidov, proteínov, enzýmov, sacharidov a DNA, čím sa predchádza vzniku oxidačného stresu a poškodeniam buniek (Patel a kol., 2010).

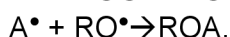
Antioxidanty je možné rozdeliť podľa pôsobenia v bunke na primárne a sekundárne.

Sekundárne (preventívne) antioxidanty spomaľujú oxidáciu a to viacerými spôsobmi, napríklad odstránením substrátu alebo zhášaním singletového kyslíkového radikálu.

Primárne antioxidanty môžu už v stopových koncentráciách spomaliť alebo zastaviť iniciačný krok reakcie s lipidovým radikálom a inhibovať propagáciu reakciou s peroxylovým alebo alkoxylovým radikálom:

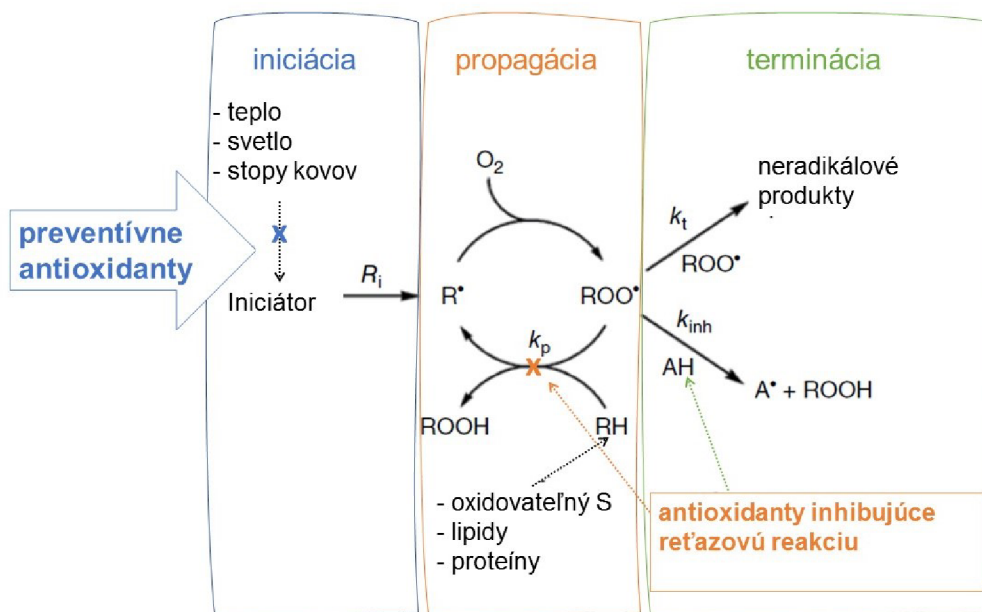


Voľný radikál antioxidantu môže neskôr reagovať s reťazovými propagačnými reakciami a vytvárať peroxy antioxidačné molekuly:



Obrázok 6 zobrazuje zjednodušený mechanizmus pôsobenia primárnych a sekundárnych antioxidantov.

Antioxidanty narúšajúce reťazovú reakciu sú prítomné v potravinách buď prirodzene, alebo sú produkované synteticky (Antolovich a kol., 2002). V súčasnosti sa dáva prednosť prírodným antioxidantom pred antioxidantmi syntetickými. Syntetické antioxidanty, ktoré sa v praxi používajú pre zabránenie oxidácií tukov a olejov, sú BHT – butylhydroxytoluén, BHA – butylhydroxyanizol a TBHQ – terciálny butylhydrochinón. (Nariadenie Komisie (EÚ) č.231/2012). Najvýznamnejšie prírodné zlúčeniny s antioxidačnými vlastnosťami sú flavonoidy a ostatné fenolické zlúčeniny s jednou alebo viacerými hydroxylovými skupinami vo svojej štruktúre (Cheynier a kol., 2013; Patel a kol., 2010).



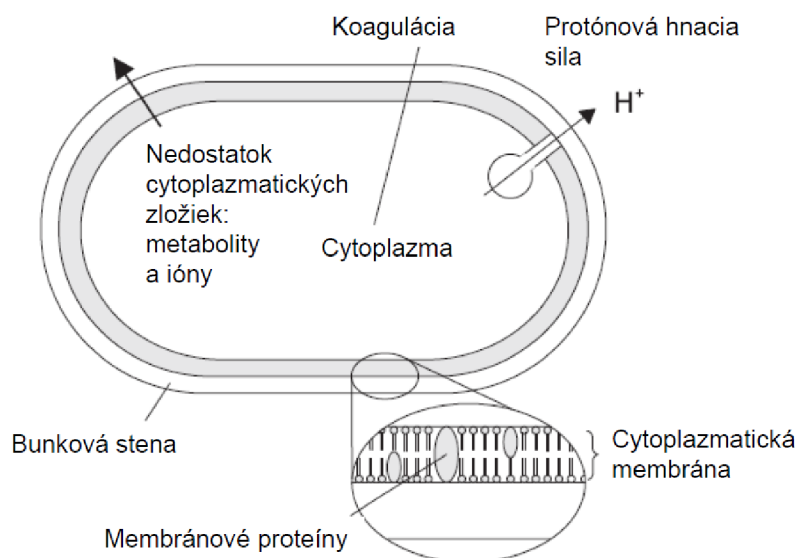
Obrázok 6: Zjednodušený mechanizmus oxidácie a antioxidačných mechanizmov. S – substrát (upravené podľa Hashemi a kol., 2018).

### 2.3.2 Antimikrobiálna aktivita

Esenciálne oleje obsahujú látky, ktoré pôsobia proti mikroorganizmom a teda vykazujú určitú antimikrobiálnu aktivitu (Friedman a kol., 2006).

Mechanizmus antimikrobiálneho účinku extraktov a esenciálnych olejov, vzhľadom na rôznorodosť chemických zlúčenín, nie je len jeden špecifický, ale pravdepodobne je to súhra viacerých zásahov do bunky (Carson a kol., 2002). Obrázok 7 zobrazuje hlavné lokácie poškodenia bunky.

Podstatná vlastnosť zložiek esenciálnych olejov je hydrofobicita, ktorá im umožňuje začleniť sa do lipidov bakteriálnej bunkovej steny a cytoplazmatickej membrány, čím poškodí jej štruktúru a bakteriálna bunka sa stane viac permeabilnou. Bakteriálna bunka dokáže určité množstvo nedostatku iónov prežiť, avšak pri nadmernom úbytku iónov dochádza k obmedzeniu jej vitality a následne k jej smrti (Burt, 2004). Všeobecne je pozorovaná vyššia antimikrobiálna aktivita esenciálnych olejov pri grampozitívnych baktériách (Kokoska a kol., 2002).

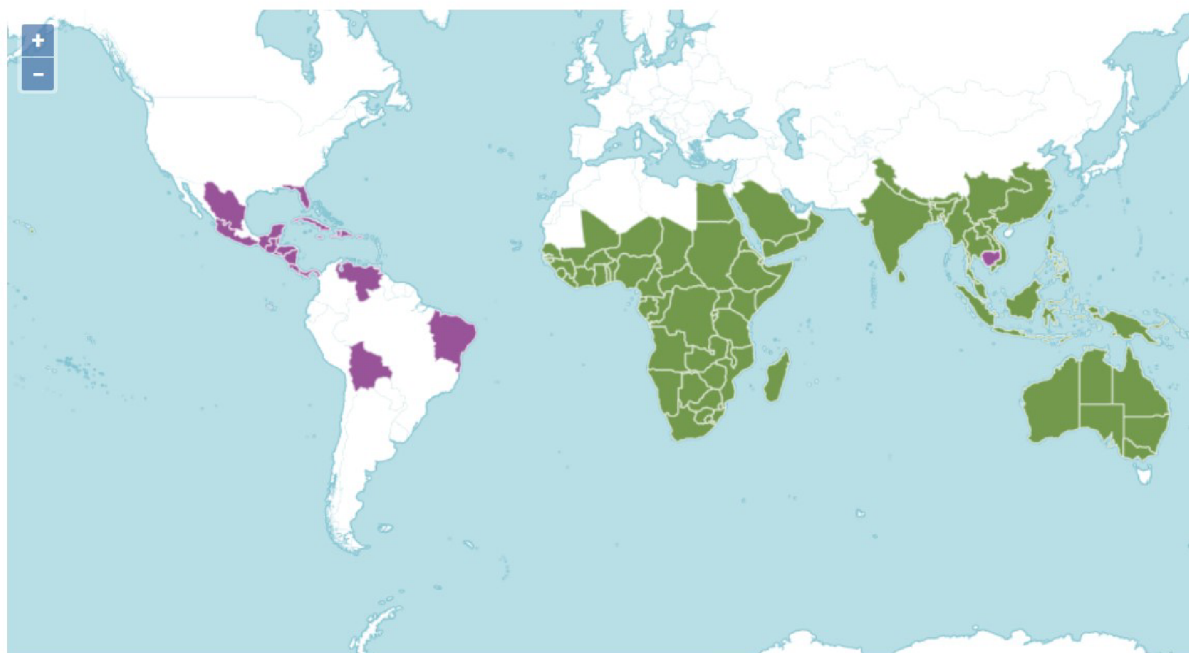


Obrázok 7: Lokácia pravdepodobných miest pôsobenia extraktov (esenciálnych olejov) na bakteriálnu bunku: degradácia bunkovej steny; porušenie cytoplazmatickej membrány; poškodenie membránových proteínov; nedostatok bunkových zložiek; koagulácia cytoplazmy; vyčerpanie protónovej hnacej sily (Burt, 2004).

### 2.4 *Plectranthus* spp.

Rod rastlín *Plectranthus* patrí do čeľade *Lamiaceae* (hluchavkovité). Je vo veľkej miere rozšírený v tropických oblastiach ako sú južná Afrika, južná Ázia a Austrália (viď Obrázok 8) (Kubínová, Stružková, 2014; Rice a kol., 2011). Tento rod obsahuje viac než 300 identifikovaných druhov. Z dôvodu obtiažnosti presnej identifikácie druhov dochádzalo v minulosti často k zámene s inými, blízkymi rodmi, napríklad *Coleus*, *Solenostemon*, či *Englerastrum*. Navyše mnoho druhov formálne zaradených do rodu *Plectranthus* sú už uznané ako príbuzné rodu *Isodon* (Lukhoba a kol., 2006).

Jednotlivé druhy rodu sú byliny, kry a polokry, často sukulentné. Listy sú vzpriamené, križmostojné a pokryté trichómami. Kvety vyrastajú v hroznovitých skupenstvách, kalich je štvorpočetný a koruna dvojpyská, dlho trubkovitá (Kubínová, Stružková, 2014).



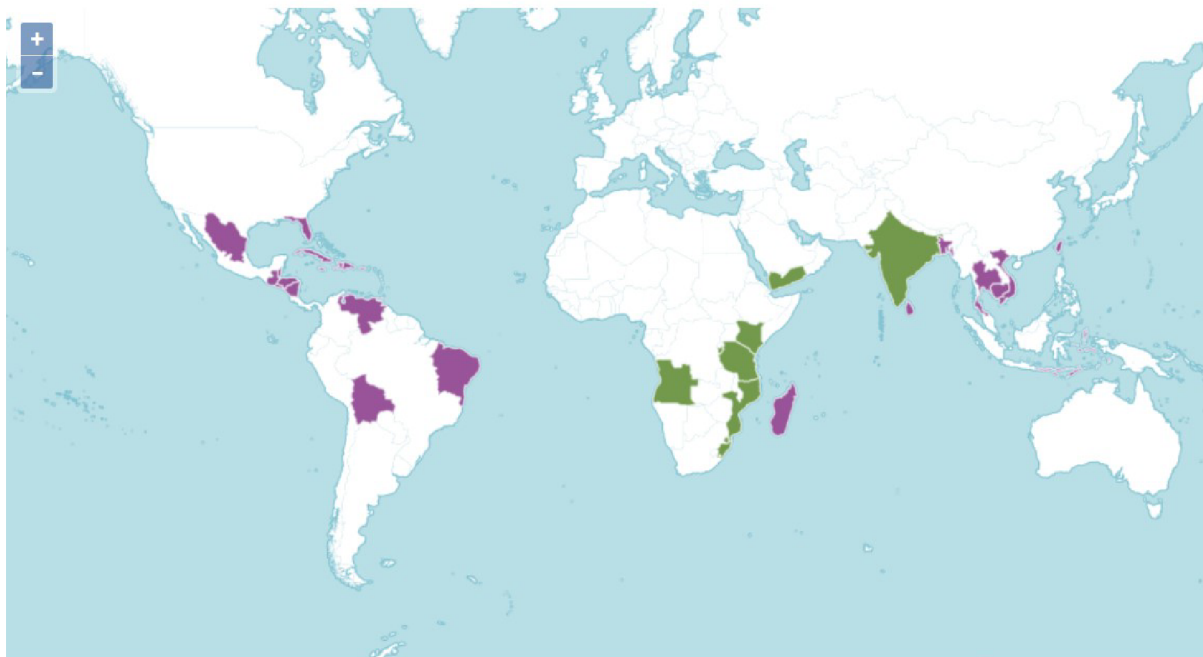
Obrázok 8: Výskyt rodu *Plectranthus*. Zelená – prirodzený výskyt, fialová – umelo zavedená populácia (*Plectranthus* L'Hér., 2020).

Najväčší prínos rodu *Plectranthus* je v jeho medicínskom potenciáli, až 85 % použitia je pre medicínske účely (Lukhoba a kol., 2006). V ľudovom liečiteľstve sa používa napríklad v spojení s gastrointestinálnymi problémami (*Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus laxiflorus*, *Plectranthus esculentus*, *Plectranthus vettiveroides*) (Cook, 1995), v súvislosti s poraneniami pokožky (20 druhov, z toho *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus barbatus*) (Lukhoba a kol., 2006), s respiračnými ochoreniami (15 druhov, z toho *Plectranthus barbatus*, *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus madagascariensis* (Neuwinger, 2000), *Plectranthus mollis* (Lukhoba a kol., 2006), proti infekciám a horúčkam (20 druhov), pri urinálnych problémoch (8 druhov), pri bolestiach (9 druhov), pri svalových bolestiach (9 druhov). Rastliny rodu *Plectranthus* sa používajú aj pri poruchách nervového systému a pri problémoch s krvným obehom (Lukhoba a kol., 2006).

Ako materiál bol v rámci tejto práce použitý druh *Plectranthus amboinicus*. Jeho taxonomické zaradenie je uvedené v Tabuľke 1. Prirodzene sa vyskytuje v oblastiach Kene, Južnej Afriky, Arabskej Peninsuly a Indii (viď Obrázok 9). Umelo sa, podobne ako celý druh *Plectranthus*, rozšíril do oblastí strednej Ameriky a južnej Ázie. Synonymické názvy, ktoré možno dohľadať v literatúre, sú *Coleus amboinicus* (Lukhoba a kol., 2006), *Coleus aromaticus*, Indian Borage (Kumaran, Karunakaran, 2007).

Tabuľka 1: Základné taxonomické zaradenie druhu *Plectranthus amboinicus* (upravené podľa *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., 2020).

Klasifikačná úroveň	Slovenský názov	Latinský názov
Ríša	Rastliny	<i>Plantae</i>
Oddelenie	Suchozemské rastliny	<i>Embryophyta</i>
Trieda	Magnéliorasty	<i>Magnoliopsida</i>
Rad	Hluhavkotvaré	<i>Lamiales</i>
Čeľaď	Hluhavkovité	<i>Lamiaceae</i>
Rod	Plektrant	<i>Plectranthus</i>
Druh	Mexický eukalyptus	<i>Plectranthus amboinicus</i>



Obrázok 9: Výskyt druhu *Plectranthus amboinicus*. Zelená – prirodzený výskyt, fialová – umelo zavedená populácia (*Coleus amboinicus* Lour., 2020).

#### 2.4.1 Chemická kompozícia rýmovníku (*Plectranthus amboinicus*)

Chemické zastúpenie látok v extraktoch a esenciálnych olejoch získaných z rastliny sa v literatúre líši, hlavne v percentuálnom zastúpení. Jedna konkrétna rastlina môže mať rozličný percentuálny obsah látok predovšetkým preto, že sa jedná o sekundárne metabolity. Tie vo veľkej miere odrážajú prostredie, v ktorom sa rastlina nachádza. Faktorov, ktoré môžu vplývať na tvorbu sekundárnych metabolitov, je mnoho. Patrí sem napríklad sezónnosť, cirkadiálny rytmus, štádium rozvoja, vek rastliny, teplota, dostupnosť vody a ultrafialové žiarenie. Syntéza sekundárnych metabolitov je teda podmienená prostredím a okolitými podmienkami (Teixeira a kol., 2018).

Bioaktivita rastliny *Plectranthus amboinicus* je podľa Arumugam a kol. (2016) podmienená prítomnosťou 76 prchavých a 30 neprchavých látok rôznych skupín – monoterpény, diterpény, triterpény, seskviterpény a ich kyslíkové formy, fenoly, flavonoidy, estery, alkoholy a aldehydy.

Štúdie zameriavajúce sa na farmakologické účinky *P. amboinicus* boli vykonané na extraktoch alebo esenciálnych olejoch, v ktorých sa nachádzajú komplexné prchavé komponenty, syntetizované prirodzene v rôznych častiach rastlín v sekundárnom metabolizme s veľmi vysokým potenciálom v biomedicíne (Vasconcelos a kol., 2017).

##### 2.4.1.1 Antioxidačné účinky rýmovníku

Kumaran a Karunakaran (2006) prvý krát popísali antioxidačnú aktivitu proti voľným radikálom vodných extraktov rastliny *Coleus aromaticus* (synonymum pre *Plectranthus amboinicus*) pôvodom z Indie. Extrakt z listov vykazoval dobrý antioxidačný potenciál a preukázal významnú redukčnú silu pri odstraňovaní superoxidov, oxidov dusíku a tiež vykazoval chelatačné schopnosti železitých iónov.

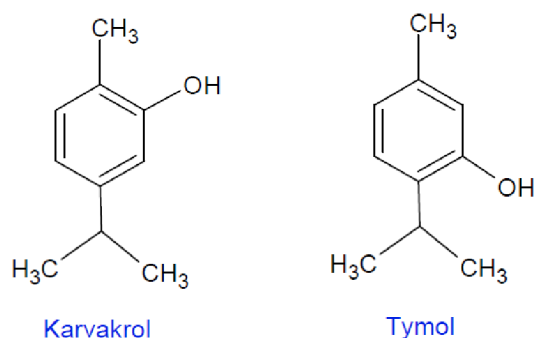
Kumaran a Karunakaran (2007) vo svojej ďalšej štúdií potvrdili v extraktoch prítomnosť kyseliny rozmarínovej, kávovej a chlorogénovej ako hlavných antioxidačných molekúl v *P. amboinicus*. Bhatt a kol. (2013) identifikovali v metanolových extraktoch rastlinnej stonky aj ďalšie molekuly ako kyslinu gallovú, kvercetín, rutín a kyselinu *p*-kumárovú.

Khanum a kol. (2011) pozorovali nižšiu antioxidačnú aktivitu extraktov listov *P. amboinicus* v 50% etanole v porovnaní s extraktmi z rastlín *Oreganum vulgare* a *Trachyspermum ammi*, z dôvodu nižšej extrakcie celkových fenolov a celkových flavonoidov. Ich synergický účinok bol však významný.

Bhatt a Negi (2012) vo svojej štúdií porovnávali extrakty v rôznych rozpúšťadlách, pričom extrakt získaný pomocou etylacetátu vykazoval najvyššiu antioxidačnú aktivitu a obsah fenolických látok. Extrakt získaný s acetónom ako rozpúšťadlom takisto vykazoval dobrú antioxidačnú a aj antibakteriálnu aktivitu.

#### 2.4.1.2 Antimikrobiálna aktivita rýmovníku

Za hlavné zlúčeniny vykazujúce antimikrobiálnu aktivitu, ktoré sa nachádzajú v rýmovníku, sú považované tymol a karvakrol (Veldhuizen a kol., 2006). Tymol je fenolický monoterpenoid, ktorý je štruktúrne veľmi podobný karvakrolu (viď Obrázok 10). Líši sa len polohou hydroxylovej skupiny (Burt, 2004). Primárny mechanizmus antibakteriálneho účinku tymolu nie je presne známy, ale predpokladá sa, že zahŕňa poškodenie vnútornej a vonkajšej membrány, interaguje s membránovými proteínmi, v dôsledku čoho dochádza k zvýšeniu permeability bunkovej membrány (Hyldgaard a kol., 2012). Tymol narúša priebeh citrátového cyklu a ovplyvňuje činnosť viacerých enzýmov priamo alebo nepriamo v syntéze ATP (Di Pasqua a kol., 2010). Intracelulárne pôsobenie tymolu teda naznačuje, že ovplyvňuje dôležité procesy tvorby energie, čo v konečnom dôsledku znižuje schopnosť obnovy bunky.



Obrázok 10: Chemická štruktúra karvakrolu a tymolu.

Karvakrol je fenolický monoterpenoid, ktorý sa vo veľkom množstve nachádza napríklad aj v oregane (*Origanum vulgare*), tymiáne (*Thymus vulgaris*) a ďalších rastlinách. (Sharifi-Rad a kol., 2018). Antimikrobiálny účinok karvakrolu je pravdepodobne veľmi podobný s účinkom tymolu, a teda spôsobuje štruktúrne a funkčné zmeny v bunkovej membráne (Hyldgaard a kol., 2012). Karvakrol má široké spektrum pôsobenia proti baktériám, pôsobí na grampozitívne aj gramnegatívne baktérie (Friedman a kol., 2002). Narúša bunkovú membránu gramnegatívnych baktérií, uvoľňuje lipopolysacharidy a zvyšuje permeabilitu cytoplazmatickej membrány pre ATP (Burt, 2004). Pri grampozitívnych baktériách je karvakrol schopný interagovať s membránou a poškodzovať permeabilitu pre kationy, ako sú H<sup>+</sup> a K<sup>+</sup> (Veldhuizen a kol., 2006). Karvakrol pôsobí aj proti plesniam *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Penicillium rubrum*, *Trichoderma viridie*, *Candida albicans* (Sharifi-Rad a kol., 2018).

Biologickým prekursorom karvakrolu je *p*-cymén. Vo svojej štruktúre nemá naviazané žiadne funkčné skupiny. Nemá tak efektívny antimikrobiálny účinok ak pôsobí samostatne,

ale bol pozorovaný synergizmus *p*-cyménu a karvakrolu (Burt, 2004). *P*-cymén má vysokú afinitu k bunkovým membránam (je hydrofóbny) a spôsobuje expanziu membrány a ovplyvňuje membránový potenciál bunky. *P*-cymén nemá žiadny vplyv na permeabilitu membrány, avšak spôsobuje pokles v entalpii a v teplote topenia membrán, čo potvrdzuje hypotézu, že *p*-cymén pôsobí ako substitučná nečistota v membráne (Hyldgaard a kol., 2012).

V štúdií Erny Sabrina a kol. (2014) esenciálny olej získaný z rastliny *Plectranthus amboinicus* vykazoval najvyššiu antimikrobiálnu aktivitu voči *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida tropicalis*. Zlúčeniny, ktoré najviac prispievali k antimikrobiálnemu účinku boli gáfór, karvakrol a 3-karén.

V ďalšej štúdií Murthy a kol. (2009) získaný esenciálny olej vykazoval antimikrobiálnu aktivitu proti plesniam *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus oryzae*, *Candida versatilis*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* a *Saccharomyces cerevisiae*. Bol preukázaný aj inhibičný účinok voči produkcii ochratoxínu kmeňom *A. ochraceus* a inhibícia rastu samotného *A. ochraceus* pri použití esenciálneho oleja v určitých typoch potravín – podzemnica olejná, kukurica či krmivo pre hydinu.

Metanolový extrakt rýmovníka vykazoval vyššiu antimikrobiálnu aktivitu voči všetkým testovaným mikroorganizmom (*Bacillus subtilis*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Candida albicans*) oproti acetónovým a hexánovým extraktom. Tieto extrakty však vôbec neinhibovali *E. coli* a *S. aureus* a citlivejšie voči všetkým extraktom boli kvasinky *C. albicans* (Swamy a kol., 2017).

Vasconcelos a kol. (2017) získali esenciálny olej z *Plectranthus amboinicus* s vysokým obsahom karvakrolu (88,17 %) a preukázali jeho antimikrobiálnu aktivitu proti planktonickému biofilmu *S. aureus*. Jednalo sa o *P. amboinicus* pochádzajúci z Brazílie a esenciálny olej bol získaný hydrodestiláciou.

Ajitha a kol. (2014) vo svojej štúdií vyjadrili potenciál inhibičného účinku extraktu *P. amboinicus* vo forme strieborných nanočastíc proti *Staphylococcus spp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp*, *Bacillus spp* a *Penicillium spp*. Najvyššia antimikrobiálna aktivita bola nameraná proti *E. coli* a *Penicillium spp*.

#### **2.4.1.3 Aromaticky aktívne látky rýmovníku**

Esenciálne oleje a extrakty získavané z rastlín obsahujú zmes látok, medzi ktorými sa nachádzajú aj aromatické prchavé látky, ktoré sa používajú ako arómy a vonné látky napríklad v parfémoch alebo aj v potravinách. Prchavé látky prítomné v rastlinách pozostávajú z komplexného mixu chemických zlúčenín, z ktorých každá má určité chemické a fyzikálne vlastnosti. Určitou kombináciou týchto látok v rôznych pomeroch získavajú esenciálne oleje jedinečné vonné charakteristiky. Rozdielnosť arómy jednotlivých rastlín spočíva v rôznorodosti prítomnosti prchavých látok a ich pomerov. Prchavé látky sú zväčša terpény (mono-, seskvi- a di-terpény) a spolu s alkaloidmi a fenolickými látkami sú jednými z najdôležitejších látok produkovaných rastlinami (Figueiredo a kol., 2008). Tieto látky okrem aromatickej aktivity vykazujú aj antioxidačné a antimikrobiálne účinky, najmä vďaka svojej štruktúre.

Medzi často sa vyskytujúce aromatické látky v rýmovníku patria spomedzi monoterpénov  $\alpha$ -pinén,  $\Delta$ -3-karén,  $\gamma$ -terpinén, kamfén, spomedzi monoterpenoidov linalol, gáfór, zo seskviterpénov  $\beta$ -karyofylén,  $\beta$ -selinén, zo seskviterpenoidov karyofylén oxid a z výrazne aromatických zlúčenín tymol, karvakrol a *o*-cymén (Hassani a kol., 2012).

Analýza esenciálneho oleja získaného hydrodestiláciou z rastliny *Plectranthus amboinicus* pochádzajúcej z Bazílie (Araripe národný les, Ceará) preukázala prítomnosť tymolu

(64,3 %), *p*-cyménu (10,3 %),  $\gamma$ -terpinénu (9,9 %) a  $\beta$ -karyofylénu (2,8 %) (Teixeira a kol., 2018).

Ďalšia analýza esenciálneho oleja získaného za podobných podmienok, taktiež z Brazílie (Záhrada medicínskych rastlín, regionálna Univerzita Cariri) potvrdzuje prítomnosť karvakrolu (67,9 %), *p*-cyménu (10,3 %),  $\gamma$ -terpinénu (5,9%),  $\beta$ -karyofylénu (2,8 %), (E)- $\alpha$ -bergamoténu (1,4 %), tymolu (1,3 %), *cis*- $\beta$ -ociménu (1,3 %), aromadendrénu (1,2 %),  $\beta$ -pinénu (1,2 %), terpinén-4-olu (0,9 %),  $\alpha$ -pinénu (0,8 %) a  $\alpha$ -humulénu (0,7 %) (Galvão Rodrigues a kol., 2013).

Esenciálny olej získaný hydrodestiláciou rastliny *Plectranthus amboinicus* pochádzajúcej z Indie obsahoval celkom 26 identifikovaných zlúčenín. Najviac zastúpený bol karvakrol (28,65 %), ďalej tymol (21,66 %),  $\alpha$ -humulén (9,67 %), undekanal (8,29 %),  $\gamma$ -terpinén (5,9 %), *p*-cymén (6,46 %), karyofylén oxid (5,85 %),  $\alpha$ -terpineol (3,28 %) a  $\beta$ -selinén (2,01 %) (Senthilkumar, Venkatesalu, 2010).

Esenciálny olej získaný hydrodestiláciou rastliny pochádzajúcej z Komorských ostrovov obsahoval tieto hlavné komponenty: karvakrol (23,0 %), gáfor (22,2 %),  $\Delta$ -3-karén (15,0 %),  $\gamma$ -terpinén (8,4 %), *o*-cymén (7,7 %) a  $\alpha$ -terpinén (4,8 %) (Hassani a kol., 2012).

El Hawary a kol. (2013) vo svojej štúdií sledovali variáciu vlastností esenciálnych olejov získaných z listov rastliny *P. amboinicus* v 4 rôznych ročných obdobiach. Zlúčenina  $\gamma$ -kadinén bola hlavnou komponentou v esenciálnom oleji získanom na jar (18,66 %) a na jeseň (12,52 %).  $\beta$ -karyofylén (12,65 %) bol hlavnou komponentou získanou v esenciálnom oleji v zime a tymol (8,75 %) bol hlavnou komponentou esenciálneho oleja získaného v lete. Porovnávali aj esenciálne oleje získané zo stoniek rastliny. V tomto prípade boli najviac zastúpené tieto látky:  $\alpha$ -humulén (zima 11,14 % a leto (12,70 %),  $\beta$ -kopaén-4- $\alpha$ -ol (jar 9,37 %) a tymol (jeseň 13,02 %).

#### 2.4.2 Potenciál čeľade *Lamiaceae*

Čeľaď *Lamiaceae* je veľmi početná, mnohé rastliny z tejto čeľade sa používajú ako koreniny, liečivé rastliny alebo suroviny v kozmetickom priemysle. Príkladom ich použitia v potravinárstve je rozmarín lekársky (*Rosmarinus officinalis*). Mnoho štúdií odporúčalo rozmarínový extrakt a esenciálny olej pre komerčné účely ako prírodný konzervant. Európska komisia rozhodnutím 2010/67/EU povolila použitie rozmarínového extraktu ako novej aditívnej látky pod označením E392 (Smernica Komisie 2010/67/EÚ). Antioxidanty extrahované z rozmarínových listov sa pripravujú extrakciou z listov *Rosmarinus officinalis* s použitím rozpúšťacieho systému povoleného pre potraviny. Extrakty potom môžu (a nemusia) byť zbavené zápachu a farby a podliehajú štandardizácii (Nariadenie Komisie (EÚ) č. 231/2012).

Najnovšia štúdia sa zaoberala použitím extraktu z rozmarínu lekárskeho a ďalších rastlín ako antioxidantných činidiel používaných pri výrobe biodieselu. Kombináciou extraktu z rozmarínu a z bacuri (*Platonia insignis*) bolo preukázané, že extrakty vykazujú antioxidantnú aktivitu, ktorá spomaľuje oxidačné reakcie prebiehajúce v biodiesle. Tým sa umožnila dlhšia doba skladovania. Extrakty boli získavané maceráciou do organického rozpúšťadla – etanolu (Chendynski a kol., 2020).

Seydim a Sarikus, (2006) vo svojej štúdií popísali pozitívny antimikrobiálny účinok pridaných esenciálnych olejov do jedlých obalov vyrobených na základe srvátkového proteínu. Najvyššiu antimikrobiálnu aktivitu vykazoval oreganový esenciálny olej a esenciálny olej z rozmarínu.

Lee a kol. (2019) popísali aplikáciu rozmarínového extraktu ako antimikrobiálneho činidla viazaného v chitosanových nanočasticách. Túto metódu popísali ako prírodnú alternatívu konzervantu.

Dávila-Rodríguez a kol. (2019) popísali použitie nanoemulzií škoricových, rozmarínových a oreganových esenciálnych olejov pripravených pomocou ultrazvuku z hľadiska antimikrobiálnej účinnosti proti *E. coli* a *L. monocytogenes*. Nanoemulzie použili na ošetrovanie povrchu čerstvého zeleru, pričom najvyššiu antimikrobiálnu aktivitu preukázala emulzia z oreganových esenciálnych olejov.

## 2.5 Používané metódy a experimentálne techniky

### 2.5.1 Metódy získavania extraktov

Proces extrakcie hrá významnú rolu v obsahu a kvalite získaného extraktu, hlavne z dôvodu veľmi malého obsahu sekundárnych metabolitov v rastline. Je teda žiadúce používať metódu, ktorá poskytuje maximálne množstvo extraktu, prípadne esenciálneho oleja s pokiaľ možno čo najmenej zmenenými vlastnosťami v porovnaní s obsahom sekundárnych metabolitov v rastline. Esenciálne oleje sa získavajú niekoľkými základnými spôsobmi: destiláciou (vodnou parou alebo superkritickým oxidom uhličitým) alebo lisovaním. Pri príprave rastlinných extraktov sa v poslednej dobe stále viac uplatňujú moderné (nekonvenčné) extrakčné metódy, ktoré ponúkajú mnoho výhod.

Nové extrakčné metódy dostali názov „zelené metódy“. Pri ich rozvoji sa jedná hlavne o potrebu extrakcie rastlín, rias a bylín ekologickejšou metódou. Klasické konvenčné metódy spotrebujú množstvo energie, veľké množstvo rozpúšťadla s následným vysokým environmentálnym dopadom. Nové alebo alternatívne metódy musia teda byť ekonomicky uskutočniteľné („economically viable“), priateľské k životnému prostrediu („environmentally friendly“) a efektívne v prevádzke („efficient in operations“). Princíp takéhoto prístupu sa nazýva  $e^3$ . Alternatívy ku konvenčným extrakciám musia teda mať kratší extrakčný čas, menej spotrebovanej energie aj rozpúšťadla, v ideálnom prípade aj menej produkovaných emisií CO<sub>2</sub>.

Chemat a kol. (2019) popísali 6 princípov „zelenej extrakcie“:

1. opodstatnené získavanie zdrojov
2. minimalizácia organického rozpúšťadla
3. redukcia spotrebovanej energie
4. produkcia vedľajších produktov namiesto produkcie odpadu a vysoká pridaná hodnota
5. skrátenie extrakčného času a zníženie počtu potrebných úkonov
6. ciele získavanie „zelených extraktov“ so „zelenými hodnotami“ a nedenaturovaných a biodegradabilných extraktov bez kontaminantov.

#### 2.5.1.1 Konvenčné extrakčné metódy

Väčšina konvenčných extrakčných metód je založená na extrakcii rozpúšťadlom spolu s použitím tepla a/alebo miešania. Radia sa sem klasické metódy, medzi ktoré patrí napríklad macerácia, Soxhletova extrakcia či hydrodestilácia, príp. parná destilácia.

#### **Soxhletova extrakcia**

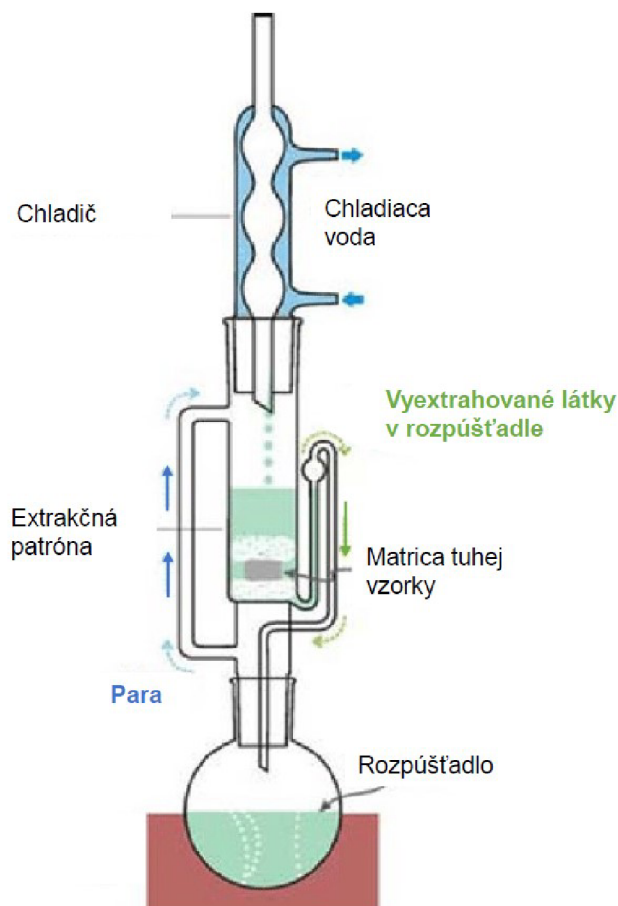
Bola prvý krát použitá Franzom Ritter Von Soxhletom, nemeckým chemikom v roku 1879. Primárne bola táto metóda zostavená pre extrakciu lipidov. Bola však a aj je úspešne použitá napríklad na extrakciu bioaktívnych látok z rôznych prírodných zdrojov (Azmir a kol., 2013). V súčasnosti sa používa najmä ako referenčná metóda pri porovnávaní úspešnosti iných metód alebo pri vyvíjaní nových metód (Azmir a kol., 2013).

Pri extrakcii tuhých látok sa používa Soxhletova aparatura (viď Obrázok 11). Vzorka je umiestnená do papierovej extrakčnej patróny s valcovitým tvarom a guľatým dnom. Do



patróny neustále kondenzuje rozpúšťadlo a vymýva rozpustné komponenty z tuhej matrice vzorky. Rozpúšťadlo, ktoré obsahuje rozpustené analyty, je následne vrátené späť do varnej banky a tento proces sa opakuje, kým nie sú požadované komponenty vyextrahované v minimálnom požadovanom množstve. Analyty sa získavajú odparením rozpúšťadla v tlakovej rotačnej odparke (Mohammad Azmin a kol., 2016).

Soxhletova extrakcia vyžaduje značné množstvo rozpúšťadla a dlhý čas v rade hodín. Odstránenie rozpúšťadla je pomerne finančne náročné a environmentálne nevýhodné. Metóda je vhodná len pre extrakciu termostabilných látok, nakoľko odstraňovanie rozpúšťadla musí byť pri bode varu daného rozpúšťadla. Najčastejšie sa používa ako extrahovadlo hexán s bodom varu 65 °C a s nežiadúcim environmentálnym dopadom. Ako alternatívne rozpúšťadlá sa používajú voda alebo metanol (Mohammad Azmin a kol., 2016; Azwanida NN, 2015).



Obrázok 11: Soxhletova aparátúra so znázornením toku pary a vyextrahovaných látok (upravené podľa Dabbs a kol., 2006).

### **Macerácia**

Macerácia je najjednoduchšia metóda extrakcie, ku ktorej je potrebné len rozpúšťadlo a príslušná matrica. Macerácia pozostáva z troch hlavných krokov. Ako prvé je potrebné rastlinu rozdrviť na malé častice tak, aby sa zvýšila styčná plocha s rozpúšťadlom. Tento krok majú spoločné všetky typy extrakcií. Druhý krok je zmiešanie rastlinnej matrice s rozpúšťadlom (Azmir a kol., 2013). Nádoba s rozpúšťadlom a vzorkou je ponechaná po určitú dobu pri laboratórnej teplote v klude. Bunkové steny prírodnej matrice sa v dôsledku pôsobenia rozpúšťadla oslabia a uvoľnia rozpustné bioaktívne látky do rozpúšťadla. V treťom kroku sa rozpúšťadlo odfiltruje od pevnej matrice (Azwanida NN, 2015).

Účinnosť macerácie je podmienená rozpúšťadlom, ktoré svojou polaritou určuje typ látok, ktoré sa budú extrahovať (Azwanida NN, 2015).

Maceráciou boli získavané extrakty z rastliny *Plectranthus amboinicus* napríklad v štúdiu Kumaran a Karaunakaran (2006), Khanum a kol. (2011), Bhatt a Negi (2012), Swamy a kol. (2017). Macerácia bola použitá aj pri optimalizácii extrakčného procesu pri získavaní polyfenolov zo sušenej arónie (*Aronia melanocarpa*) (Čujic a kol., 2016) alebo z materej dúšky (*Thymus serpyllum*) (Jovanović a kol., 2017).

### **Hydrodestilácia**

Hydrodestilácia je ďalšou tradičnou metódou extrakcie bioaktívnych látok, najmä pri získavaní esenciálnych olejov z rastlinných matric. Ako rozpúšťadlo sa používa voda a mechanizmus extrakcie je podobný ako pri Soxhletovej extrakcii. Vzorka spolu s vodou ako rozpúšťadlom sa umiestni do destilačnej banky, na ktorú sa pôsobí teplom a dochádza k vzniku vodnej pary. Vyextrahované esenciálne oleje sú unášané vodnou parou do chladiča, v ktorom skondenzujú a zbierajú sa v zbernej nádobe. V tejto nádobe sa na povrchu oddelí esenciálny olej a voda, ktoré sa od seba oddelia do separátnych nádob.

Táto metóda nie je vhodná pre termolabilné látky, na druhej strane je výhodné použitie pomerne finančne nenáročného extrakčného činidla (Mohammad Azmin a kol., 2016).

Hydrodestilácia sa pre prípravu esenciálneho oleja z rastliny *Plectranthus amboinicus* v laboratórnych podmienkach používa veľmi často, použili ju napríklad Murthy a kol. (2009), Da Costa a kol. (2010), Senthilkumar a kol. (2010), Gonçalves a kol. (2012), Hassani a kol. (2012), Erny Sabrina a kol. (2014), Aguiar a kol. (2015), Vasconcelos a kol. (2017).

#### **2.5.1.2 Nekonvenčné extrakčné metódy**

Rozvoj nekonvenčných extrakčných metód bol podmienený potrebou ekologickejších metód. Hlavným prínosom týchto metód je redukcia objemu rozpúšťadla a skrátenie času extrakcie (Wang, Weller, 2006).

### **Ultrazvuková extrakcia**

Ultrazvuková extrakcia (*UAE – Ultrasound Assisted Extraction*) poskytuje ekologickú, čistú extrakciu s mnohými výhodami. Je jednoduchá na manipuláciu, všestranná, flexibilná a v porovnaní s ostatnými nekonvenčnými metódami vyžaduje malé počiatkové investície. Používa sa na extrakciu rôznych molekúl a biomateriálov, vrátane polysacharidov, esenciálnych olejov, proteínov, peptidov, jemných chemikálií (bielidlá a farbivá) a bioaktívnych zlúčenín.

Ultrazvuková extrakcia sa vykonáva pri frekvenciách nad hranicou ľudského vnímania, t. j. nad 20 kHz, a zároveň pod hranicou mikrovlnných vln, t. j. pod 10 000 kHz. V rámci tohto rozmedzia sa ultrazvuková extrakcia môže ďalej deliť na nízko-intenzitnú a vysoko-intenzitnú (Tiwari, 2015).

Hlavnou hnacou silou ultrazvukovej extrakcie je vznik akustickej kavitácie. Prestupom ultrazvukových vln médiom dochádza ku kompresii a zriedeniu molekúl v médiu. Takáto striedavá zmena tlaku tvorí v médiu bubliny. Bubliny tlak dlho nevydržia a dochádza k ich prakticky okamžitej explózií. Táto tvorba bublín, ich následný rast a náhla explózia sú známe ako „akustická kavitácia“. Explóziou bublín a lokálnym zvýšením teploty dochádza k zúženiu a porušeniu bunkovej membrány a následne k rozpadu bunky, čím dochádza k uvoľneniu žiadaných zlúčenín do rozpúšťadla. Implózie kavitačných bublín vytvárajú aj mikroskopické turbulencie, vysokorýchlostné kolízie medzi časticami a dochádza k miešaniu v mikroporéznych časticiach matrice, čo urýchľuje difúziu.

Hlavné faktory, ktoré ovplyvňujú účinnosť ultrazvukovej extrakcie, sú charakteristiky ultrazvuku, charakter média (viskozita a povrchové napätie, rozpúšťadlo) a podmienky prostredia (teplota a tlak) (Tiwari, 2015; Azwanida NN, 2015).

Ultrazvuková extrakcia bola použitá v štúdií optimalizácie extrakčného procesu polyfenolov z rastliny *Thymus serpyllum* (Jovanović a kol., 2017).

### **Superkritická fluidná extrakcia**

Superkritická fluidná extrakcia (*SFE – Supercritical Fluid Extraction*) využíva ako rozpúšťadlo superkritickú tekutinu. Má podobnú rozpustnosť ako kvapalina a podobnú difúziu ako plyn a dokáže rozpustiť širokú škálu prírodných látok. Rozpustnosť prírodných látok sa dramaticky mení v blízkosti ich kritických bodov kvôli malým zmenám tlaku a teploty. Najčastejšie sa ako rozpúšťadlo používa superkritický oxid uhličitý ( $S\text{-CO}_2$ ), pretože má nízku kritickú teplotu ( $31\text{ }^\circ\text{C}$ ), je inertný, selektívny, netoxický, nízkonákladový a schopný vyextrahovať aj termolabilné látky. Vďaka nízkej polarite je  $S\text{-CO}_2$  vhodný k extrakcii nepolárnych prírodných látok ako sú napríklad lipidy a prchavé oleje. K superkritickým tekutinám sa môžu pridávať modifikátory pre zlepšenie ich extrakčných vlastností (Zhang a kol., 2018).

### **Mikrovlnná extrakcia**

Elektromagnetické žiarenie o vlnovej dĺžke  $1\cdot 10^{-9}$  mm až  $1\cdot 10^{-6}$  mm a o frekvencii od  $3\cdot 10^5$  MHz do  $3\cdot 10^2$  MHz je klasifikované ako žiarenie mikrovlnné. Pri prechádzaní mikrovln médiom dochádza k absorbovaniu energie a k jej transformácii na termálnu energiu. Vznik tepla je založený na dvoch javoch, na vodivosti iónov a dipólovej rotácii. Vodivosť iónov odkazuje na elektroforetickú migráciu nabitých vodičov (napr. ióny a elektróny) pod vplyvom elektrického poľa vytvoreného mikrovlnným žiarením. Vznikajúce „trenie“ medzi prúdom nabitých častíc a médiom spôsobuje vznik tepla. K dipólovej rotácii dochádza, keď sa viacero dipólových molekúl pokúsi nasledovať elektrický prúd v rovnakom smere. Kmitanie dipólových molekúl spôsobuje kolíziu medzi dipólovými a okolitými molekulami, a tým pádom dochádza k vzniku tepla (Zhang a kol., 2018).

Typické pre mikrovlnnú extrakciu (*MAE – Microwave Assisted Extraction*) sú nízky extrakčný čas a vysoké výťažky. Hlavné parametre, ktoré vplyvajú na tento typ extrakcie, sú frekvencia a výkon mikrovln, doba pôsobenia mikrovln, vlhkosť, veľkosť častíc rastlín, koncentrácia rozpúšťadla, navážka, teplota extrakcie, tlak extrakcie a počet extrakčných cyklov. Z toho najpodstatnejším faktorom je rozpúšťadlo, pretože od neho závisí absorpcia mikrovln. Rozpúšťadlo musí mať afinitu k extrahovaným látkam a musí absorbovať mikrovlnné žiarenie (Mohammad Azmin a kol., 2016).

Mikrovlnná extrakcia bola použitá pri optimalizácii extrakčného procesu polyfenolov z rastliny *Thymus serpyllum* (Jovanović a kol., 2017).

### **Vysokotlaká extrakcia rozpúšťadlom**

Vysokotlaká extrakcia rozpúšťadlom (*PFE – Pressurised Fluid Extraction, PSE – Pressurised Solvent Extraction, ASE – Accelerated Solvent Extraction*) je metóda, pri ktorej sa používa tlak v rozmedzí 10–100 MPa, často sa používa 15–20 MPa. Vykonáva sa pri zvýšených teplotách v rozmedzí najčastejšie 50–200  $^\circ\text{C}$ . Jedná sa o extrakčný systém pevná látka-kvapalina. Extrakcia sa vykonáva pri teplotách nad bodom varu rozpúšťadla, preto sa rozpúšťadlo udržiava v kvapalnom stave zvýšením tlaku, čím narastá aj efektívnosť a rýchlosť extrakcie (Mohammad Azmin a kol., 2016; Putnik a kol., 2018).

Proces extrakcie látok z matrice prebieha v troch fázach. V prvej fáze dochádza k zvyšovaniu tlaku z atmosférického na požadovaný. Tlak v bunke je veľmi malý oproti tlaku

okolía, čím dochádza k porušeniu rastlinných pletív, bunkových stien, membrán a organel, čo umožňuje prestup rozpúšťadla k matici a prestup rozpustných látok do rozpúšťadla (Giacometti a kol., 2018).

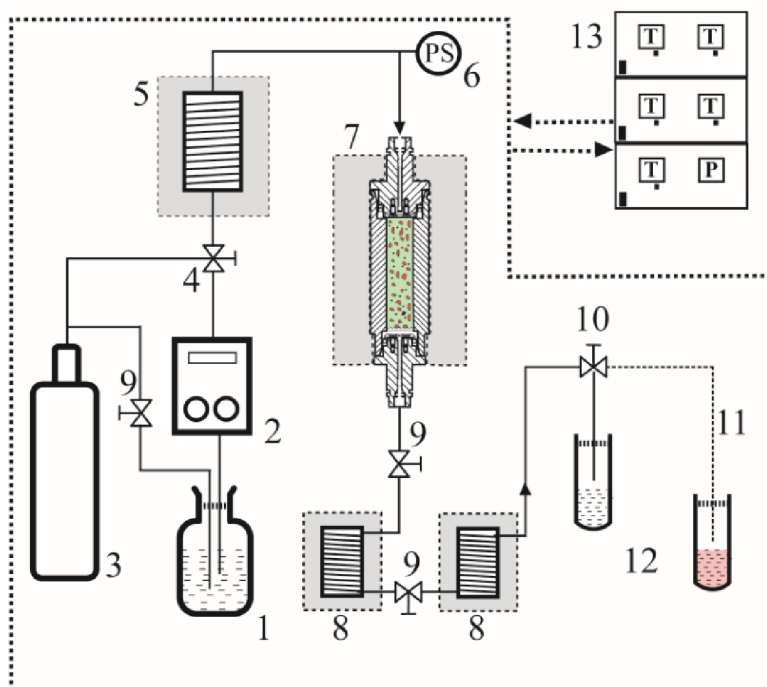
V druhej fáze, takzvanej fáze udržiavania tlaku, dochádza k udržiavaniu tlaku po určitý čas tak, aby sa vyrovnal tlak v bunkách a tlak v okolí. Výťažok extrakcie môže byť významne ovplyvňovaný práve v tomto bode (Huang a kol., 2013).

Tretia fáza trvá zvyčajne veľmi krátko, len niekoľko sekúnd. Dochádza k zníženiu tlaku, k poklesu tlaku v bunkách a k zmene nekovalentných väzieb. To vedie k explózií bunky s významným poškodením bunkovej membrány a následným zvýšením permeability a zníženou rezistenciou k difúzií a permeácií. Po znížení tlaku je potrebné zmes odseparovať a získaný extrakt purifikovať.

Pokiaľ je rozpúšťadlom voda, extrakcia sa označuje ako extrakcia stlačenou kvapalnou horúcou vodou (PHWE – Pressurised Hot Water Extraction) alebo subkritickou vodou, pokiaľ je extrakčná teplota vody pod kritickou teplotou bodu varu vody. Pre extrakciu je výhodné, že relatívna permitivita vody sa významne mení s narastajúcou teplotou, čo umožňuje použiť vodu pre extrakciu nepolárnych zlúčenín. Nespornou výhodou je, že voda je ekologicky a ekonomicky prijateľnejšia ako ostatné organické rozpúšťadlá (Pól a kol., 2007).

Okrem extrakcií sa vysoký tlak používa napríklad pri konzervovaní potravín, vrátane inaktívácie mikroorganizmov a enzýmov, kontroly fázových zmien, či zmene konformácie biopolymérov. Jednou z výhod pri použití vysokotlakého ošetrenia potravín je veľmi nízka zmena teploty (len 3 °C na každých 100 MPa), v následku čoho nedochádza k zmenám farby, chuti, textúry, vône či obsahu vitamínov v potravinách (Giacometti a kol., 2018).

PFE a PHWE boli napríklad použité pri extrakcií steviozidu z rastliny *Stevia rebaudiana* (Pól a kol., 2007). Azmir a kol. (2013) vo svojom „review“ článku uvádza ďalšie príklady použitia PFE pre extrakciu biologicky aktívnych látok z rastlín.



Obrázok 12: Extrakčná aparátúra PFE/PHWE. 1 – zásobník extrahovadla, 2 – vysokotlaká pumpa, 3 – dusík, 4 – hlavný kontrolný ventil, 5 – predohrev extrahovadla, 6 – tlakové čidlo, 7 – extrakčná patróna so vzorkou, 8 – chladiče, 9 – ventily, 10 – trojcestný ventil, 11 – restriktor (dynamický mód, v tomto prípade nevyužitý), 12 – zberná vialka, 13 – kontrolné jednotky teploty a tlaku. Šedé zóny indikujú časti s termostatmi (Pól a kol., 2007).

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

Extrakcia, pri ktorej sa využíva pôsobenie pulzného elektrického poľa (PEF – Pulsed Electric Field Assisted Extraction), je metóda, pri ktorej sa nepoužíva teplo. Bunky sú vystavené externému elektrickému poľu po krátku dobu (niekoľko nanosekúnd až milisekúnd) (Chemat a kol., 2017), čo v bunkách vyvolá určitú nestabilitu. Tlak spôsobený elektromechanickou kompresiou vytvára v membránach póry, čím dochádza k zvýšeniu permeability (Wouters a kol., 2001). Intracelulárne látky vďaka zvýšenej priepustnosti prechádzajú z buniek do okolitého rozpúšťadla.

Presný postup vzniku permeability buniek nie je známy, ale je všeobecne prijaté, že elektroporácia pozostáva zo 4 fáz (Saulis a kol., 2010): (a) externým elektrickým poľom sa zvýši transmembránový potenciál cytoplazmatickej membrány, (b) po dosiahnutí prahového transmembránového potenciálu (0,1–1,0 V) sa vytvárajú malé nestabilné hydrofilné póry, (c) počas pôsobenia PEF vzniká určité množstvo pór o určitých veľkostiach, (d) po pôsobení PEF nastáva stav so značným úbytkom intracelulárnych látok, vstup rozpúšťadla do bunky je buď ireverzibilnou elektroporáciou alebo reverzibilnou elektroporáciou s obnovou bunkovej membrány.

## **2.5.2 Metódy merania antioxidačnej aktivity**

Metódy merania antioxidačnej aktivity sú založené na rôznych princípoch, takisto ako samotná antioxidačná aktivita prebieha viacerými mechanizmami (viď kap. 2.3.1.1). Metódy merania sa rozlišujú aj podľa matrice, iné metódy sa používajú pri meraní antioxidačnej aktivity v potravinách a iné pri meraní v živých tkanivách. Najjednoduchšia a často využívaná inštrumentálna technika pre samotné stanovenie je UV-VIS spektrometria (viď kap. 2.5.3)

### **2.5.2.1 Metóda ORAC – Oxygen Radical Absorbance Capacity**

Peroxylový radikál reaguje s fluorescenčnou sondou za tvorby nefluoreskujúceho produktu. Táto metóda meria inhibičnú schopnosť antioxidantov voči peroxylovým radikálom a preto zodpovedá klasickej antioxidačnej aktivite narúšajúcej reťazovú reakciu transferom vodíka (Prior a kol., 2005).

Na generovanie peroxylových radikálov po zahriatí na 37 °C v prítomnosti dostatočného množstva činidla sa používa iniciátor AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropán)dihydrochlorid). Vzniknuté peroxylové radikály potom reagujú s fluorescenčnou sondou za tvorby nefluoreskujúceho produktu. Antioxidanty naopak chránia fluorescenčnú sondu pred stratou fluorescencie. Zníženie fluorescencie sa sleduje opticky a antioxidačná aktivita sa určuje spomalením straty fluorescencie v prítomnosti antioxidantu (Apak a kol., 2013). Ako fluorescenčná sonda sa používa fluoresceín (3',6'-dihydroxyspiro[izobenzofurán-1[3H], 9'[9H]-xantén]-3-ón) alebo dichlórfluoresceín (2',7'-dihydrochlorodihydrofluoresceindiacetát) (Prior a kol., 2005). K vyhodnoteniu celej metódy sa používa buď porovnanie plochy fluorescenčného signálu pod krivkou, kedy je plocha slepej vzorky nižšia než plocha vzorky obsahujúcej antioxidanty, alebo sa porovnávajú krivky vzorky s krivkami štandardu, najčastejšie sa používa ekvivalent Troloxu (Prior a kol., 2005).

ORAC metóda umožňuje stanoviť antioxidačnú aktivitu hydrofilných antioxidantov proti peroxylovým radikálom vo fyziologických systémoch ale aj v potravinách. Po úprave zdroja radikálov a rozpúšťadla sa metóda dá prispôsobiť aj na meranie antioxidačnej aktivity hydrofilných aj hydrofóbných antioxidantov (Prior a kol., 2005).

Variantou metódy ORAC je metóda TRAP, ktorá ale používa širšie rozmedzie iniciátorov, sond a koncových meraní (Apak a kol., 2013).

### **2.5.2.2 Metóda FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Potential**

Metóda FRAP je založená na princípe redoxnej reakcie, pri ktorej redukujú antioxidanty zo vzorky komplex  $\text{Fe}^{3+}$ -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazín) ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ). Nárast absorbancie pri 593 nm odpovedá množstvu vzniknutého komplexu  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ a je mierou antioxidantnej aktivity vzorky (Paulová a kol., 2004).

Metóda prebieha pri špecifických podmienkach, pH je nízke (3,6) z dôvodu udržania rozpustnosti železa. Nevýhodou je, že pri stanovení sa najčastejšie používa detekcia už po 4 minútach, čo však nesie riziko nezapočítania antioxidantnej aktivity polyfenolov (kyselina kávová, ferulová, askorbová alebo kvercetín) reagujúcich pomaly (Prior a kol., 2005). Metóda nie je schopná zmerať antioxidantnú aktivitu tiolov, ako je napríklad glutatión. Metóda sa zameriava len na redukujúcu schopnosť založenú na redukcii  $\text{Fe}^{3+}$  iónov, čo nemusí korelovať s celkovou antioxidantnou aktivitou (Paulová a kol., 2004). Metóda je však rýchla, jednoduchá, lacná, robustná a nevyžaduje žiadne špeciálne zariadenie (Prior a kol., 2005).

### **2.5.2.3 Metóda TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity**

Metóda je založená na schopnosti antioxidantov zhášať radikál kation ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis(3-etylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)). Radikál kation ABTS<sup>•+</sup> je intenzívne sfarbený a antioxidantná aktivita je meraná schopnosťou znižovať prítomnosť radikálu, a teda znižovať intenzitu zafarbenia. Pre spektrofotometrické stanovenie ABTS<sup>•+</sup> sa najčastejšie používa vlnová dĺžka 734 nm (Paulová a kol., 2004). Výsledky sú vyjadrené ako ekvivalent štandardu Trolox (Prior a kol., 2005).

Radikál kation ABTS<sup>•+</sup> sa v reakčnej zmesi generuje oxidáciou, enzýmovou alebo chemickou. Prevažne sa používajú enzýmové systémy ABTS/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /peroxidáza alebo ABTS/metmyoglobín/ $\text{H}_2\text{O}_2$ . Chemické oxidácie sa prevádzajú pomocou peroxidisiranu draselného alebo oxidu manganičitého (Paulová a kol., 2004; Prior a kol., 2005). Existujú dve možné metódy prevedenia experimentu, buď sa vzorka s antioxidantom pridáva do zmesi s už vytvoreným radikálom ABTS<sup>•+</sup> alebo sa vzorka pridáva priamo do zmesi a radikál sa vytvára za jej prítomnosti. Častejšie sa používa prídanie vzorky k radikálu, ktorý sa predom vytvorí pomocou peroxidázy.

Výhodou je, že táto metóda môže byť použitá v rôznom rozmedzí pH a umožňuje tak sledovať vplyv pH na antioxidantnú aktivitu. Radikál je tiež rozpustný vo vodných aj v organických rozpúšťadlách a nie je ovplyvňovaný iónovou silou, tým pádom je vhodný pre stanovenie hydrofilných aj lipofilných antioxidantov (Prior a kol., 2005).

### **2.5.2.4 DPPH test**

Radikál DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenyyl-1-pikrylhydrazyl) je stabilný radikál s fialovou farbou, je komerčne vyrábaný a nemusí sa teda generovať pred experimentom ako ABTS<sup>•+</sup>. Stanovenie spočíva v zhášaní jeho aktivity a v poklese absorbancie, čo sa meria spektrofotometricky pri 517 nm buď po uplynutí konkrétneho času, alebo sa pracuje v kinetickom režime. Reakciu je možné detekovať aj pomocou elektrónovej spinovej rezonancie (ESR) alebo HPLC, pri ktorej sa hodnotí pík DPPH, čo je výhodné hlavne pri zafarbených vzorkách (Paulová a kol., 2004). Táto metóda je jednoduchá na prevedenie a z prístrojov vyžaduje v základnom prevedení len UV-VIS spektrofotometer.

### **2.5.2.5 Folin-Ciocalteu metóda, stanovenie celkových fenolov**

Folin-Ciocalteu metóda (F-C) vychádza z Folin-Denisovej (F-D) metódy založenej na nepriamom stanovení celkovej koncentrácie proteínov meraním obsahu tyrozínu a tryptofánu. Princíp oboch metód je založený na reakcii medzi oxidačným činidlom a tyrozínom/tryptofánom za vzniku modrej farby úmernej ku koncentrácií proteínu. Hlavný

rozdiel medzi F-C a F-D metódou je pomer molybdénu používaného k príprave F-D činidla. F-C je viac citlivý a reprodukovateľný. Obe metódy boli modifikované a prispôbené k stanoveniu celkového obsahu fenolov (Sánchez-Rangel a kol., 2013).

F-C činidlo sa skladá z  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , HCl,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  a má žltú farbu. Pre zvýšenie pH a k optimálnemu priebehu reakcie sa pridáva uhličitan sodný. Za týchto podmienok dochádza k disociácii fenolických protónov a k tvorbe fenolátových iónov, ktoré reagujú s F-C činidlom (Sánchez-Rangel a kol., 2013). Vzniká modré sfarbenie, ktorého absorbanca sa meria pri 700–765 nm a celkový obsah fenolických látok sa vyjadruje ako ekvivalent kyseliny gallovej (Cicco a kol., 2009).

Táto metóda je jednoduchá a často sa používa pri stanovovaní botanických rastlín. Pri tejto metóde môže dochádzať k niekoľkým interferenciám s cukrami, aromatickými amínmi, oxidom siričitým, kyselinou askorbovou a ostatnými endiolmi a reduktónmi, organickými kyselinami a  $\text{Fe}^{2+}$ , na ktoré by sa mala prevádzať korekcia. Ostatné látky, ktoré reagujú s F-C činidlom sú adenín, adenosín, alanín, anilín, kyselina aminobenzoová, kyselina askorbová, benzaldehyd, kreatinín, cysteín, cytidín, cytozín, dimethylalanín, difenylamín, EDTA, fruktóza, guanín, guanozín, glycín, histamín, histidín, indol, metylamín, kyselina nitriloxová, kyselina olejová, kyselina fenylthiomočová, proteíny, pyridoxín, sukroza, kyselina sulfanilová, kyselina thiomočová, tymín, tymidín, trimetylamín, tryptofán, uracil, kyselina uracilová a xantín ale aj anorganické zlúčeniny (Prior a kol., 2005).

### 2.5.3 Molekulová absorbná spektrometria v oblasti UV-VIS

Molekulová absorbná spektrometria v oblasti UV-VIS je analytická spektrálna metóda, v praxi často využívaná pre jej jednoduchosť, všestrannosť, rýchlosť, presnosť a pre nízke náklady. Býva vymedzená obvykle vlnovými dĺžkami v ultrafialovej oblasti (*UV – Ultraviolet*) 180 až 380 nm respektíve viditeľnej oblasti (*VIS – Visible*) 380 až 780 nm.

Podstatou je absorpcia UV-VIS žiarenia, ku ktorej dochádza po vystavení molekúl (kvapalná vzorka) svetelnej energii. Pri absorpcii žiarenia dochádza k excitácii vonkajších (väzbových) elektrónov z molekulových orbitálov (Záruba a kol., 2016).

Využívané prístroje sú jednolúčové alebo dvojlúčové. Zdrojom žiarenia je obvykle deutériová výbojka pre UV oblasť a wolfrámová alebo wolfrám-halogénová lampa pre oblasť VIS. Obe oblasti pokrýva xenónová výbojka. Ako disperzný prvok sa používa difrakčná mriežka alebo monochromátor. Detektorom je obvykle fotonásobič, kremíková fotodióda alebo diódové pole. Pri meraní vzorky od 180 nm sa používajú kremenné kyvety, sklenené alebo plastové kyvety sú použiteľné v oblasti nad 300 nm (Záruba a kol., 2016).

Pri kvantitatívnom stanovení pomocou molekulovej absorbnéj spektrometrie sa využíva Lambert-Beerov zákon. Analyt je schopný absorbovať žiarenie o určitých frekvenciách, ktoré sú pre neho charakteristické. Prijatie energie molekulou zoslabí tok žiarenia zo zdroja, pričom tento pokles závisí na koncentrácií analytu a je charakterizovaný Lambert-Beerovým zákonom. Platí, že pri danej koncentrácií analytu dochádza k poklesu žiarivého toku s rastúcou hrúbkou absorbujúceho prostredia. Meria sa hodnota absorpcie, ktorá je vyjadrená ako záporný logaritmus transmitancie. Transmitancia je vyjadrená ako pomer žiarivého toku prepusteného a dopadajúceho žiarenia (Skoog a kol., 2019).

### 2.5.4 Metódy merania antimikrobiálnej aktivity

Pre preukázanie antimikrobiálnej aktivity esenciálnych olejov sa najčastejšie používajú konvenčné metódy. Existujú dve základné techniky:

- agarová difúzna metóda (disková/jamková)
- dilučná metóda (agar alebo tekuté médium).

Testovanie a vyhodnocovanie antimikrobiálnej aktivity esenciálnych olejov je obtiažne z dôvodu ich prchavosti, nerozpustnosti vo vode a komplexnosti. Špeciálne vlastnosti esenciálnych olejov vyžadujú určité modifikácie vyššie uvedených metód, ktoré boli primárne vyvinuté pre antimikrobiálne látky rozpustné vo vode. Esenciálne oleje majú hydrofóbne vlastnosti a vyššiu viskozitu. Tieto ich vlastnosti môžu spôsobovať problém pri dilúcii a spôsobovať nerovnomernú distribúciu oleja v médiu aj pri dokonalej disperzii alebo pri použití rozpúšťadla. Musí sa skontrolovať, či aplikované koncentrácie emulzifikátora alebo rozpúšťadla neovplyvňujú rast a diferenciaciu testovaných mikroorganizmov. Esenciálne oleje sú navyše veľmi komplexné zmesi prchavých látok. Dlhá inkubácia môže spôsobiť odparenie a dekompozíciu niektorých komponentov počas testovania, preto sa musia podmienky testovania prispôbiť tomuto fenoménu (Kalemba, Kunicka, 2003).

Testovacia kultúra mikroorganizmov je viazaná v živnom médiu, v optimálnych podmienkach pre jednotlivé druhy. Testovacie mikroorganizmy sa najčastejšie používajú zo zbierok medzinárodných čistých kultúr, ale dajú sa takisto použiť aj kultúry izolované z rôznych prostredí (napríklad klinickí pacienti, mlieko, syr, rastliny, chlieb alebo živočíchy). Mikroorganizmy musia dosiahnuť vhodnú rastovú fázu a musí sa použiť špecifické množstvo buniek (Kalemba, Kunicka, 2003).

Experimenty sa vždy opakujú 2 až 7 krát. Kultúry obsahujúce sledované vzorky sa porovnávajú s negatívnymi kontrolami kultúr, kde je vzorka nahradená vodou. Pozitívne kontroly kultúr s prídavkom antibiotík sa takisto často používajú ako kontrola citlivosti danej kultúry. Testy sterility sa vykonávajú len zriedkavo.

Rast mikroorganizmov sa môže vyhodnocovať vizuálne alebo inštrumentálne. Požíva sa turbidimetria, ktorou sa meria optická hustota rastúcej kultúry (Kalemba, Kunicka, 2003).

V oboch metódach sa odhad antimikrobiálnej aktivity vyjadruje tromi možnými spôsobmi:

- minimálna inhibičná koncentrácia (MIC – *Minimal Inhibitory Concentration*) – minimálna koncentrácia vzorky v médiu, ktorá obmedzí rast mikroorganizmov
- minimálna letálna koncentrácia (MLC – *Minimal Lethal Concentration*) – minimálna koncentrácia vzorky v médiu, ktorá usmrtí mikroorganizmy
- rastúci inhibičný index definovaný ako percentuálny pomer ku kontrolnej kultúre bez vzorky.

#### **2.5.4.1 Agarová difúzna metóda**

Táto metóda je v súvislosti s meraním antimikrobiálnej aktivity najviac rozšírená. Považuje sa za presnú a spoľahlivú, i keď z nej dostávame semikvantitatívne výsledky, podľa niektorých autorov nie vždy replikovateľné.

Podľa tejto metódy sa Petriho misky s priemerom 5–12 cm (najčastejšie 9 cm) naplnia 10 až 20 ml agarového média a sú inokulované mikroorganizmami. Inokulácia je možná dvomi spôsobmi, buď na papierový disk alebo do predom vytvorených jamiek v agarovom médiu.

Priemer Whatmanovho papierového disku/jamiek, množstvo sledovanej vzorky a druh disperzného rozpúšťadla sú dôležité parametre pre akúkoľvek variáciu tejto metódy. Esenciálny olej sa málokedy používa ako čistý esenciálny olej, najčastejšie sa používa v roztokoch. Pripraví sa rada Petriho misiek s rovnakým množstvom roztoku esenciálneho oleja v rôznych koncentráciách. Misky sú uchovávané rovnakú dobu, aby sa komponenty esenciálneho oleja uvoľnili a postupne prestúpili agarovým médiom, a následne sú inkubované.

Účinnosť esenciálnych olejov je vyjadrená veľkosťou inhibičnej zóny mikroorganizmov okolo disku/jamiek a zvyčajne sa vyjadruje ako priemer tejto zóny (mm/cm) (Kalemba, Kunicka, 2003).



Agarová difúzna metóda sa považuje za nie príliš vhodnú pre esenciálne oleje, pretože je vysoká pravdepodobnosť vyprchania látok s rozpúšťadlom počas inkubačnej doby, zatiaľ čo málo rozpustné látky nedokážu dostatočne prestúpiť agarovým médiom. I napriek tomu je to najčastejšie používaná technika kvôli jej jednoduchosti a malej spotrebe esenciálneho oleja. Odporúča sa použiť ju ako skríningovú pri viacerých esenciálnych olejoch (Kalemba, Kunicka, 2003).

#### **2.5.4.2 Dilučná metóda**

Dilučná agarová metóda sa používa pre baktérie a plesne, jej modifikácia s tekutým médiom sa používa najčastejšie pre plesne (Kalemba, Kunicka, 2003).

Kultúry s agarovým médiom sa kultivujú v Petriho miskách alebo tubách, kým kultúry kvapalného média sa kultivujú v kónických bankách naplnených 100 ml média alebo v testovacích skúmavkách s 2,5–5 ml média. Inhibičný efekt esenciálneho oleja v skúmavkách sa meria turbidimetricky alebo s počítačovou metódou (Kalemba, Kunicka, 2003).

#### **2.5.5 Metódy stanovenia aromaticky aktívnych látok v extraktoch z bylín**

Pre stanovenie aromaticky aktívnych látok je väčšinou nevyhnutná ich izolácia z matrice vzorky a prípadné zakoncentrovanie, k čomu možno použiť rôzne metódy, vrátane metód uvedených v kap. 2.5.1, v súčasnej dobe sa často používa mikroextrakcia tuhou fázou (Can Başer a kol., 2012).

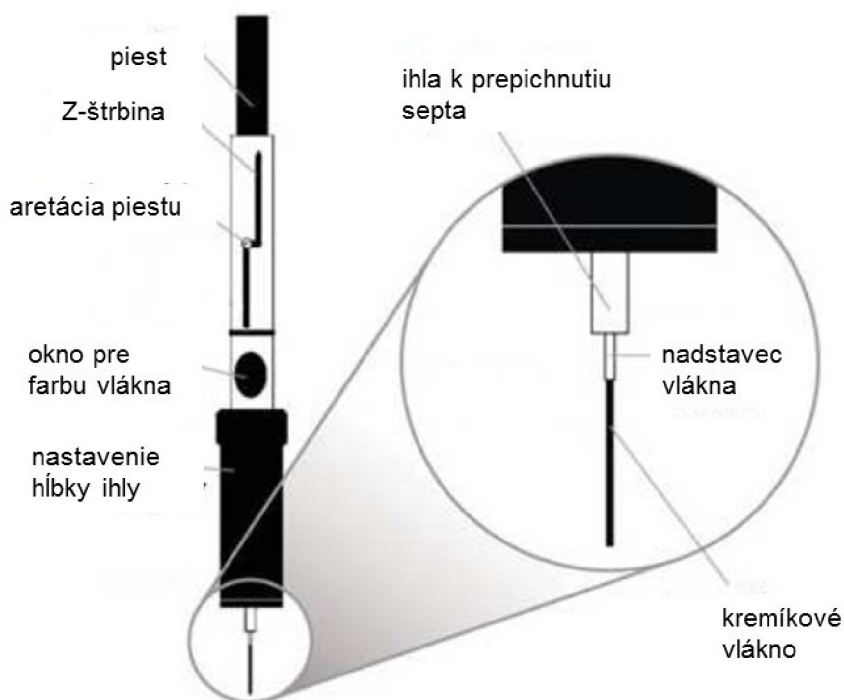
Pre ich analytické stanovenie je najvhodnejšia a najčastejšie používaná plynová chromatografia, väčšinou v spojení s hmotnostnou spektrometriou.

##### **2.5.5.1 Mikroextrakcia tuhou fázou**

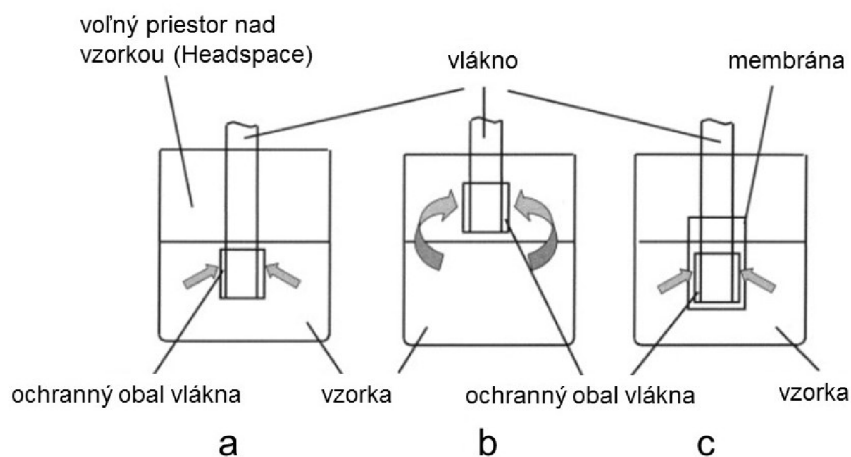
Metóda mikroextrakcie tuhou fázou (*SPME – Solid Phase Micro Extraction*) je vhodná pre pevné ale aj kvapalné vzorky. Princípom metódy je, že po zahriatí vzorky v dobre utesennej vialke dochádza k sorpcii analytov na kremenné vlákno pokryté vrstvou polyméru. Polymér tvorí stacionárnu fázu o rôznej polarite a sorpčných vlastnostiach. Kremenné vlákno o dĺžke 1 cm je spojené s piestom a je umiestnené v dutej oceľovej ihle, ktorá chráni vlákno pred mechanickým poškodením (viď Obrázok 13). Ihla s vláknom sa vysunie do priestoru, kde má dôjsť k sorpcii a po dosiahnutí rovnováhy sa vlákno zatiahne späť. Po tepelnej desorpcii v split/splitless injektore dochádza k premiestneniu analytov priamo do GC alebo GC-MS systému (Tranchida a kol., 2020).

SPME metóda sa používa ako pre kvantitatívne, tak aj pre kvalitatívne stanovenie. Výsledky môžu byť ovplyvnené hrúbkou sorpčnej vrstvy, charakterom sorpčnej vrstvy, miešaním vzorky, vysolovaním, vplyvom hodnoty pH a iné (Procházková, 2002).

Mikroextrakciu tuhou fázou je možné previesť tromi spôsobmi. Priamou extrakciou ponorením vlákna do vzorky, extrakciou z priestoru vo vialke nad vzorkou (*HS – Headspace*) a extrakciou s membránovou ochranou vlákna. Obrázok 14 zobrazuje rozdiely medzi týmito tromi spôsobmi. Headspace extrakcia je používaná najmä pre to, aby sa ochránilo vlákno pred poškodením vysokomolekulárnymi látkami, alebo neprchavými látkami prítomnými vo vzorke, ako sú napríklad proteíny. Pri tejto metóde je tiež možné modifikovať matricu vzorky (napríklad zmena pH) bez toho, aby sa poškodilo vlákno (Lord, Pawliszyn, 2000).



Obrázok 13: Zariadenie pre SPME (upravené podľa Lord, 2011).



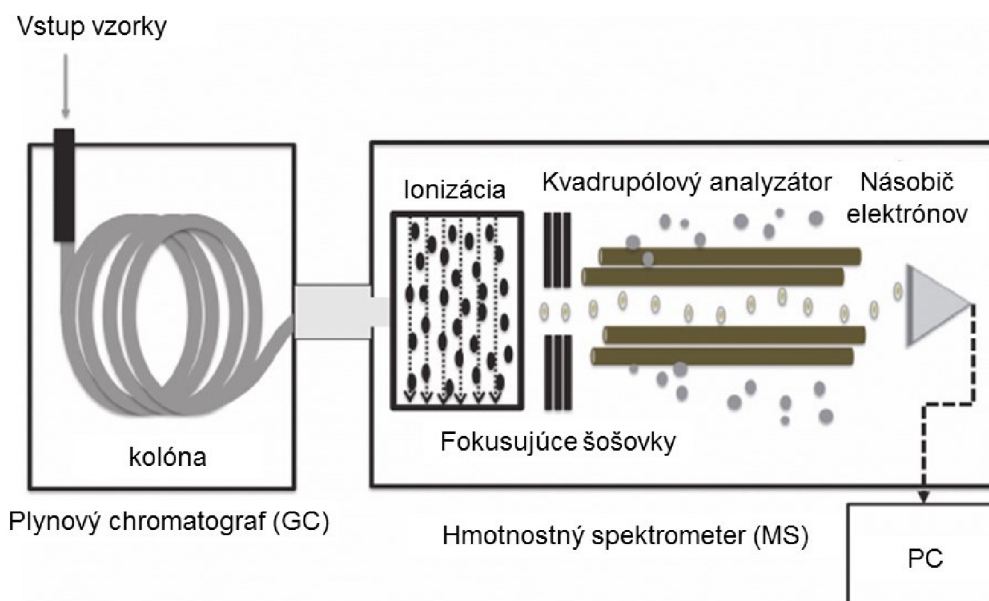
Obrázok 14: Metódy SPME: a – priama extrakcia ponorením vlákna do vzorky, b – headspace extrakcia, c – extrakcia s membránou (upravené podľa Lord, Pawliszyn, 2000).

### 2.5.5.2 Plynová chromatografia

Aromatické látky sa v extraktoch z bylín stanovujú najčastejšie plynovou chromatografiou. Plynová chromatografia je analytická separačná technika, pri ktorej sa distribuujú analyty medzi dve nemiešateľné fázy – mobilnú a stacionárnu. Mobilná fáza je nosný plyn, ktorý sa pohybuje skrz alebo pozdĺžne stacionárnou fázou umiestnenou v kolóne. Veľmi často sa k stanoveniu aromatických látok používa spojenie SPME-GC-MS, teda extrakcia z pevnej fázy spojená s plynovou chromatografiou a hmotnostnou spektrometriou. Pri neprchavých látkach sa dá takisto použiť metóda SPME, ale v tom prípade je nutné, aby sa sorbujúce vlákno ponorilo do vzorky.

Spojenie plynovej chromatografie (GC – Gas Chromatography) s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS) je bežnou súčasťou praxe analytickej chémie, potravinárskej

chémie, biológie či biochémie. Kombinácia plynového chromatografu a hmotnostného spektrometru umožňuje separovať a zároveň identifikovať zmes neznámych látok. Hmotnostná spektrometria (*MS – Mass Spectrometry*) je analytická metóda, ktorej princíp je rozlíšenie iónov podľa pomeru hmotnosti a náboja (efektívna hmotnosť,  $m/z$ ). Jednotlivé relatívne intenzity iónov sú zachytené a vďaka tomu je možná identifikácia vzorky pomocou hmotnostného spektra. Metóda vyžaduje malé množstvo vzorky a je vysoko citlivá. Spojenie GC-MS je uvedené na Obrázku 15. Používa sa výhradne spojenie kapilárnych kolón s chemickou alebo elektrónovou ionizáciou. Najbežnejšie používané detektory sú kvadrupólový analyzátor (*Q – Quadrupole*), iónová past (IT – *Ion Trap*) alebo analyzátor doby letu (*TOF – Time Of Flight*). Dominantnou výhodou spojenia GC-MS je možnosť porovnania nameraných spektier s knižnicou hmotnostných spektier (Holčapek, 2016).



Obrázok 15: Schéma spojenia GC-MS s kvadrupólovým analyzátorom (upravené podľa Kim a kol., 2016).

### 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

#### 3.1 Použité prístroje

- Spektrofotometer (Helios Gamma & Delta Spectronic Unicam, USA)
- Analytické digitálne váhy (GR-202-EC, HELAGO, Taliansko)
- Mikropipety (Hirschmann Laborgerate, Biohit)
- Vodný kúpeľ (Julabo TW 2, Nemecko)
- Vakuová rotačná odparka (KIKA®-WERKE-RVO6-ML, Nemecko)
- Plynový chromatograf Trace™ 1310 so split/splitless injektorom (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Hmotnostný detektor ISQ™ LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Knižnica spektier NIST/EPA/NIH (Gaithersburg, Maryland, USA)
- Vyhodnocovací systém Xcalibur 2.2 (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- PFE extrakčná aparátúra vyvinutá na Ústave analytickej chémie AVČR
- Bežné laboratórne sklo a vybavenie

#### 3.2 Použité chemikálie

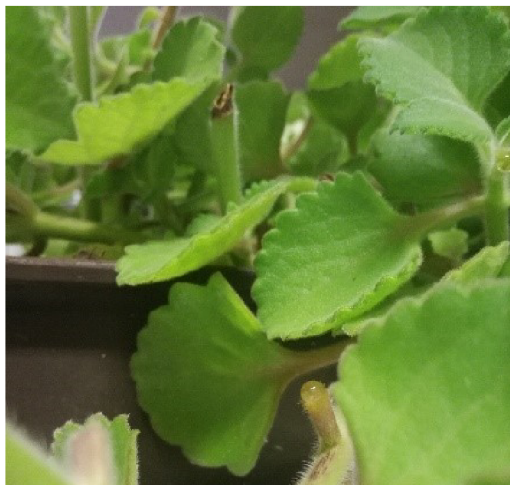
- Ethanol 96 % p.a. (Sigma-Aldrich, USA)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma-Aldrich, USA)
- Uhličitan sodný (Lachema, ČR)
- Kyselina gallová (Sigma-Aldrich, USA)

#### 3.3 Analyzované vzorky

V experimentálnej časti diplomovej práce boli analyzované vzorky rýmovníku (*Plectranthus amboinicus*) vypestovaného v laboratórnych podmienkach.

*Príprava vzorky:*

Pre experiment boli použité čerstvé listy rýmovníku, ktoré boli nasekané keramickým nožom na častice o veľkosti do 3 mm. Pre zabezpečenie väčšej homogenity vzorky rastliny bola pri navažovaní použitá metóda kvartácie (vid' Obrázok 16).



Obrázok 16: Analyzovaná vzorka rýmovníku a pohľad na kvartovanie pri navažovaní vzorky.

### 3.4 Získavanie extraktov

Pre získanie extraktov z rýmovníka v rámci tejto práce boli použité a porovnané dostupné metódy: macerácia, PFE a PHWE extrakcia.

#### 3.4.1 Macerácia

Požadované množstvo nasekanej vzorky rýmovníkových listov spolu s rozpúšťadlom bolo premiestnených do Erlnemayerových baniek, prikryté alobalom a ponechané buď pri laboratórnej teplote alebo vo vodnom kúpeli po určitú dobu. Ako rozpúšťadlo bola použitá voda a etanol v koncentráciách 20–96 %. Navážka rýmovníku na 100 ml rozpúšťadla bola 5–30 g, teplota extrakcie bola v rozmedzí 20–60 °C, čas extrakcie v rozmedzí 5 min–24 hod. Optimalizácia podmienok tohto procesu je hlavným cieľom práce a je bližšie popísaná v kap. 4.2.

Po ukončení procesu macerácie boli maceráty sfiltrované a uchované v mrazničke do ďalšej analýzy (maximálne 3 dni).

#### 3.4.2 Vysokotlaká extrakcia rozpúšťadlom

Vysokotlaká extrakcia rozpúšťadlom (PFE) bola vykonaná na extrakčnej aparatúre vyvinutej Ústavom analytickej chémie AVČR (viď Obrázok 12).

##### *Postup extrakcie:*

Bol navážený 1 g vzorky čerstvého nasekaného rýmovníku spolu s 10 g balotíny 6 (skelný piesok, 600–800 µm) a dostatočne spolu s 500 µl destilovanej vody premiešaný tak, aby sa vzorka nabalila na balotínu. Vzorka spolu s balotínou bola premiestnená do ocelevej patróny (11 ml) a vložená do prístroja. Polyfenolické látky boli extrahované pomocou zvoleného rozpúšťadla (40 % etanol) pri teplotách 40–120 °C s krokom 20 °C a pri tlaku 15 MPa. Doba extrakcie trvala 5 minút s následným preplachom s rozpúšťadlom (1 min) a dusíkom (1 min). Výsledný extrakt bol ihneď ochladený na 5 °C a skladovaný v mrazničke až do doby analýzy (maximálne 3 dni).

#### 3.4.3 Extrakcia stlačenou kvapalnou horúcou vodou

Extrakcia stlačenou kvapalnou horúcou vodou (PHWE) bola realizovaná na rovnakom extraktore ako PFE (viď Obrázok 12).

##### *Postup extrakcie:*

Postup navážky a umiestnenia ocelevej patróny do prístroja bol rovnaký ako pri PFE. Polyfenolické látky boli extrahované vodou zahriatou na teplotu 40–180 °C s krokom 20 °C a tlaku 15 MPa. Doba extrakcie trvala 5 minút s následným preplachom s rozpúšťadlom (1 min) a dusíkom (1 min). Výsledný extrakt bol ihneď ochladený na 5 °C a skladovaný v mrazničke až do doby analýzy (maximálne 3 dni).

### 3.5 Stanovenie vybraných vlastností extraktu

#### 3.5.1 Stanovenie koncentrácie celkových polyfenolov

Celkový obsah polyfenolických zlúčenín bol stanovený spektrofotometricky Folin-Ciocalteu metódou. Kvantifikácia bola prevedená na základe kalibračnej krivky (viď Graf 1) a výsledky vyjadrené ako ekvivalent kyseliny gallovej (*GAE – Gallic Acid Equivalent*).

#### Príprava kalibračnej krivky:

Bol použitý štandardný roztok kyseliny gallovej o koncentrácií 0,1–0,5 mg·ml<sup>-1</sup>. Absorbancia bola meraná pri 750 nm oproti slepej vzorke.

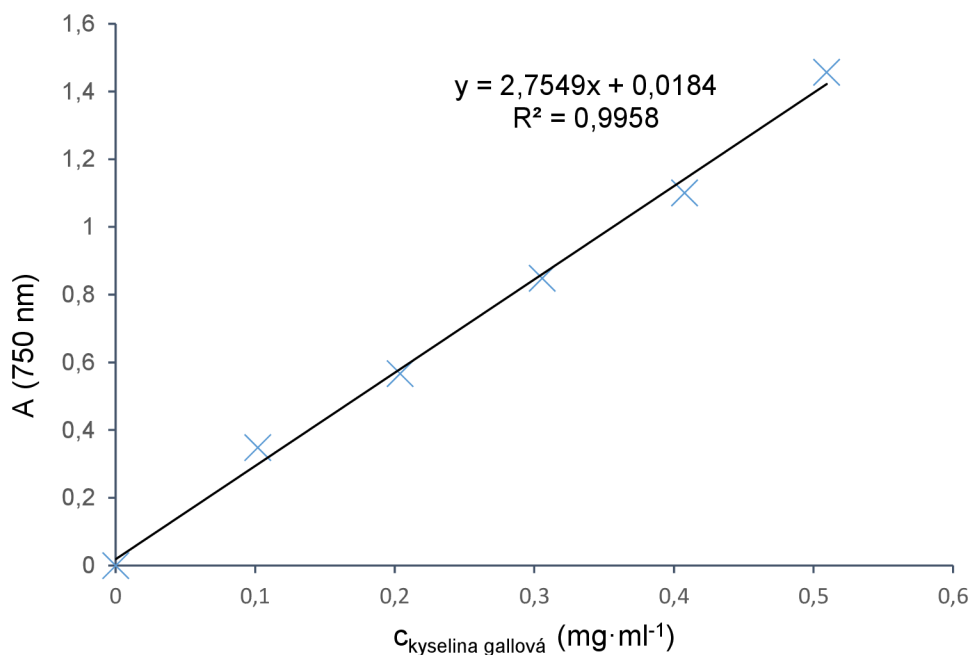
#### Postup stanovenia:

Pred stanovením bol pripravený čerstvý nasýtený roztok uhličitanu sodného a zriedený roztok Folin-Ciocalteuovho činidla v pomere 1:9.

Do skúmaviek bolo postupne napipetovaných 1 ml destilovanej vody, 100 µl vzorky (v prípade slepej vzorky destilovaná voda), 1 ml zriedeného Folin-Ciocalteuovho činidla a vzorka bola premiešaná pomocou vortexu. Po piatich minútach bol k vzorkám napipetovaný 1 ml nasýteného roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a opäť boli vzorky premiešané. Vzorky boli ponechané 45 minút v tme, následne opäť premiešané a pomocou UV-VIS spektrofotometra bola stanovená absorbancia jednotlivých vzoriek pri 750 nm proti slepej vzorke.

Pre výpočet koncentrácie bola použitá kalibračná krivka zostavená pre štandardný roztok kyseliny gallovej o koncentracii 0,1–0,5 mg·ml<sup>-1</sup>.

Koncentrácia celkových polyfenolov vo vzorkách bola prepočítaná na mg ekvivalentu kyseliny gallovej na gram rastliny (mg<sub>GAE</sub>·g<sup>-1</sup>).



Graf 1: Kalibračná krivka – závislosť absorbancie kyseliny gallovej na jej koncentrácii.

### 3.5.2 Stanovenie aromatických látok

Pre stanovenie aromatických látok prítomných jednak v samotnej rastline, ale aj v získaných extraktoch, bola použitá metóda headspace mikroextrakce tuhú fázou v spojení s plynovou chromatografiou s hmotnostnou detekciou (HS-SPME-GC-MS).

#### Postup stanovenia:

Pri stanovení aromatických látok v samotnej rastline boli listy rastliny nakrájané keramickým nožom na častice o veľkosti 1–3 mm. Do vialky o objeme 4 ml bolo navážené 0,5 g takto pripravenej vzorky a vialka bola uzavretá kovovým uzáverom so vzduchotesným kaučuk-teflonovým septom. Pri analýze extraktov bol do vialky napipetovaný objem 3 ml

získaného extraktu. Vialka bola umiestnená do autosampleru a následne bola pomocou programu Xcalibur 2.2 spustená analýza s parametrami uvedenými v Tabuľke 2. K identifikácii látok bolo použité porovnanie retenčných časov a hmotnostných spektier s internou a externou knižnicou. Obsah jednotlivých látok prítomných v rastline alebo extrakte bol vyjadrený semikvantitatívne na základe plôch píkov meraných v režime úplného skenu (30-370 m/z).

Tabuľka 2: Podmienky HS-SPME-GC-MS analýzy.

Podmienky SPME extrakcie	
Doba inkubácie (temperovanie)	10 minút
Teplota extrakcie a inkubácie (teplota agitátoru)	40 °C
Agitátor zapnutý	5 sekúnd
Agitátor vypnutý	60 sekúnd
Podmienky GC-MS analýzy	
Kapilárna kolóna	TG-WaxMS
Rozmery kolóny	30 m x 0,25 mm x 0,5 µm
Teplota injektora (desorpcia)	240 °C
Doba desorpcie	20 minút
Dávkovanie splitless, ventil uzavretý 10 minút	
Nosný plyn	hélium
Prietok nosného plynu	1 ml/min
Teplotný program	40 °C s výdržou 1 min., vzostupný gradient 5 °C/min do 220 °C s výdržou 22 minút
Celková doba analýzy	60 minút
Hmotnostný detektor v móde elektrónovej ionizácie	
Energia ionizačných elektrónov	70 eV
Teplota iónového zdroja	200 °C
Skenovací rozsah m/z	30–370 amu
Rýchlosť skenovania	0,2 s

### 3.5.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity získaného extraktu

Antioxidačná aktivita bola stanovená metódou používajúcou radikálový kation ABTS<sup>•+</sup>.

#### Príprava ABTS<sup>•+</sup>:

Rozpustením ABTS v destilovanej vode bol pripravený roztok ABTS o koncentracii 7 mmol·l<sup>-1</sup>. Reakciou s 2,45 mmol·l<sup>-1</sup> peroxidisíranom draselným bol pripravený radikálový kation ABTS<sup>•+</sup>. Vzniknutý roztok bol ponechaný v tme po dobu 12 hodín.

#### Postup stanovenia:

ABTS<sup>•+</sup> bol pred použitím zriedený 60% etanolom na absorbanciu 0,7 ± 0,02 pri 734 nm (merané proti etanolu pri UV-VIS) a následne bol používaný len tento roztok.

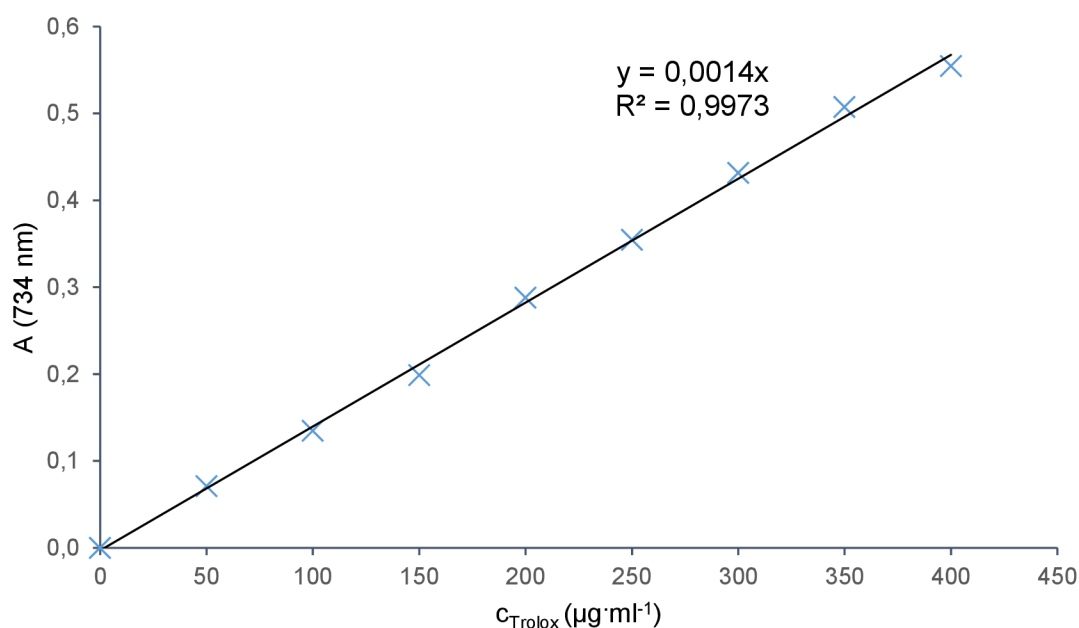
Do kyvety bolo napipetovaných 1 ml zriedeného ABTS<sup>•+</sup> a 10 µl destilovanej vody a ihneď bola zmeraná absorbancia v čase 0 ( $A_t = 0$ ). Do ďalšej kyvety bolo napipetovaných 1 ml zriedeného ABTS<sup>•+</sup> a 10 µl vzorky. Vzorka bola premiešaná a ponechaná v tme. Po 10 minútach (v čase  $A_t = 10$ ). Absorbancia bola stanovená výpočtom – vid' (1). Zároveň bolo vypočítané aj percento zhášania radikálu podľa vzorca (2).

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

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

*Príprava kalibračnej krivky:*

Bola použitá kalibračná krivka Troloxu v rozmedzí koncentrácií 50–400  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Štandard Troloxu bol rozpustený v 60% etanole a bola zmeraná jeho kalibračná závislosť absorbancie na koncentrácií. Výsledky sú vzťahnuté na ekvivalentné množstvo Troloxu, jednotka TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). Boli vyjadrené ako  $\mu\text{g}_{\text{TEAC}}\cdot\text{ml}^{-1}$ .



Graf 2: Kalibračná krivka – závislosť absorbancie Troloxu na jeho koncentrácií.

### 3.6 Štatistické spracovanie výsledkov

Výsledky boli spracované a vyhodnotené pomocou programu MS Excel 2016 a programom STATISTICA 13 a sú vyjadrené v tvare priemer  $\pm$  smerodatná odchýlka. Všetky merania boli prevedené trikrát ( $n = 3$ ).

Experiment bol navrhnutý a vygenerovaný pomocou štatistického programu STATISTICA 13. Pre zistenie rozdielov medzi vzorkami bola použitá parametrická jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA – Analysis of Variance) s využitím Tukeyho HSD-testu, všetko štatistické testovanie bolo prevedené na hladine štatistickej významnosti  $\alpha = 0,05$ .



## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tato práca je súčasťou rozsiahlej štúdie, ktorá sa zaoberá možnosťou získavania extraktov biologicky aktívnych látok z vybraných druhov prírodných rastlinných materiálov a ich aplikáciou do potravín, kozmetických a iných výrobkov.

Podstatou tejto práce bola optimalizácia podmienok pre zisk extraktu z rýmovníku (*Plectranthus amboinicus*) so zachovaním pokiaľ možno maxima nutrične a senzoricky cenných zložiek. Získaný extrakt bol charakterizovaný jednak z hľadiska antioxidantnej aktivity, resp. celkového obsahu polyfenolov ako dominantných biologicky aktívnych zlúčenín s antioxidantným potenciálom, a jednak z hľadiska profilu prchavých (aromatických) látok ako markerov senzorickej kvality.

### 4.1 Multivariačná optimalizácia extrakcie

Výťažnosť extrakcie a kvalitu získaných extraktov účinných látok ovplyvňuje celá rada faktorov, ako najdôležitejšie možno uviesť – typ použitého rozpúšťadla, pomer hmotnosti (objemu) vzorky a rozpúšťadla, úprava matrice vzorky (čerstvé, sušené), homogenizácia (veľkosť častíc) vzorky, použitá extrakčná metóda, pH, teplota a doba extrakcie. Pre zisk kvalitného extraktu je potrebné všetky tieto faktory optimalizovať.

Optimalizáciu možno previesť pomocou tzv. jednorozmernej analýzy dát, ktorej princíp spočíva v tom, že sa mení vždy jeden parameter v čase a sleduje sa jeho vplyv na výsledok, ostatné parametre zostávajú behom experimentu konštantné, tzv. metóda OFAT (One Factor at Time) (Meloun, Militký, 2006). Tento klasický postup je však časovo náročný a navyše neumožňuje určiť, čo sa stane v prípade súčasnej variability viacerých parametrov.

K tomuto účelu možno použiť metódu plánovania (riadenia) experimentu (*DOE – Design of Experiments*). Táto metóda umožňuje študovať vplyv viacerých nezávislých premenných (a ich interakcií) na závislú premennú. Umožňuje meniť všetky parametre súčasne a stanoviť optimálne pracovné podmienky. Jedná sa o matematickú štatistickú metódu, pomocou ktorej sa prevedením malého počtu pokusov (za predom definovaných podmienok) vyberú tie podmienky, ktoré sú pre skúmaný proces významné, ostatné sú potom zanedbané. Veľkou výhodou je zníženie počtu vlastných experimentov, a tým úspora času aj nákladov na ich realizáciu.

Štatistické spracovanie dát spočíva v nájdení takej kombinácie hodnôt jednotlivých faktorov, aby bola odozva optimálna. Toto spracovanie je z väčšej časti založené na regresnej analýze a na analýze rozptylu (*ANOVA – Analysis of Variance*) (Meloun, Militký, 2006).

V súčasnosti sa metóda DOE pri optimalizácii extrakčných metód pomerne často používa. Napríklad Noriega a kol. (2012) použili túto metódu pri extrakcii flavonoidov z *Passiflora alata* a *P. edulis*. Faktory, ktoré sledovali, boli pomer použitých rozpúšťadiel (voda:etanol) a typ extrakcie – perkolácia alebo macerácia. Výsledkom bolo, že najväčší vplyv má rozpúšťadlo v rozmedzí koncentrácií 50–70 %.

Čujic a kol. (2016) vo svojom výskume pri získavaní polyfenolov zo suchých plodov arónie takisto použili metódu DOE. Použili úplný faktorový návrh  $2^4$ , sledovali vplyv 4 faktorov – typ rozpúšťadla, veľkosť častíc vzorky, pomer vzorka/rozpúšťadlo a doba extrakcie. Použili maceráciu ako jednoduchú a účinnú metódu pre zisk extraktov, hlavné ovplyvňujúce faktory boli veľkosť častíc vzorky a pomer vzorka/rozpúšťadlo.

Jovanović a kol. (2017) použili metódu DOE pri optimalizácii extrakcie polyfenolov z materinej dúšky (*Thymus serpyllum*). Optimalizovali a porovnávali 3 metódy extrakcie – macerácia, ultrazvuková extrakcia a mikrovlnná extrakcia, sledovali vplyv tých istých 4

faktorov – typ rozpúšťadla, veľkosť častíc vzorky, pomer vzorka/rozpúšťadlo a doba extrakcie. Pri všetkých 3 metódach boli významné faktory typ rozpúšťadla, veľkosť častíc vzorky a pomer vzorka/rozpúšťadlo, ako najvhodnejšia a najúčinnějšía pre daný účel sa ukázala byť ultrazvuková extrakcia.

## 4.2 Získavanie extraktov z rýmovníka maceráciou

Prvé extrakty boli pripravené najjednoduchšou, no i napriek tomu často používanou metódou – maceráciou (Kumaran, Karaunakaran, 2006; Khanum a kol., 2011; Bhatt, Negi, 2012; Čujić a kol. 2016; Swamy a kol., 2017).

Pri optimalizácii macerácie bola využitá štatistická metóda DOE. Ako už bolo spomenuté, princípom tejto metódy je správne navrhnúť a následne štatisticky vyhodnotiť model experimentu s cieľom čo najviac znížiť počet potrebných meraní a spotrebovaného materiálu. Tento princíp sa dnes veľmi často používa v technologickej, ale aj výskumnej praxi (Noriega a kol., 2012; Čujić a kol., 2016; Jovanović a kol., 2017).

Prvým krokom pri plánovaní experimentu je stanovenie sledovanej premennej (odozvy) – v tomto prípade bol zvolený obsah polyfenolických látok. Ďalej je potrebné zvoliť variabilné charakteristiky (faktory) a rozsah ich variability – teda reálne rozmedzie, v ktorom sa nastavenie jednotlivých parametrov môže meniť a kde môžu nastať potenciálne vzájomné interakcie. Volia sa dve krajné hodnoty každého faktoru (v kódovacom jazyku -1, +1), prípadne sa pre zníženie šumu volí ešte centrálny bod (v kódovacom jazyku 0). Z faktorov výrazne ovplyvňujúcich proces extrakcie a vlastnosti získaného extraktu boli pre experimentálny dizajn v tejto práci vybrané 4 parametre (faktory) – typ rozpúšťadla, pomer navážka/rozpúšťadlo, teplota a doba extrakcie, resp. macerácie. Hlavnou prioritou bolo získanie extraktu s maximálnym obsahom polyfenolických látok.

Rozsah variability vybraných parametrov bol skúmaný pomocou vyššie uvedenej jednorozmernej analýzy v rámci predbežného skriningového experimentu. Zistené maximálne a minimálne hodnoty jednotlivých faktorov boli ďalej použité k multivariačnej optimalizácii extrakcie/macerácie.

### 4.2.1 Úvodný skrining vplyvajúcich faktorov

Každý zo štyroch faktorov bol najprv podrobený tzv. skriningu, kedy bol sledovaný trend faktorov vplyvajúcich na sledovanú odozvu (celkový obsah polyfenolov) v získanom extrakte.

Boli vždy vykonané tri paralelné macerácie, každý macerát bol trikrát zmeraný pomocou spektrofotometru ( $n = 9$ ).

Skrining jednotlivých faktorov bol vyhodnotený pomocou štatistickej metódy analýzy rozptylu. Analýza rozptylu je postavená na dvoch základných hypotézach. Hypotéza  $H_0$  predpokladá, že rozdiely medzi vzorkami (nameranými úrovňami) nie sú štatisticky významné. Hypotéza  $H_1$  predpokladá opak – medzi nameranými úrovňami sú štatisticky významné rozdiely. Alternatívna hypotéza  $H_1$  platí, ak hodnota  $p < 0,05$  a  $F > F_{krit.}$  (Meloun, Militký, 2006). Interval spoľahlivosti bol nastavený na 95 %. Pre rozdelenie sledovaných úrovní do skupín, medzi ktorými je štatisticky významný rozdiel, bol použitý Tukeyho test.

Vzhľadom k tomu, že v rámci rešerše nebola nájdená publikácia, ktorá by sa priamo zaoberala získavaním macerátov a optimalizáciou tohto procesu z rýmovníka, výsledky boli porovnávané so štúdiou Jovanović a kol. (2017), ktorá sa zaoberala podobným experimentom, ale aplikovaným na materinu dúšku (*Thymus serpyllum*), patriacu taktiež do čeľade hluchavkovitých.

Výsledkom skriningového experimentu boli minimálne a maximálne hodnoty jednotlivých faktorov, použité pre vygenerovanie modelu podľa DOE.

#### 4.2.1.1 Vplyv navážky rastlinného materiálu na celkový obsah polyfenolov

Bol testovaný vplyv navážky vzorky, presnejšie pomeru hmotnosti vzorky k objemu rozpúšťadla. Navážka bola testovaná v rozmedzí 5–30 g s krokom 5 g na 100 ml rozpúšťadla, čo je v prepočte na pomer navážka/rozpúšťadlo 1:20; 1:10; 1:6,67; 1:5; 1:4 a 1:3,34.

Ostatne faktory boli nastavené takto:

- teplota: laboratórna (20 °C)
- doba macerácie: 30 minút
- rozpúšťadlo: 40% etanol.

Získané hodnoty koncentrácie polyfenolov boli spriemerované ( $n = 9$ ) a sú uvedené v Tabuľke 3 a Grafe 3. Možno pozorovať, že koncentrácie polyfenolov sa pohybovali v rozsahu od  $0,34 \pm 0,09 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  do  $0,72 \pm 0,14 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Pomocou štatistickej metódy analýzy rozptylu bolo zistené, že medzi nameranými hodnotami jednotlivých extraktov je štatisticky významný rozdiel ( $p < 0,0000$ ,  $F(14,32) > F_{\text{krit}}(2,53)$ ), čo znamená, že pomer navážka/rozpúšťadlo má významný vplyv ( $p < 0,05$ ) na obsah polyfenolov v extrakte.

Pomocou Tukeyho testu boli jednotlivé výsledky rozdelené do troch homogénnych skupín, medzi ktorými je štatisticky významný rozdiel. Na základe tohto rozdelenia boli vybraté dve krajné hodnoty (-1 a +1), v ktorých je najvyššia koncentrácia polyfenolov.

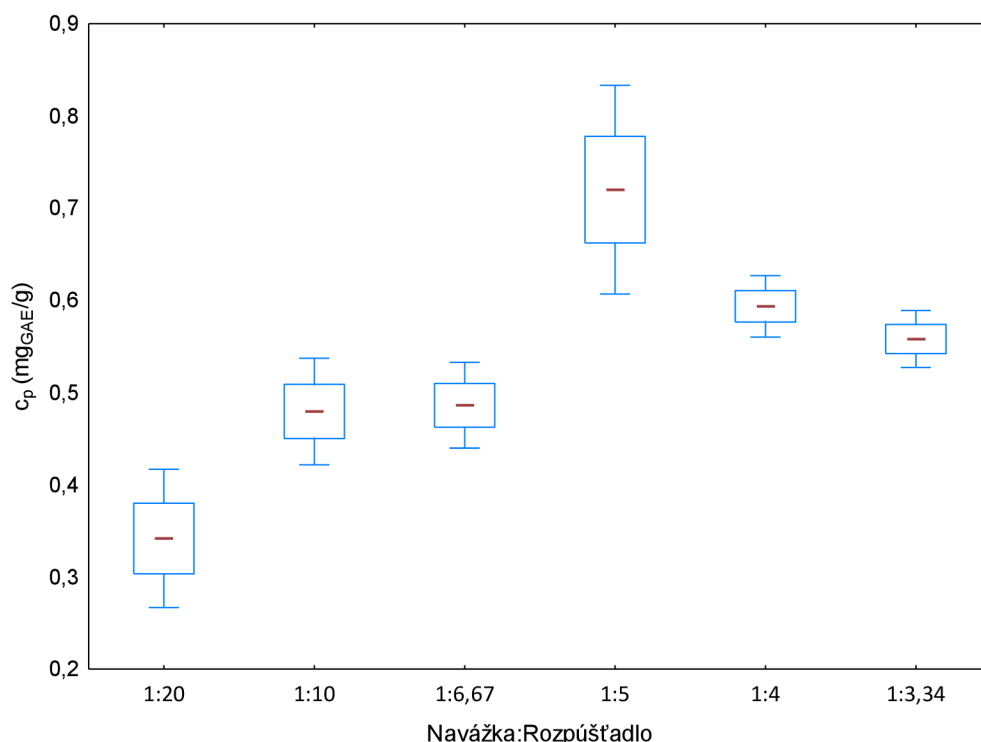
Podľa štúdie Jovanović a kol. (2017) sa výťažok celkových polyfenolov znižoval s nižším objemom rozpúšťadla, resp. väčším množstvom vzorky, čo pripisovali zvýšeniu viskozity a následnému zhoršeniu difúzie polyfenolov extrakčným médiom. Ako je vidieť v Grafe 3, v tomto prípade podobný trend nebol pozorovaný, max. výťažok bol dosiahnutý pri pomere 1:5 a 1:4. Medzi nimi však podľa Tukeyho testu nie je významný rozdiel, takisto ako pri treťom najvyššom výťažku (1:3,34). Ako štatisticky významne odlišný sa ponúka až pomer 1:20, kde bol však získaný najnižší výťažok polyfenolov. Z tohoto dôvodu, a taktiež vzhľadom k menšej spotrebe rozpúšťadla, a v neposlednom rade kvôli zahrnutiu širšieho rozmedzia krajných hodnôt, bol nakoniec zvolený pomer 1:10.

Ako krajné hodnoty tohto faktoru teda boli vybrané hodnoty pomerov 1:5 (+1) a 1:10 (-1). V plánovanom experimente bolo následne z dôvodu použitia príslušného štatistického programu využité vyjadrenie 20 g (+1) a 10 g (-1) na 100 ml rozpúšťadla (viď Tabuľka 7).

Podľa Jovanović a kol. (2017) bola zvolená spodná hodnota -1 pomer 1:20 a horná hranica +1 pomer 1:30, čo súvisí s ich vyššie zmieneným zistením, že obsah polyfenolov sa znižoval s nižším objemom rozpúšťadla. Pracovali však s väčšími objemami rozpúšťadla, než v našom prípade (testované rozmedzie 1:10–1:30), navyše so sušenou rastlinou, a teda obsah polyfenolických látok mohol byť koncentrovanejší, takisto mohli byť menšie častice, tým pádom väčší povrch.

Tabuľka 3: Celkový obsah polyfenolov a rozdelenie do homogénnych skupín, sledovaný faktor pomer navážky a rozpúšťadla. Hodnoty označené iným písmenom (a, b, c) sa podľa Tukeyho testu štatisticky významne líšia ( $p < 0,05$ ).

Navážka:Rozpúšťadlo	$C_{\text{polyfenoly}} \text{ (mg}_{\text{GAE}}\cdot\text{g}^{-1})$	Minimum ( $\text{mg}_{\text{GAE}}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Maximum ( $\text{mg}_{\text{GAE}}\cdot\text{g}^{-1}$ )
1:20	$0,34\mathbf{a} \pm 0,09$	0,20	0,47
1:10	$0,48\mathbf{ab} \pm 0,07$	0,36	0,55
1:6,67	$0,49\mathbf{ab} \pm 0,06$	0,40	0,55
1:5	$0,72\mathbf{c} \pm 0,14$	0,57	0,92
1:4	$0,59\mathbf{bc} \pm 0,04$	0,54	0,64
1:3,34	$0,56\mathbf{b} \pm 0,04$	0,52	0,61



Graf 3: Celkový obsah polyfenolov v  $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ , skúmaný faktor pomer navážky a rozpúšťadla.

#### 4.2.1.2 Vplyv teploty extrakcie/macerácie na celkový obsah polyfenolov

Pre testovanie vplyvu teploty bolo zvolené rozmedzie 20–60 °C, požadovaná teplota bola udržiavaná pomocou temperovaného vodného kúpeľa. Ostatné faktory boli nastavené takto:

- navážka:rozpúšťadlo: 1:10
- doba macerácie: 30 minút
- rozpúšťadlo: 40% etanol.

Získané hodnoty koncentrácie polyfenolov boli sprimerované ( $n = 9$ ) a sú uvedené v Tabuľke 4 a Grafe 4. Možno pozorovať, že sa pohybovali v rozsahu od  $0,59 \pm 0,08 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  do  $1,55 \pm 0,09 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Pomocou štatistickej metódy analýzy rozptylu bolo zistené, že medzi nameranými hodnotami jednotlivých extraktov je štatisticky významný rozdiel ( $p < 0,0000$ ,  $F(121,44) > F_{\text{krit}}(2,90)$ ), čo znamená, že teplota má významný vplyv ( $p < 0,05$ ) na obsah polyfenolov v extrakte. Toto tvrdenie možno podporiť aj štúdiou od Santos a kol. (2016).

Pomocou Tukeyho testu boli výsledky rozdelené do 3 homogénnych skupín, medzi ktorými je štatisticky významný rozdiel. Na základe tohto rozdelenia boli vybraté dve krajné hodnoty (-1 a +1), v ktorých je najvyššia koncentrácia polyfenolov.

Všeobecne možno pri vyššej teplote očakávať vyšší výťažok biologicky účinných látok vzhľadom k porušeniu bunkových štruktúr (Mustafa, Turner, 2011), na druhú stranu sa však neodporúča príliš dlhá doba a zvýšená teplota pri extrakcii, nakoľko môže dochádzať k degradácií alebo enzymatickej oxidácií fenolických látok.

Ako je zreteľné z Grafu 4, s vyššou teplotou macerácie sa naozaj výťažok zvyšuje, najvyšší výťažok bol nameraný pri teplote 60 °C, ktorá bola zvolená ako horná hranica tohto faktoru (+1). Ako spodná hranica bola zvolená teplota 30 °C (-1) (viď Tabuľka 7), kde bol nameraný obsah polyfenolov  $0,90 \pm 0,18 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ . Pri teplote 50 °C bol síce nameraný mierne vyšší obsah ( $1,02 \pm 0,05 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ ), podľa Tukeyho testu, ako možno vidieť v Tabuľke 4, patria teploty 30 °C a 50 °C do jednej homogénnej skupiny, a teda medzi nimi nie je štatisticky významný rozdiel. Keď sa zoberú do úvahy prípadné ekonomické náklady,

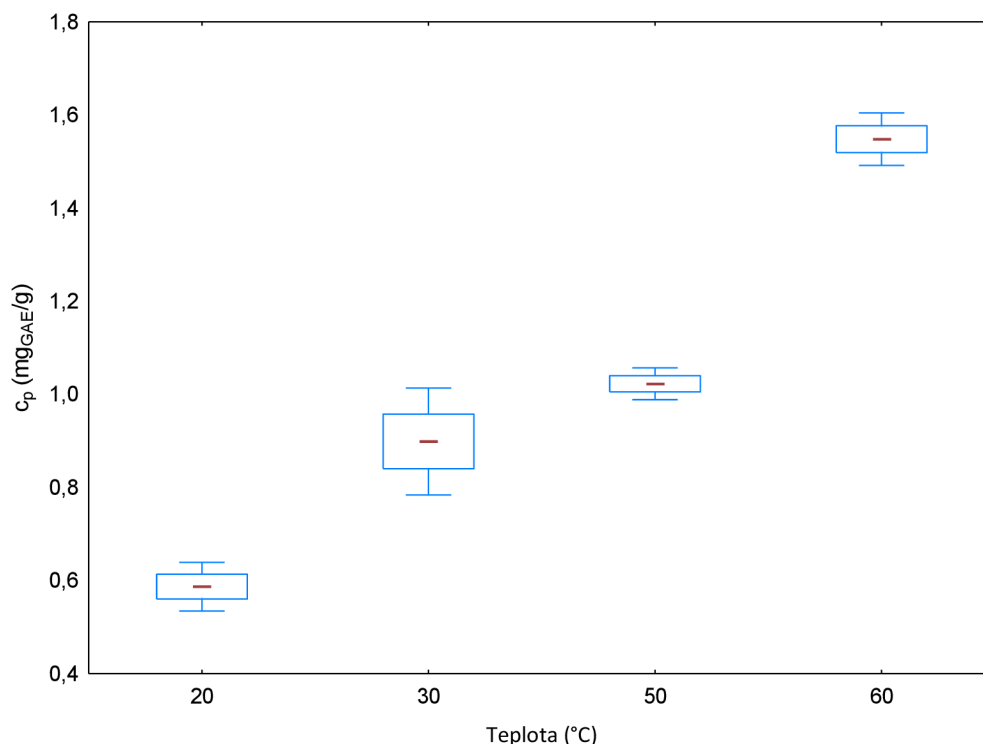
riziko degradácie alebo oxidácie a v neposlednom rade kvôli zahrnutiu širšieho rozmedzia krajných hodnôt, bola zvolená teplota 30 °C.

Zaujímavé je, že v štúdií Jovanović a kol. (2017) alebo Čujić a kol. (2016) sa, pravdepodobne kvôli zachovaniu maximálne šetrných podmienok macerácie, skúmaním vplyvu teploty nezaoberali.

Muhamad a kol. (2019) vo svojej štúdií sledovali pôsobenie teploty tak, že listy vo vriacej vode ponechali po určitú dobu a následne ich extrahovali etanolom. Preukázali, že čím dlhšie boli listy vystavené vriacej vode, tým bolo extrahovaných viac polyfenolyckých látok a antioxidačná aktivita bola vyššia. Tento trend vysvetľovali dvomi mechanizmami. Buď došlo k inaktivácii enzýmov – polyfenol oxidáz, čím sa zamedzilo degradácií polyfenolov, alebo došlo k Maillardovej reakcii a k rozkladu polyfenolických látok za vzniku nových látok s potenciálne vyššou antioxidačnou aktivitou.

Tabuľka 4: Celkový obsah polyfenolov a rozdelenie do homogénnych skupín, sledovaný faktor teplota. Hodnoty označené iným písmenom (a, b, c) sa podľa Tukeyho testu štatisticky významne líšia ( $p < 0,05$ ).

Teplota (°C)	$c_{\text{polyfenoly}}$ ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Minimum ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Maximum ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ )
20	0,59 <sup>a</sup> ± 0,08	0,44	0,66
30	0,90 <sup>b</sup> ± 0,18	0,53	1,05
50	1,02 <sup>b</sup> ± 0,05	0,94	1,10
60	1,55 <sup>c</sup> ± 0,09	1,42	1,67



Graf 4: Celkový obsah polyfenolov v  $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ , skúmaný faktor teplota.

#### 4.2.1.3 Vplyv rozpúšťadla na celkový obsah polyfenolov

Ako rozpúšťadlo boli zvolené rôzne koncentrácie GRAS rozpúšťadla etanolu v koncentráciách 0 (dest. voda)–96 %. Ostatné faktory boli nastavené takto:

- navážka: rozpúšťadlo: 1:10
- teplota: laboratórna (20 °C)
- doba macerácie: 30 minút.

Získané hodnoty koncentrácie polyfenolov boli spriemerované ( $n = 9$ ) a sú uvedené v Tabuľke 5 a Grafe 5. Ako je možné vidieť, pohybovali sa v rozsahu od  $0,12 \pm 0,07 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  do  $0,64 \pm 0,03 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Pomocou štatistickej metódy analýzy rozptylu bolo zistené, že medzi nameranými hodnotami pri jednotlivých extraktoch je štatisticky významný rozdiel ( $p < 0,0000$ ,  $F(94,4) > F_{\text{krit}}(2,41)$ ), čo znamená, že typ, resp. koncentrácia rozpúšťadla má významný vplyv ( $p < 0,05$ ) na obsah polyfenolov v extrakte.

Pomocou Tukeyho testu boli výsledky rozdelené do 4 homogénnych skupín, medzi ktorými je štatisticky významný rozdiel. Na základe tohto rozdelenia boli vybrané dve krajné hodnoty (-1 a +1), v ktorých je najvyššia koncentrácia polyfenolov.

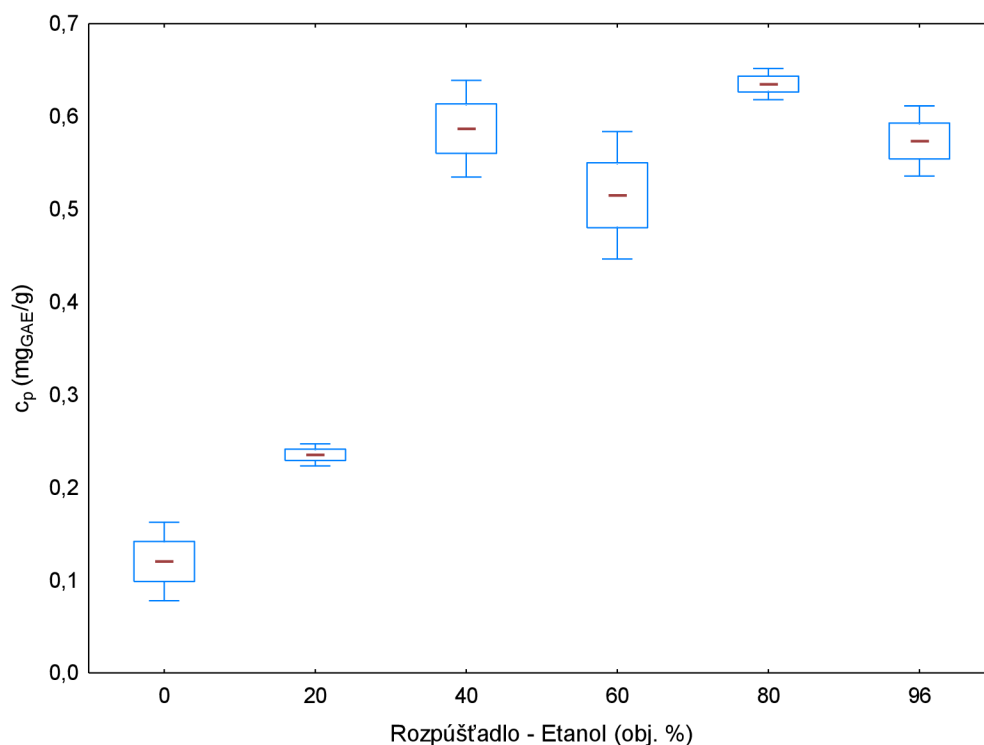
Ako je dobre zreteľné z Grafu 5, významne ( $p < 0,05$ ) najnižší výťažok polyfenolov bol dosiahnutý maceráciou vo vode ( $0,12 \pm 0,07 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Toto koreluje s tvrdením, že vo všeobecnosti je pri extrakcii výhodnejšia binárna zmes, pričom jedno rozpúšťadlo podporuje rozpustnosť polyfenolických látok a druhé podporuje desorpciu (Jovanović a kol., 2017).

Vyššie výťažky boli získané s vyššou koncentráciou etanolu (viď Graf 5), najvyšší výťažok bol dosiahnutý pri použití etanolu o koncentrácií 96 %, 80 % a 40 %. Podľa Tukeyho testu sú však zaradené do jednej homogénnej skupiny a nie je teda medzi nimi rozdiel. Vzhľadom k menšej spotrebe rozpúšťadla boli nakoniec ako krajné hodnoty tohto faktoru vybrané koncentrácie etanolu 40 % (-1) a 60 % (+1) (viď Tabuľka 7).

V štúdií Jovanović a kol. (2017) bol ako rozpúšťadlo zvolený taktiež etanol v koncentracii 30 % a 50 %. Zaujímavé je, že pri použití 96% etanolu dosiahli výrazne nízke výťažky, čo opäť koreluje s tvrdením, že extrakcia polyfenolických látok, v tomto prípade z materskej dúšky, je účinnejšia pri použití binárnej zmesi, najmä pri fenolických látkach s pomerne vysokou polaritou, viazaných v glykozidoch. Chizzola a kol. (2008) zistili, že najlepšia extrakcia polyfenolických látok z tymiánu bola pri 60% etanole.

Tabuľka 5: Celkový obsah polyfenolov a rozdelenie do homogénnych skupín, sledovaný faktor rozpúšťadlo – koncentrácia etanolu. Hodnoty označené iným písmenom (a, b, c, d) sa podľa Tukeyho testu štatisticky významne líšia ( $p < 0,05$ ).

Koncentrácia etanolu (%)	$C_{\text{polyfenoly}} (\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1})$	Minimum ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Maximum ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ )
0	$0,12\text{a} \pm 0,07$	0,05	0,23
20	$0,24\text{b} \pm 0,02$	0,22	0,27
40	$0,59\text{cd} \pm 0,08$	0,44	0,66
60	$0,52\text{c} \pm 0,11$	0,38	0,67
80	$0,64\text{d} \pm 0,03$	0,60	0,67
96	$0,57\text{cd} \pm 0,06$	0,51	0,67



Graf 5: Celkový obsah polyfenolov v mg<sub>GAE</sub>·g<sup>-1</sup>, skúmaný faktor rozpúšťadlo.

#### 4.2.1.4 Vplyv doby extrakcie/macerácie na celkový obsah polyfenolov

Všeobecne možno pri dlhšej dobe macerácie očakávať vyšší výťažok biologicky účinných látok, na druhú stranu niektoré štúdie, napr. Čujić a kol. (2016) alebo Jovanović a kol. (2017) preukázali, že doba extrakcie/macerácie nemá na zisk polyfenolov významný vplyv. Preto bolo v tomto prípade prevedených viac experimentov, zahrňujúcich pomerne široké rozmedzie od 5 min až do 24 hod, presnejšie 5 min, 15 min, 30 min, 60 min (1 hod), 90 min (1,5 hod), 120 min (2 hod), 150 min (2,5 hod), 240 min (4 hod), 360 min (6 hod), 96 min (16 hod) a 1440 min (24 hod). Ostatné faktory boli nastavené takto:

- navážka: rozpúšťadlo: 1:10
- teplota: laboratórna (20 °C)
- rozpúšťadlo: 40% etanol.

Získané hodnoty koncentrácie polyfenolov boli sprimerované (n = 9) a sú uvedené v Tabuľke 6 a Grafe 6. Možno pozorovať, že sa pohybovali v rozsahu od  $0,29 \pm 0,13 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  do  $0,99 \pm 0,24 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Pomocou štatistickej metódy analýzy rozptylu bolo zistené, že medzi nameranými hodnotami jednotlivých extraktov je štatisticky významný rozdiel ( $p < 0,0000$ ,  $F(18,95) > F_{\text{krit}}(2,00)$ ), čo znamená, že doba macerácie má významný vplyv ( $p < 0,05$ ) na obsah polyfenolov v extrakte.

Pomocou Tukeyho testu boli výsledky rozdelené do 4 homogénnych skupín, medzi ktorými je štatisticky významný rozdiel. Na základe tohto rozdelenia boli vybrané dve krajné hodnoty (-1 a +1), v ktorých je najvyššia koncentrácia polyfenolov.

Z Grafu 6 je zrejmé, že už po 30 minútach macerácie došlo k významnému ( $p < 0,05$ ) nárastu zisku polyfenolov, ktorý sa ale už ďalej výrazne nemenil (výsledky patria do jednej homogénnej skupiny). Síce možno pri dobe macerácie 150 min (2,5 hod) pozorovať prechodné zvýšenie zisku polyfenolov s veľkou odchýlkou ale štatisticky sa táto doba nelíši od polyfenolov získaných pri dobe 90 minút. Rovnako tak pri macerácií 1440 min (24 hod),

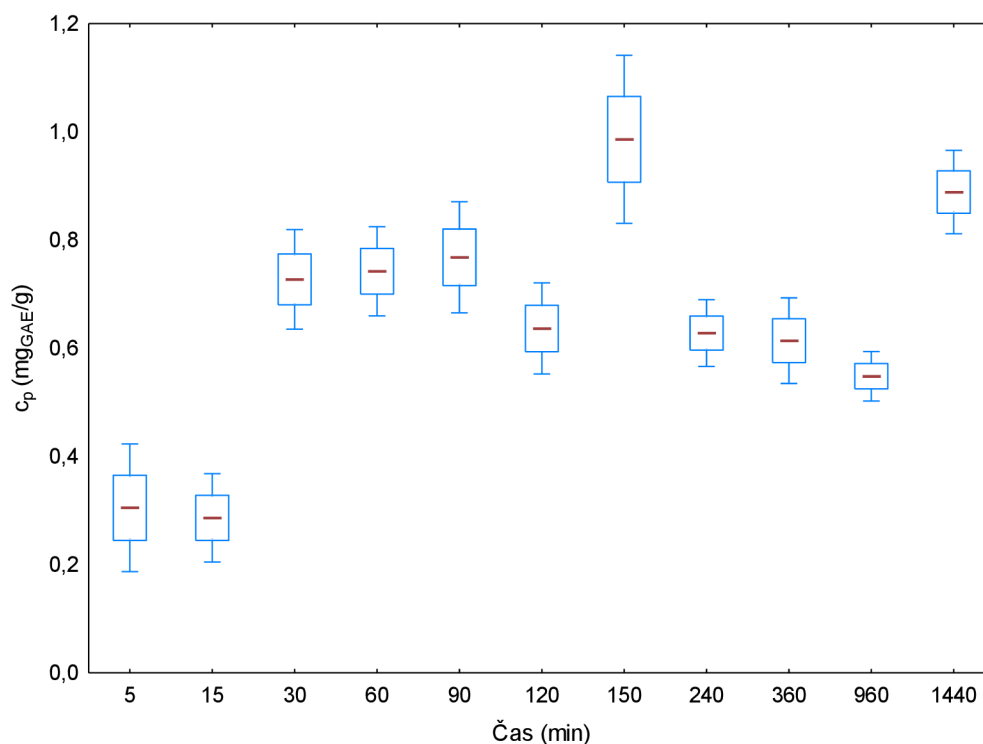
tento výsledok sa navyše takisto štatisticky nelíšil od obsahu polyfenolov získaných pri 30–90 min macerácií.

Nie je teda nutné, z ekonomických dôvodov, celý proces zbytočne predlžovať, obzvlášť keď, ako už bolo spomenuté, môže dochádzať k degradácii alebo enzymatickej oxidácii fenolických látok. Ako krajné hodnoty tohto faktoru boli preto zvolené 30 minút (-1) a 90 minút (+1) (viď Tabuľka 7).

V štúdií Jovanović a kol. (2017) bol skúmaný čas macerácie 5, 15, 30, 60 a 90 minút, pričom štatisticky odlišný bol len čas 5 minút, inak povedané žiaduci výťažok polyfenolov bol dosiahnutý dokonca už po 15 min macerácie.

Tabuľka 6: Celkový obsah polyfenolov a rozdelenie do homogénnych skupín, sledovaný faktor čas extrakcie. Hodnoty označené iným písmenom (a, b, c, d) sa podľa Tukeyho testu štatisticky významne líšia ( $p < 0,05$ ).

Čas (min)	$C_{\text{polyfenoly}} \text{ (mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1})$	Minimum ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Maximum ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ )
5	0,31 <b>a</b> ± 0,18	0,06	0,54
15	0,29 <b>a</b> ± 0,13	0,10	0,39
30	0,73 <b>bc</b> ± 0,14	0,60	0,94
60	0,74 <b>bc</b> ± 0,13	0,61	0,93
90	0,77 <b>bcd</b> ± 0,16	0,62	0,99
120	0,64 <b>c</b> ± 0,13	0,45	0,77
150	0,99 <b>d</b> ± 0,24	0,72	1,29
240	0,63 <b>c</b> ± 0,09	0,54	0,76
360	0,61 <b>c</b> ± 0,12	0,51	0,80
960	0,55 <b>c</b> ± 0,07	0,45	0,64
1440	0,89 <b>bd</b> ± 0,12	0,71	1,06



Graf 6: Celkový obsah polyfenolov v  $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ , skúmaný faktor doba extrakcie/macerácie.



#### 4.2.2 Plánovaný experiment

Plánovaný experiment (DOE) bol vygenerovaný na základe získaných výsledkov v skriningovej časti experimentu (viď kap. 4.2.1). Ako hlavná sledovaná premenná (odozva) bol zvolený celkový obsah polyfenolických látok.

Ktorý model DOE sa použije závisí od množstva faktorov a od prevediteľnosti počtu samotných experimentov. Pri identifikácii dôležitých faktorov sa používa najčastejšie buď plný faktorový dizajn alebo skrátene faktorový dizajn, kedy sa počet experimentov znižuje. V tomto experimente bol použitý faktorový návrh s počtom faktorov  $k=4$ , t. j. typ rozpúšťadla, pomer navážky a rozpúšťadla (v experimente vyjadrené ako navážka (g) na 100 ml rozpúšťadla), teplota a doba extrakcie, resp. macerácie. Počet kombinácií meraní je daný vzťahom  $2^k$  a v tomto prípade je teda počet meraní  $2^4 = 16$ . Pre každý z faktorov boli zvolené na základe úvodného skriningu a následného vyhodnotenia pomocou štatistickej metódy ANOVA dve hodnoty – minimálna a maximálna (-1 a +1). Sledované parametre a ich uvážené hladiny (maximálne a minimálne hodnoty) sú prehľadne zhrnuté v Tabuľke 7. Boli pridané 4 centrálné body (0) za účelom spresnenia merania a zníženia šumu. Experimentálny plán teda zahrňoval celkom 20 experimentov v náhodnom poradí, návrh experimentu je zhrnutý v Tabuľke 8. Experiment bol rozdelený do dvoch blokov a bol použitý dvojúrovňový faktorový dizajn  $2^4$ .

Tabuľka 7: Faktory využité pre faktorový experimentálny dizajn  $2^4$  a rozsah ich variability.

Faktor	Nízka hladina (-1)	Vysoká hladina (+1)
Navážka na 100 ml rozpúšťadla	10 g	20 g
Teplota extrakcie/macerácie	30 °C	60 °C
Koncentrácia rozpúšťadla	40 %	60 %
Doba extrakcie/macerácie	30 min	90 min

Hlavným cieľom tohto experimentu bolo identifikovať vplyvné faktory na obsah polyfenolických látok v macerátoch rýmovníku. Použité hodnoty jednotlivých faktorov a pozorované a predpovedané koncentrácie polyfenolických látok sú uvedené v Tabuľke 8.

Po prevedení navrhnutých experimentov bol štatisticky vyhodnotený vplyv jednotlivých faktorov na skúmanú odozvu (obsah polyfenolov). Analýza výsledkov spočívala v preskúmaní grafických výstupov tzv. Paretoho diagramu efektov, z ktorého vyplýva vplyv jednotlivých faktorov na vypočítanú odozvu. Kladný efekt značí priamu závislosť (čím vyššie nastavenie faktoru, tým vyššia odozva), záporný efekt znázorňuje nepriamu závislosť, tzn. vyššie nastavenie, nižšia odozva. Absolútna hodnota efektu (dĺžka pruhu) je úmerná veľkosti absolútnej hodnoty štandardizovaného odhadu účinku, inak povedané značí dôležitosť jeho vplyvu. Faktory, pri ktorých je  $p < 0,05$ , majú štatisticky významný vplyv, v Paretovom grafe sú to tie, ktoré presahujú červenú čiaru.

Efekty, presné p-hodnoty a regresné koeficienty faktorov a interakcií medzi faktormi sú uvedené v Tabuľke 9. Efekt jednotlivých faktorov je lepšie prehľadný v grafickej podobe pomocou Paretoho grafu (viď Graf 7).

Z Paretoho grafu (viď Graf 7) možno pozorovať, že najviac vplyvajúce faktory sú teplota (faktor A), navážka (faktor B) a menej vplyvný je čas (faktor D).

Jednoznačne najvyšší vplyv má faktor A – teplota. Teplota môže mať na extrakciu polyfenolických látok významný vplyv z dôvodu zvýšenia účinnosti extrakcie v dôsledku väčšieho porušenia bunkových štruktúr (Mustafa, Turner, 2011). To vedie k zvýšeniu permeability bunkovej membrány a k „zrážkam“ sekundárnych metabolitov a rastlinných častí (polyfenoly s lipoproteínmi), čo zapríčiňuje zlepšenie priestupnosti polyfenolov a prestup hmoty. Zvýšená teplota môže taktiež znížiť povrchové napätie a podporiť „potenie“

rastlinného materiálu s výsledkom účinnejšej extrakcie. Výsledok je v súlade so štúdiami, kde bola potvrdená teplota ako pozitívny faktor ovplyvňujúci extrakciu polyfenolov z rastlín čeľade *Lamiaceae* (Hossain a kol., 2011; Miron a kol., 2011, Dent a kol., 2013).

Aj v tomto prípade teplota a doba macerácie majú na odozvu kladný vplyv, t. j. čím je vyššia teplota a dlhšia doba macerácie, tým je vyšší zisk polyfenolických látok v maceráte. Kladný efekt teploty je dvakrát vyšší ako pri čase, čo napovedá, že napríklad pri prevedení do praxe je pre optimálny zisk polyfenolických látok lepšie zvýšiť teplotu a znížiť čas, ich kombináciou je možné dosiahnuť optimálny výsledok.

Tabuľka 8: Faktorový experimentálny dizajn 2<sup>4</sup> s pozorovanými a predpovedanými koncentraciami polyfenolických látok.

Blok	Teplota (°C)	Navážka na 100 ml rozp. (g)	Etanol (%)	Čas (min)	Celkový obsah polyfenolických látok (mg <sub>GAE</sub> ·g <sup>-1</sup> )	
					Pozorované	Predpovedané
1	60 (+1)	20 (+1)	40 (-1)	90 (+1)	0,892	0,920
1	60 (+1)	10 (-1)	40 (-1)	30 (-1)	1,061	1,031
1	60 (+1)	20 (+1)	60 (+1)	30 (-1)	0,755	0,723
1	45 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)	0,831	0,741
1	30 (-1)	10 (-1)	40 (-1)	90 (+1)	0,649	0,732
1	30 (-1)	20 (+1)	60 (+1)	90 (+1)	0,611	0,692
1	60 (+1)	10 (-1)	60 (+1)	90 (+1)	0,814	0,903
1	30 (-1)	20 (+1)	40 (-1)	30 (-1)	0,349	0,310
1	30 (-1)	10 (-1)	60 (+1)	30 (-1)	0,596	0,619
1	45 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)	0,854	0,741
2	60 (+1)	10 (-1)	60 (+1)	30 (-1)	1,039	1,090
2	30 (-1)	20 (+1)	60 (+1)	30 (-1)	0,409	0,468
2	60 (+1)	20 (+1)	60 (+1)	90 (+1)	0,659	0,652
2	60 (+1)	20 (+1)	40 (-1)	30 (-1)	0,550	0,662
2	30 (-1)	10 (-1)	40 (-1)	30 (-1)	0,320	0,378
2	45 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)	0,889	0,720
2	30 (-1)	10 (-1)	60 (+1)	90 (+1)	0,705	0,643
2	30 (-1)	20 (+1)	40 (-1)	90 (+1)	0,780	0,779
2	60 (+1)	10 (-1)	40 (-1)	90 (+1)	1,098	1,089
2	45 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)	0,752	0,720

Množstvo navážky na 100 ml rozpúšťadla má vplyv záporný, t. j. čím by bol vyšší pomer medzi navážkou a rozpúšťadlom, tým by bol nižší celkový obsah získaných polyfenolických látok. Tento jav môže byť spôsobený nedostatočným prestúpením média k celému povrchu všetkých častíc rastlín. Riešením tohto javu by mohla byť miešaná macerácia.

Samotné rozpúšťadlo – koncentrácia etanolu (%) (faktor C) nemá štatisticky významný vplyv na obsah polyfenolických látok. K rovnakému záveru došli aj Čujic a kol. (2016). Avšak, interakcia faktorov C a D má hodnotu  $p = 0,035$ , a pri zvolenej hladine spoľahlivosti 95 % platí hypotéza  $H_1$ , teda že interakcia faktorov má vplyv na celkový obsah polyfenolov. Z tohto dôvodu nemožno vylúčiť významnosť faktoru C, podobne ako v štúdií Jovanović a kol. (2017), kde bol typ rozpúšťadla zistený ako významný.

Z Paretoho grafu (viď Graf 7) je zrejmé, aj keď nevýznamný, záporný vplyv použitého rozpúšťadla, t. j. čím by bola vyššia koncentrácia rozpúšťadla, tým by bol nižší obsah

získaných celkových polyfenolických látok. Tento jav je vysvetliteľný potrebnou prítomnosťou binárnej zmesi pri extrakcii, ako bolo rozoberané v kapitole 4.2.1.3.

Jednotlivé interakcie medzi faktormi a ich vplyv na získanie čo najvyššieho obsahu polyfenolických látok sú dobre sledovateľné v grafickom prevedení, ktoré sa nachádza v Prílohe 1.

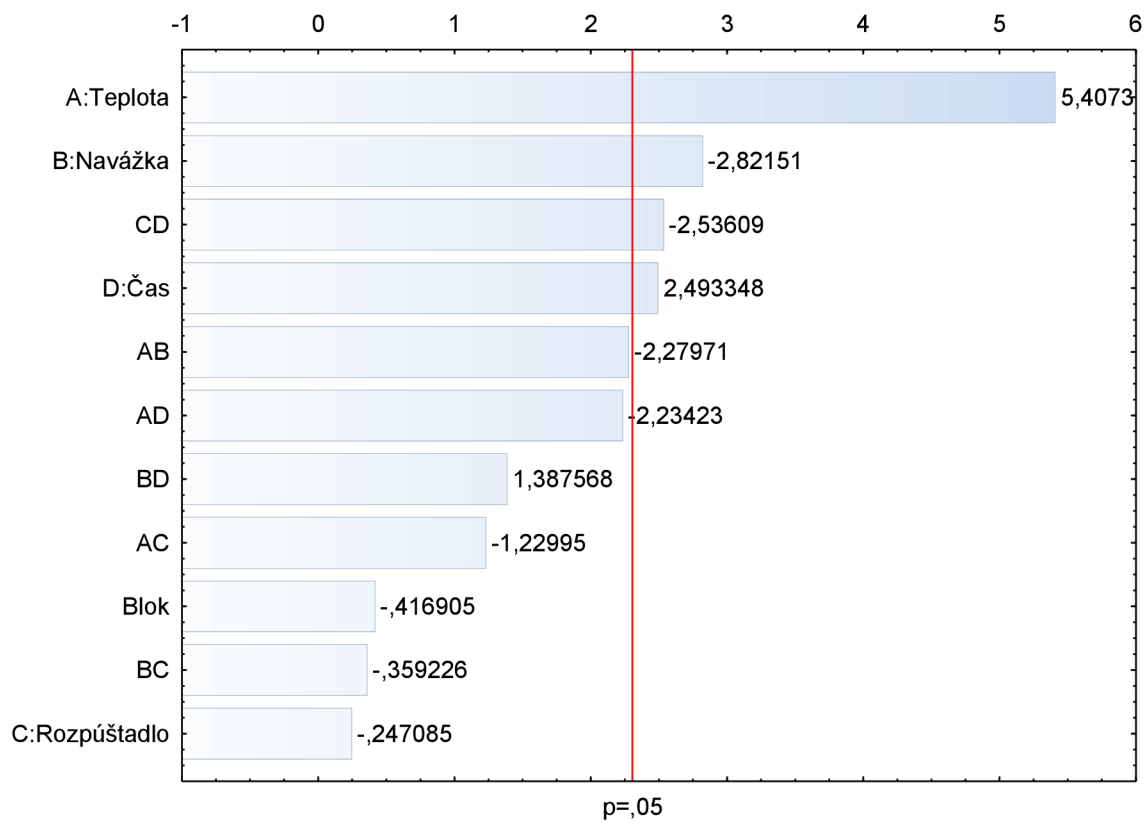
Tabuľka 9: Štatistická analýza optimalizácie macerácie pomocou faktorového dizajnu 2<sup>4</sup>.

	Efekt	Sm.Ch.	t(8)	p	Koef.	Sm.Ch. Koef.
Priemer/absolútny člen	0,731	0,025	28,856	0,000	0,731	0,025
Hlavné faktory						
A: Teplota	0,306	0,057	5,407	0,001	0,153	0,028
B: Navážka	-0,160	0,057	-2,822	0,022	-0,080	0,028
C: Rozpúšťadlo	-0,014	0,057	-0,247	0,811	-0,007	0,028
D: Čas	0,141	0,057	2,493	0,037	0,071	0,028
Interakcia medzi faktormi						
AB	-0,129	0,057	-2,280	0,052	-0,065	0,028
AC	-0,127	0,057	-2,234	0,056	-0,063	0,028
BC	0,079	0,057	1,388	0,203	0,039	0,028
AC	-0,070	0,057	-1,230	0,254	-0,035	0,028
CD	-0,144	0,057	-2,536	0,035	-0,072	0,028
BC	-0,020	0,057	-0,360	0,729	-0,010	0,028

Je zaujímavé, že niektorí autori došli k trochu odlišným záverom. Napr. v štúdií Jovanović a kol. (2017) bol najvýznamnejším faktorom pre zisk polyfenolických látok typ rozpúšťadla a pomer navážky a rozpúšťadla. Menej významné faktory boli veľkosť častíc a čas extrakcie. Pri extrakcii polyfenolických látok z listov *Urtica dioica* bol takisto čas extrakcie štatisticky nevýznamný (Vajić a kol., 2015). Pomer navážky a rozpúšťadla bol druhým najvýznamnejším faktorom pri získavaní polyfenolických látok zo sušenej arónie, pričom čas nebol štatisticky významným faktorom (Ćujić a kol., 2016). Tieto odlišnosti môžu byť spôsobené celkovým usporiadaním experimentu, výberom faktorov atď. Napríklad Jovanović a kol. (2017) alebo Ćujić a kol. (2016) sa nezaoberali skúmaním vplyvu teploty, v rade štúdií sa spracováva sušený materiál a významný vplyv na výťažok mala veľkosť častíc.

Na základe prevedenej analýzy boli vyhodnotené optimálne podmienky pre čo najvyšší obsah polyfenolických látok v získaných macerátoch. Optimálne podmienky boli zvolené takto:

- teplota: 60 °C
- navážka: rozpúšťadlo: 1:10
- rozpúšťadlo: 40% etanol
- doba macerácie: 90 minút.



Štandardizovaný odhad účinku (absolútna hodnota)

*Graf 7: Pareto graf zobrazujúci významnosť skúmaných parametrov, hladina spoľahlivosti nastavená na 95 %.*

### 4.3 Extrakty získavané PFE a PHWE

Extrakcia stlačenou horúcou vodou spolu s vysokotlakou extrakciou s rozpúšťadlom etanolom bola vykonaná ako alternatívna metóda pre získanie extraktu. Tieto metódy sa radia medzi tzv. „zelené metódy“, ktoré sú predovšetkým priateľské k životnému prostrediu, t. j. vyžadujú kratší extrakčný čas, menej spotrebovanej energie a rozpúšťadla. Cieľom bolo zistiť, či tieto moderné „zelené metódy“ poskytnú výrazne vyššie výťažky polyfenolov, príp. aj ďalšie výhody, než je tomu pri jednoduchej macerácii.

Zvyšujúca sa teplota ako meniaci sa faktor tejto extrakcie bol zvolený z dôvodu vysokého pozitívneho vplyvu na obsah celkových polyfenolov v maceráte.

#### 4.3.1 Vysokotlaká extrakcia rozpúšťadlom, teplotná závislosť

Pri PFE bolo použité rozpúšťadlo, ktoré bolo vybrané ako optimálne pri macerácii – 40% etanol, postup a podmienky extrakcie boli prevedené podľa postupu uvedeného v kap. 3.4.2. Získané výsledky boli spriemerované ( $n = 3$ ) pre každú teplotu a sú uvedené v Tabuľke 10 a Grafe 8. Ako možno pozorovať, pohybovali sa v rozsahu od  $0,08 \pm 0,03 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  do  $0,43 \pm 0,07 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ . Pomocou štatistickej metódy analýzy rozptylu bolo zistené, že medzi nameranými hodnotami je štatisticky významný rozdiel ( $p < 0,001$ ,  $F(34,73) > F_{\text{krit}}(5,19)$ ). Pomocou Tukeyho testu boli výsledky rozdelené do troch homogénnych skupín, medzi ktorými je štatisticky významný rozdiel.

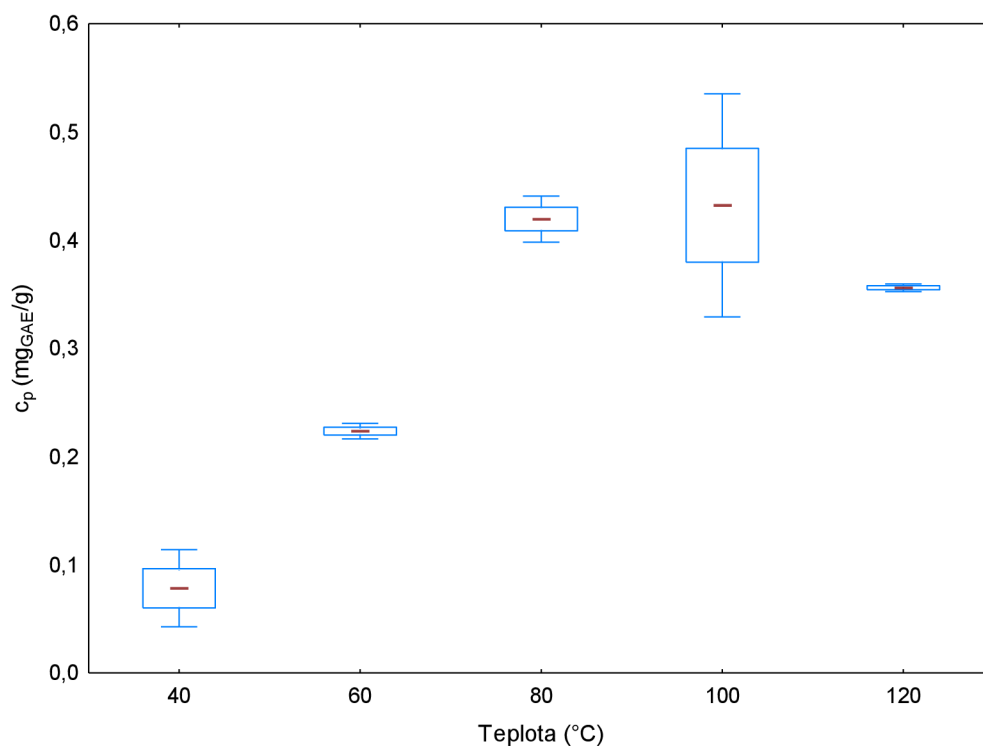
V Tabuľke 11 možno pozorovať signifikantný pokles v obsahu celkových polyfenolických látok oproti macerácii.

Pri PFE extrakcii však bola použitá rastlina, ktorá bola pestovaná v iných podmienkach (iná pôda, iný prísun svetla, iné zalievanie, iné biologické štádium rastliny v čase zberu), preto tieto hodnoty medzi sebou bohužiaľ nemožno porovnávať. Možno z toho však vyvodit', a potvrdzuje to už spomínaný fakt, že podmienky pestovania majú výrazný vplyv na obsah biologicky aktívnych látok v rastlinnom materiáli.

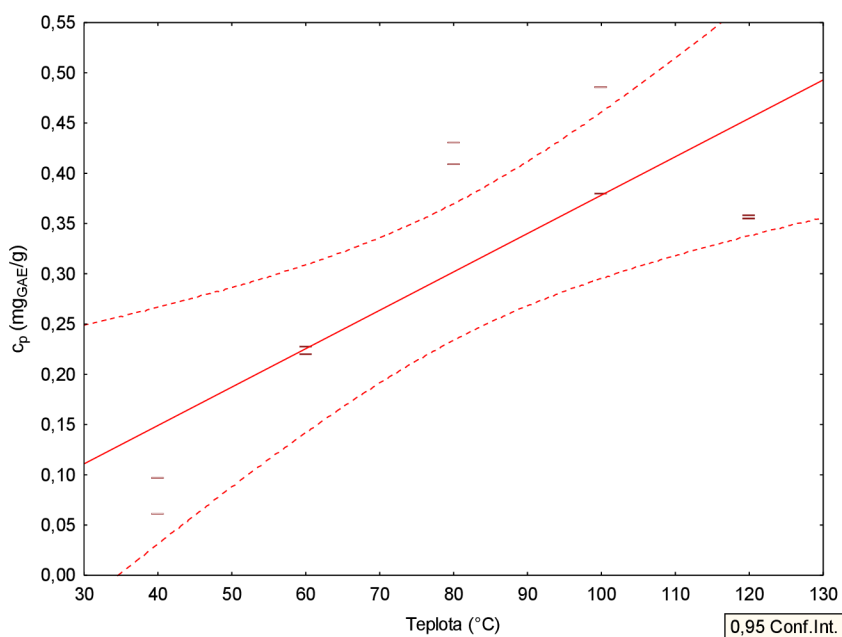
V tomto experimente bol predovšetkým sledovaný trend, akým vplýva teplota na celkový obsah polyfenolických látok pri PFE extrakcii. Silná pozitívna korelácia ( $r = 0,792$ , vid' Graf 9) potvrdzuje závislosť medzi celkovým obsahom polyfenolických látok a teplotou.

*Tabuľka 10: Celkový obsah polyfenolov získaný PFE extrakciou a rozdelenie do homogénnych skupín, sledovaný faktor teplota. Hodnoty označené iným písmenom (a, b, c) sa podľa Tukeyho testu štatisticky významne líšia ( $p < 0,05$ ).*

Teplota (°C)	$C_{\text{polyfenoly}} \text{ (mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1})$	Minimum ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Maximum ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ )
40	$0,08\mathbf{a} \pm 0,03$	0,06	0,10
60	$0,22\mathbf{b} \pm 0,01$	0,22	0,23
80	$0,42\mathbf{c} \pm 0,02$	0,41	0,43
100	$0,43\mathbf{c} \pm 0,07$	0,38	0,49
120	$0,36\mathbf{bc} \pm 0,00$	0,35	0,36



Graf 8: Celkový obsah polyfenolov získaný PFE extrakciou v  $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  v závislosti na zvýšenej teplote.



Graf 9: Korelácia medzi celkovým obsahom polyfenolov a teplotou pri PFE, uvedené pásy znázorňujú hladinu spoľahlivosti 95%.

Tabuľka 11: Porovnanie najvýťažnejších teplôt extrakcií.

Extrakcia	$C_{\text{polyfenoly}} (\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1})$
PHWE, 180 °C	$1,28 \pm 0,04$
PFE, 120 °C	$0,36 \pm 0,00$
Macerácia, 60 °C	$1,10 \pm 0,03$

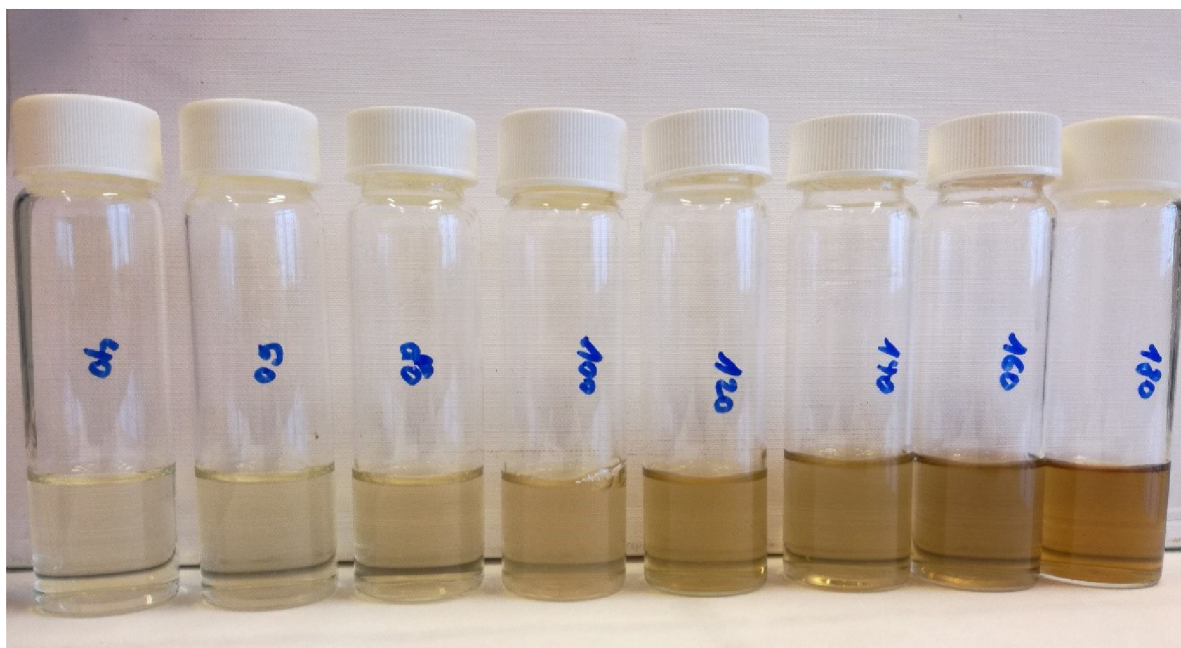
### 4.3.2 Extrakcia stlačenou horúcou vodou, teplotná závislosť

V tomto prípade bola použitá ako extrakčné činidlo horúca voda, podmienky extrakcie sú uvedené v kapitole 3.4.3

Získané hodnoty koncentrácie polyfenolov boli spriemerované ( $n = 3$ ) pre každú teplotu a sú uvedené v Tabuľke 12 a Grafe 10. Ako možno vidieť, pohybovali sa v rozsahu od  $0,06 \pm 0,03 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  do  $1,28 \pm 0,04 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ . Pomocou štatistickej metódy analýzy rozptylu bolo zistené, že medzi nameranými hodnotami je štatisticky významný rozdiel ( $p < 0,0000$ ,  $F(554,32) > F_{\text{krit}}(2,66)$ ). Pomocou Tukeyho testu boli výsledky rozdelené do šiestich homogénnych skupín, medzi ktorými je štatisticky významný rozdiel.

Extrakcia stlačenou horúcou vodou bola vykonaná s takou istou rastlinou ako bola vykonaná macerácia. Možno teda porovnávať získané hodnoty z macerácie a PHWE s tým rozdielom, že pri PHWE je jeden z významných faktorov iné rozpúšťadlo, ktoré je však použité v súlade s testovaním čo najviac „zelenej metódy“. Zvyšujúca sa teplota ako meniaci sa faktor tejto extrakcie bol zvolený z dôvodu vysokého pozitívneho vplyvu na obsah celkových polyfenolov v maceráte. Výsledky potvrdzujú, že medzi teplotou a obsahom celkových polyfenolov je silná kladná korelácia ( $r = 0,942$ , vid' Graf 11).

Pri porovnaní celkového obsahu polyfenolických látok v maceráte, získanom pri optimalizovaných podmienkach, s PHWE, možno sledovať že významný nárast v obsahu polyfenolických látok nenastal (vid' Tabuľka 11). Navyše, pri vyšších teplotách ( $120^\circ\text{C}$  a viac) sa začali uvoľňovať nepríjemné aromatické látky, čo bolo citelné pri senzorickom zhodnotení. Určité zmeny možno pozorovať aj na farbe extraktu, ktorý so zvyšujúcou sa teplotou výrazne hnedol (vid' Obrázok 17).



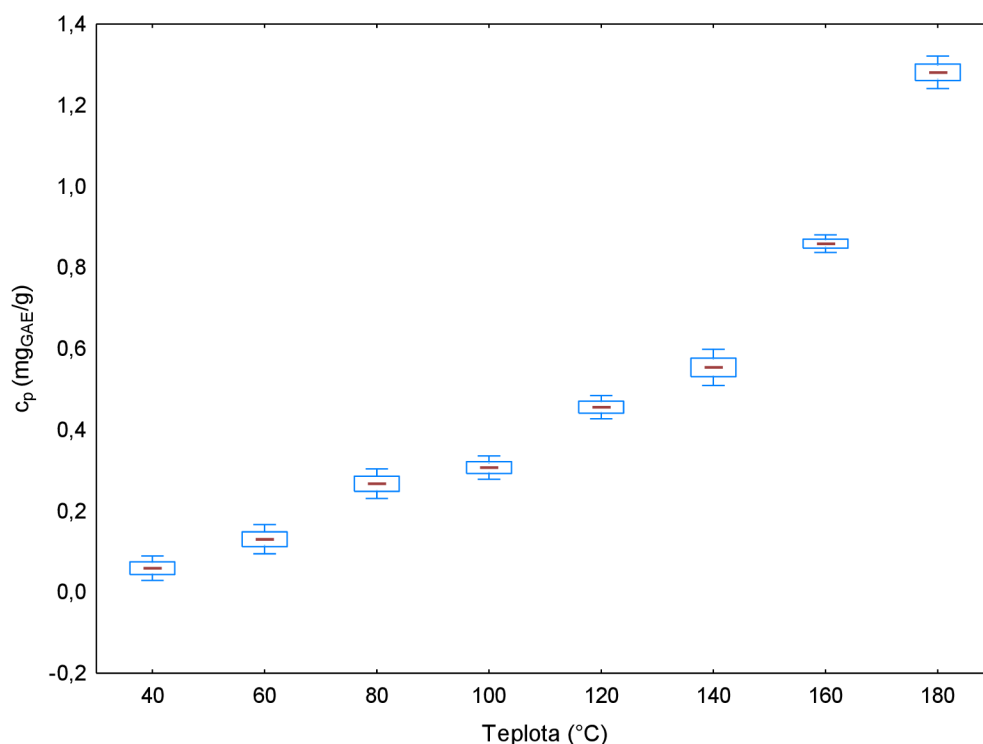
Obrázok 17: Extrakt rýmovníku získané extrakciou PHWE. Teploty extrakcie zľava:  $40^\circ\text{C}$ ,  $60^\circ\text{C}$ ,  $80^\circ\text{C}$ ,  $100^\circ\text{C}$ ,  $120^\circ\text{C}$ ,  $140^\circ\text{C}$ ,  $160^\circ\text{C}$ ,  $180^\circ\text{C}$ .

Záverom možno zhrnúť, že rovnako ako v prípade macerácie aj pri PFE a PHWE má teplota významný vplyv ( $p < 0,05$ ) na zisk polyfenolov. Tieto metódy ponúkajú oproti maceráciám množstvo výhod, napr. rýchlosť, efektívnosť, využitie vody ako rozpúšťadla (zelená metóda), na druhú stranu však výťažok polyfenolov nebol významne vyšší než pri maceráciách, použitá vysoká teplota mala navyše podľa očakávaní negatívny vplyv na profil aromatických látok (vid' kap. 4.4). Možno teda konštatovať, že metóda PHWE, a to isté

možno očakávať aj pri PFE, nie je pre získavanie extraktov vzhľadom na obsah polyfenolických látok a zároveň na zachovanie pozitívnych aromatických látok, výhodnejšia v porovnaní s maceráciou, obzvlášť keď vezmeme do úvahy nutnosť použitia drahejšej aparatury a celkovo vyššie náklady na extrakciu.

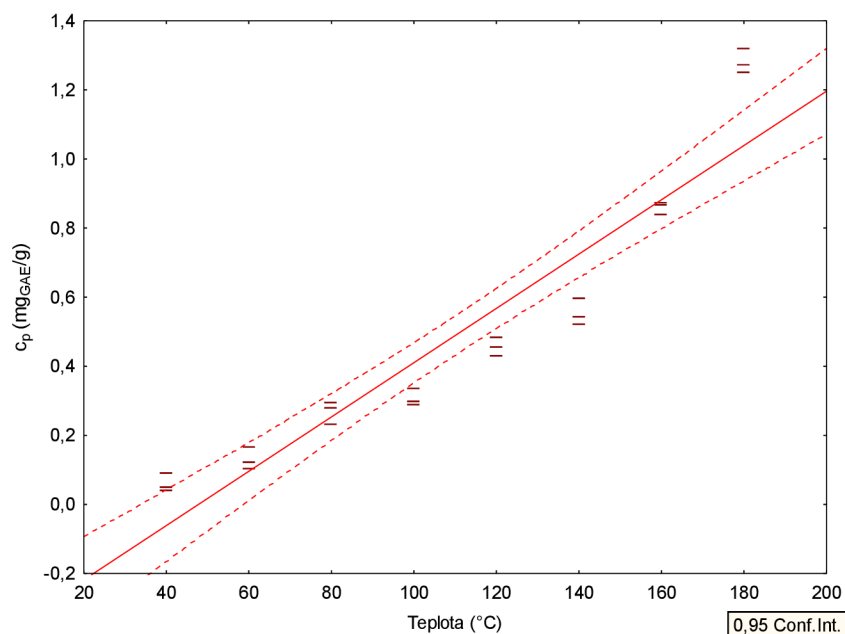
Tabuľka 12: Celkový obsah polyfenolov získaný PHWE extrakciou a rozdelenie do homogénnych skupín, sledovaný faktor teplota. Hodnoty označené iným písmenom (a, b, c, d, e, f) sa podľa Tukeyho testu štatisticky významne líšia ( $p < 0,05$ ).

Teplota (°C)	$c_{\text{polyfenoly}}$ ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Minimum ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Maximum ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ )
40	0,06a $\pm$ 0,03	0,04	0,09
60	0,13a $\pm$ 0,03	0,10	0,17
80	0,27b $\pm$ 0,03	0,23	0,29
100	0,31b $\pm$ 0,03	0,29	0,34
120	0,46c $\pm$ 0,03	0,43	0,48
140	0,55d $\pm$ 0,04	0,52	0,60
160	0,86e $\pm$ 0,02	0,84	0,87
180	1,28f $\pm$ 0,04	1,201	1,32



Graf 10: Celkový obsah polyfenolov získaný PHWE extrakciou v  $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  v závislosti na zvýšenej teplote.





Graf 11: Korelácia medzi celkovým obsahom polyfenolov a teplotou pri PHWE.

#### 4.4 Aromatický profil PHWE extraktov z rýmovníka

Extrakty, esenciálne oleje rôznych bylín sú široko využívané ako aromatické a chuťové prísady do rôznych potravín a nápojov, rovnako tak do mnohých kozmetických výrobkov, v prípade esenciálnych olejov sa používajú aj v aromaterapii. Z tohto hľadiska je dôležitý obsah aromatických látok. Tieto látky sú podstatou arómy/chuti, okrem toho však majú aj mnoho ďalších pozitívnych účinkov, často je študovaná napr. ich antimikrobiálna aktivita (Erny Sabrina a kol., 2014).

Aromatickým látkam v rýmovníku, najmä v esenciálnych olejoch z nich získaných, sa venovalo už niekoľko publikácií (Murthy a kol., 2009; Hassani a kol., 2012; Joshi a kol., 2011; Da Costa a kol., 2010; Velasco a kol., 2009) a v rýmovníku bolo doposiaľ identifikovaných mnoho prchavých (aromatických) látok, ich maximálny zistený počet bol 76 (Arumugam a kol., 2016).

Z tohto dôvodu bol v rámci tejto práce sledovaný tiež profil prchavých látok ako ďalší marker kvality získaných extraktov. Pre ich stanovenie bola použitá metóda HS-SPME-GC-MS. Identifikácia bola prevedená na základe porovnania hmotnostných spektier s dostupnou knižnicou spektier, ich obsah vo vzorkách bol zisťovaný semikvantitatívne na základe plôch pík.

Analyzované boli získané extrakty z PHWE extrakcie, nakoľko pri tejto extrakcii bola použitá najvyššia teplota a mohlo teda dochádzať k najväčšej degradácii látok. V neposlednom rade bol pri extrakcii spozorovaný nepríjemný zápach a hnedá farba (viď Obrázok 17). Bol tiež sledovaný vplyv teploty na obsah aromatických látok v získaných extraktoch.

Identifikované zlúčeniny boli rozdelené do nasledujúcich skupín: terpénové uhľovodíky – monoterpény, terpénové uhľovodíky – seskviterpény, kyslíkové monoterpény, kyslíkové seskviterpény, aldehydy, alkoholy a estery.

##### 4.4.1 Porovnanie počtu zlúčenín identifikovaných v extraktoch

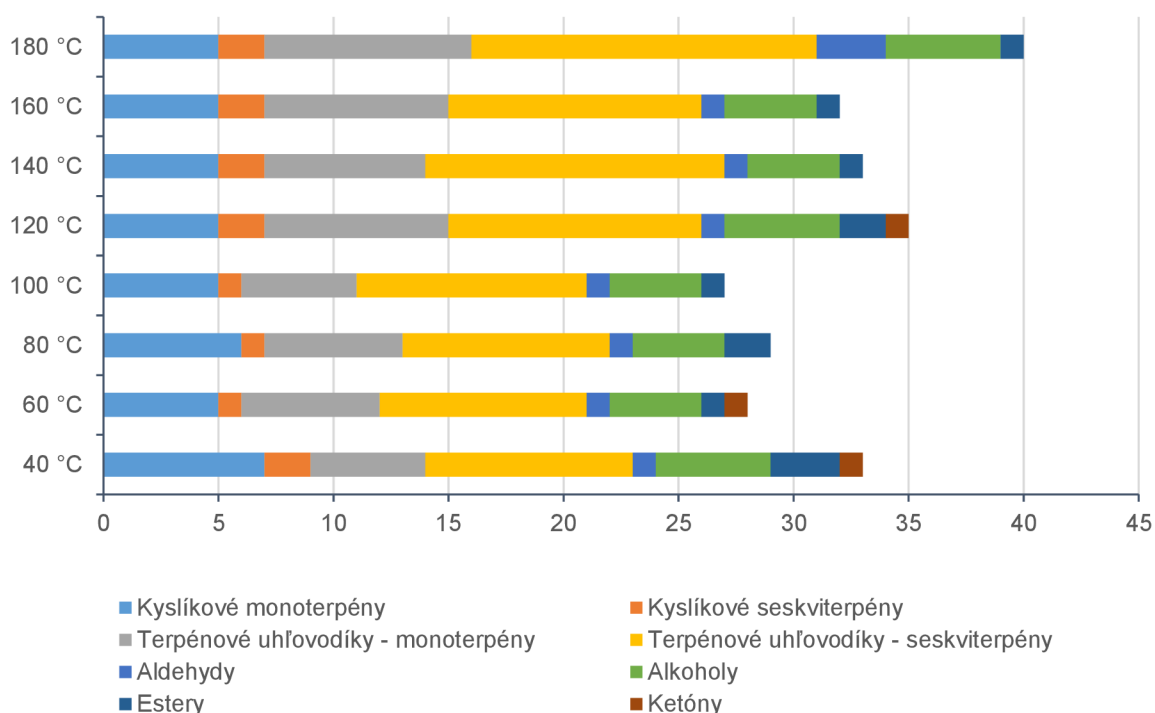
V extraktoch získaných pomocou PHWE bol minimálny počet (27 zlúčenín) stanovený pri teplote 100 °C a maximálny počet (40 zlúčenín) stanovený v extrakte pri 180 °C. Prehľad

počtu jednotlivých ale aj celkových identifikovaných látok je prehľadne zobrazený v Grafe 12 a Tabuľke 13.

Podľa počtu bola najväčšia časť identifikovaných látok patriaca do skupiny seskviterpénov, čo je v súlade s očakávaním, nakoľko sa jedná o rastlinný materiál.

Zlúčeniny, ktoré boli identifikované len pri vyšších teplotách (120 °C a viac) sú: nonyl acetát, eremofylén,  $\beta$ -funebren, kubebén, 1-dodekanol, 1-epi kubenol,  $\beta$ -elemén,  $\beta$ -pinén, sabinén, hex-2-én-1-al, trans- $\beta$ -ocimén, 3-tujén, oktanal, izoterpinolén, cedrén, cis- $\beta$ -farnezen,  $\alpha$ -selinén a cypera-2,4-dién. Nie všetky z týchto zlúčenín boli identifikované pri všetkých vysokých teplotách, čo môže byť spôsobené tým, že boli identifikované často len v stopovom množstve. Väčšina z týchto zlúčenín patrí do skupiny seskviterpénov, prípadne monoterpénov, alkoholov a aldehydov. Je ťažké identifikovať presne, ktoré zlúčeniny sú zodpovedné za nepríjemný zápach extraktov získaných pri vysokých teplotách. Niekedy pri veľmi silných nepríjemne zapáchajúcich zlúčeninách stačí aj stopové množstvo, aby zapáchal celý extrakt. Pri vysokých teplotách boli identifikované najmä seskviterpény, ktoré sú často charakterizované ako vôňe zemité, drevité, korenisté a oproti monoterpénom majú výraznejšiu arómu.

Podľa Li a kol. (2020) môžu extrakčné podmienky PHWE viesť aj k vzniku antioxidantov, ktoré sa pôvodne v byline vôbec nenachádzali. Boli identifikované tri hlavné mechanizmy, akými môže dochádzať k vzniku antioxidantov počas PHWE extrakcie. Prvý je, že hydrolýza pri vysokých teplotách môže spôsobovať vznik nových zlúčenín; v druhom rade môže dochádzať k simultánnej extrakcii a degradácii termolabilných látok a v neposlednom rade môže dochádzať v dôsledku vysokej teploty a prítomnosti vody ku karamelizácii a Maillardovej reakcii za vzniku Amadoriho zlúčenín a ostatných redukujúcich cukrov. Tie môžu byť príznakom nepriaznivého zápachu a hnedej farby získaných extraktov. Čím je vyššia teplota extrakcie, tým je extrakcia menej špecifická a dochádza k degradácii zlúčenín. To by mohlo byť príčinou zvýšeného obsahu polyfenolov pri vyšších teplotách a zároveň aj objavenie nepríjemného zápachu a hnedej farby.



Graf 12: Zastúpenie jednotlivých skupín zlúčenín identifikovaných v extraktoch (počet zlúčenín).

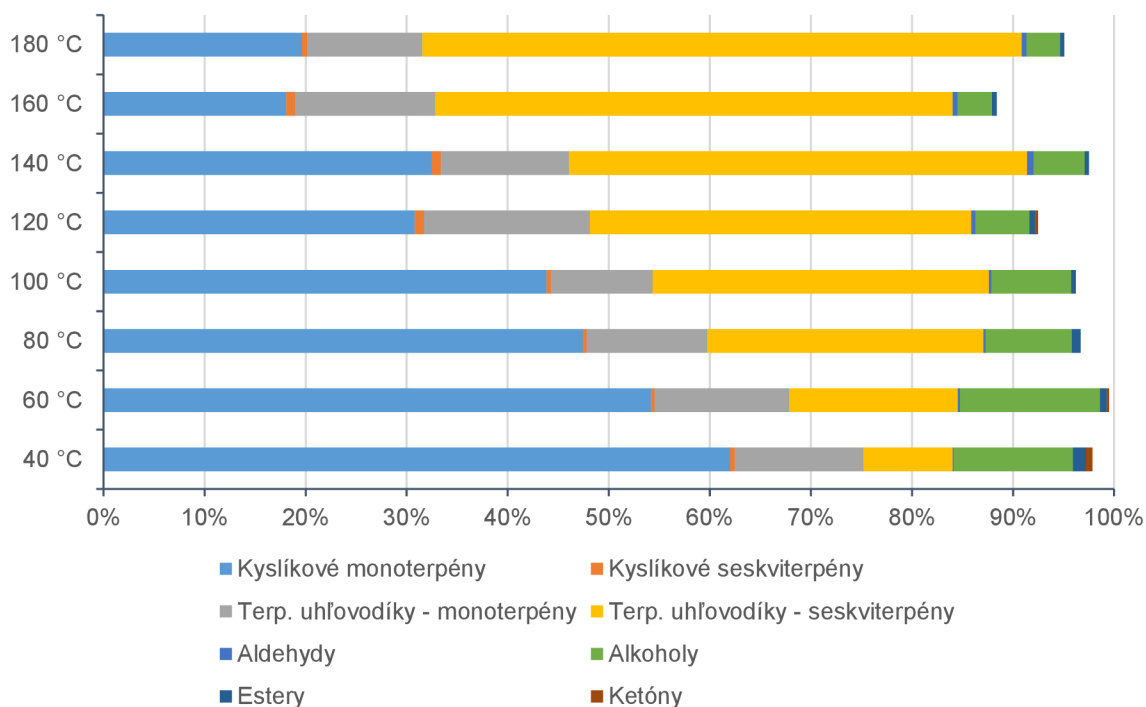
Tabuľka 13: Prehľad celkového počtu prchavých látok podľa chemických skupín v extraktoch

	40 °C	60 °C	80 °C	100 °C	120 °C	140 °C	160 °C	180 °C
Aldehydy	1	1	1	1	1	1	1	3
Alkoholy	5	4	4	4	5	4	4	5
Estery	3	1	2	1	2	1	1	1
Ketóny	1	1	0	0	1	0	0	0
Kyslíkové monoterpény	7	5	6	5	5	5	5	5
Kyslíkové seskviterpény	2	1	1	1	2	2	2	2
Terpénové uhľovodíky - monoterpény	5	5	6	5	8	7	8	9
Terpénové uhľovodíky - seskviterpény	9	9	9	10	11	13	11	15
Celkom	33	28	29	27	35	33	32	40

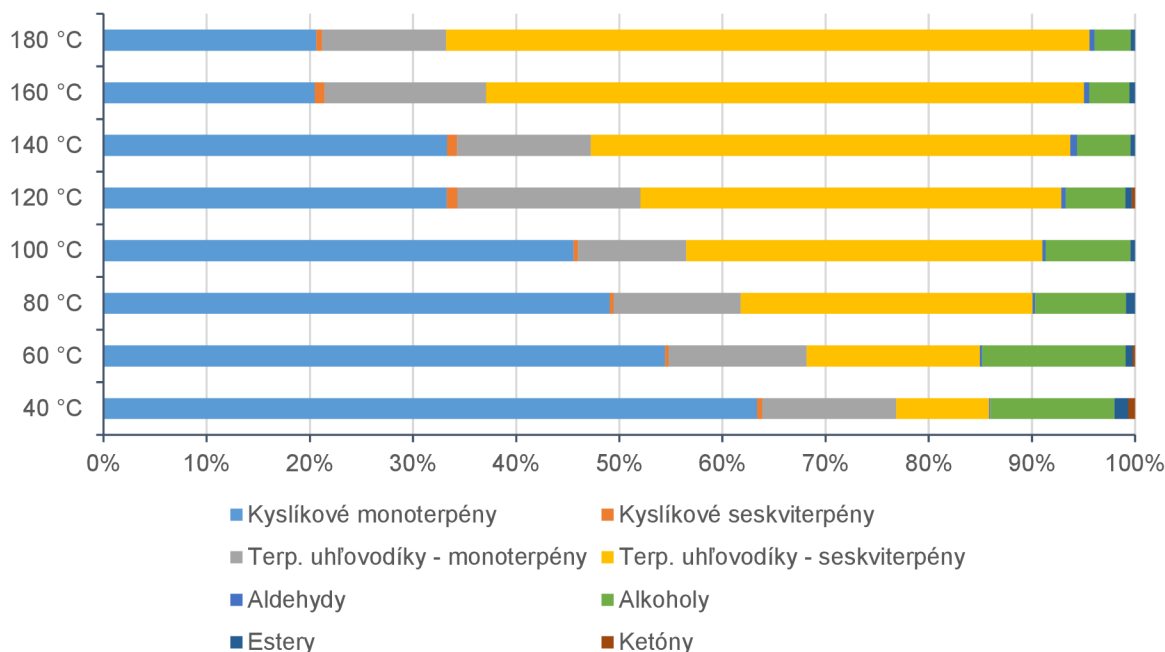
#### 4.4.2 Porovnanie obsahu zlúčenín identifikovaných v extraktoch

Prínosnejšie ako len počet identifikovaných zlúčenín je sledovanie ich obsahu v jednotlivých vzorkách. Porovnanie obsahu jednotlivých skupín vo vzorkách je uvedené v Grafe 13 a Grafe 14. Relatívny obsah bol zisťovaný semikvantitatívne na základe plôch píkov a je prezentovaný ako % z celkovej plochy píkov.

Pri teplote 40 °C bol získaný extrakt s najvyšším podielom kyslíkových monoterpénov a najnižším podielom seskviterpénov. So zvyšujúcou sa teplotou sa znižovalo percentuálne zastúpenie kyslíkových monoterpénov a zvyšovalo sa zastúpenie seskviterpénov, pri najvyššej teplote bol percentuálny obsah seskviterpénov najvyšší. Podiel monoterpénov zostával so zvyšujúcou sa teplotou približne rovnaký, podiel alkoholov sa so zvyšujúcou sa teplotou postupne mierne znižoval, naopak podiel aldehydov sa mierne zvýšil. Obsah aldehydov, ketónov a esterov je vo všetkých prípadoch v porovnaní s ostatnými skupinami zanedbateľný.



Graf 13: Zastúpenie jednotlivých skupín zlúčenín získaných v extraktoch (obsah zlúčenín).



Graf 14: Zastúpenie jednotlivých skupín zlúčenín získaných v extraktoch (relatívny obsah v %).

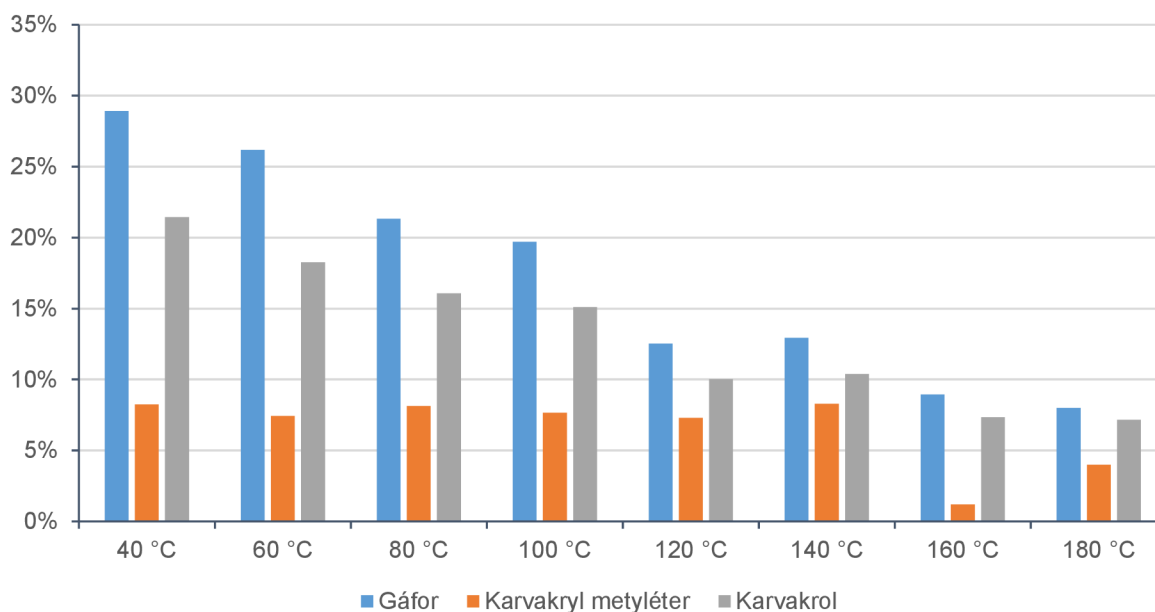
Pre lepšiu prehľadnosť sú v nasledujúcich Grafoch 15 – 18 znázornené a podrobne diskutované najdôležitejšie skupiny zlúčenín. Zo všetkých identifikovaných zlúčenín boli vybraté tie, ktorých obsah bol aspoň pri jednej z teplôt vyšší než 5 %.

Vysoký obsah z monoterpenov obsahujúcich vo svojej štruktúre kyslík – monoterpenoidov tvoril gáfor a karvakrol, v menšom zastúpení bol nájdený karvakryl metyléter (viď Graf 15). Obsah gáforu a karvakrolu sa so zvyšujúcou teplotou znižoval. Karvakryl metyléter bol približne v rovnakom zastúpení a až pri teplotách 160 °C a 180 °C jeho obsah klesol.

Karvakrol, ako už bolo spomínané v kap. 2.4.1.2 je označovaný za bioaktívnu látku s preukázanou antimikrobiálnou aktivitou. Jeho prítomnosť v rýmovníku a jeho extraktoch bola potvrdená niekoľko krát, vo väčšine prípadov medzi majoritnými zlúčeninami (Gurib-Fakim a kol., 1995; Murthy a kol., 2009; Velasco a kol., 2009; Senthilkumar a kol., 2010; Joshi a kol., 2011; Kweka a kol., 2012). Karvakrol je charakteristický svojim prenikavým, štiplavým, drevitým zápachom. Okrem iného sa vyskytuje v rascových semiačkach, tymiáne a oregane (Burdock, 2010). Karvakryl metyléter má taktiež štiplavú, charakteristickú bylinnú arómu.

Gáfor sa prirodzene získava ako esenciálny olej najmä destiláciou z listov stromu *Cinnamomum* a *Laurus Camphora* pôvodom z Číny a Japonska. Gáfor je charakteristický štiplavým zápachom a spálenou horkou ale sviežou chuťou (Burdock, 2010). V extraktoch rýmovníku bol identifikovaný viac krát (Gurib-Fakim a kol., 1995; Hassani a kol., 2012; Erny Sabrina a kol., 2014).

Keďže sa obsah týchto zlúčenín so zvyšujúcou sa teplotou znižoval, pravdepodobne dochádzalo k ich degradácií. V štúdií Yang a kol. (2007) preukázali, že pri extrakcii subkritickou vodou pri teplotách pod 150 °C dochádzalo k degradácií 5 terpenov ( $\alpha$ -pinén, limonén, gáfor, citronellol a karvakrol) približne o 10 % a pri teplotách 200 a 250 °C stúplo percento degradácie až na 20–42 %.



Graf 15: Kyslíkové monoterpény.

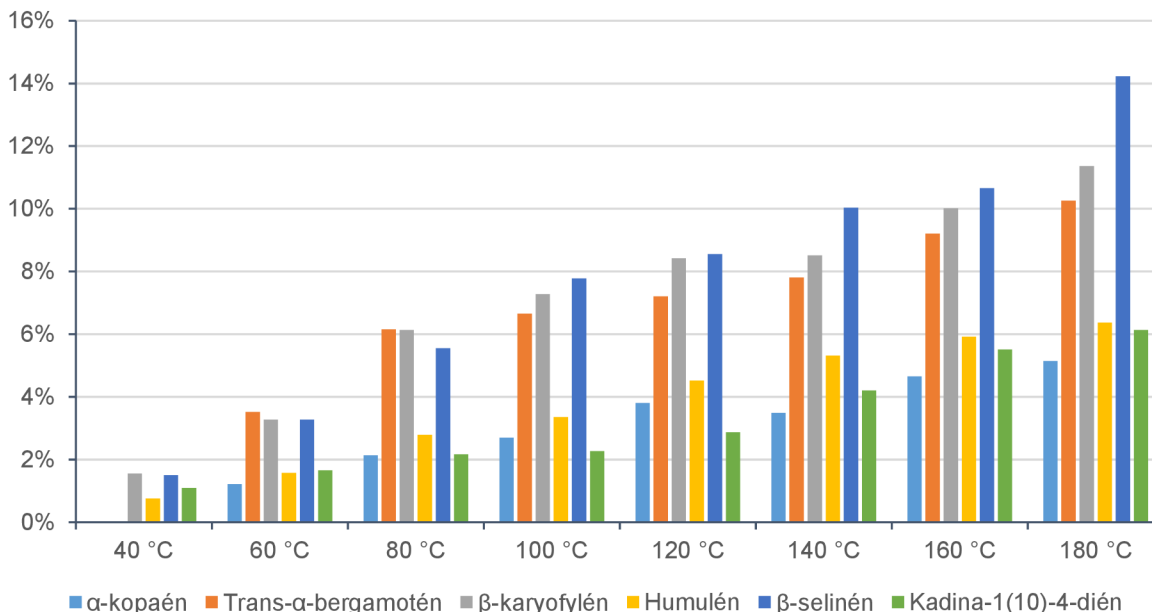
Obsah seskviterpénov sa so zvyšujúcou sa teplotou zvyšoval (vid' Graf 16). Obsah seskviterpénu  $\alpha$ -kopaénu bol až pri teplote 180 °C vyšší ako 5 %, pričom pri teplote 40 °C nebola jeho extrakcia zaznamenaná. Aróma tohto seskviterpénu je charakterizovaná ako zemitá, pripomínajúca vôňu pečených zemiakov (Wang, Kays, 2000). V extrakte rýmovníku bol identifikovaný v štúdií Gurib-Fakim a kol. (1995).

Trans- $\alpha$ -bergamotén takisto nebol identifikovaný v extrakte získanom pri 40 °C, avšak bola pri tejto teplote identifikovaná jeho optická forma cis- $\alpha$ -bergamotén. Trans- $\alpha$ -bergamotén je charakteristický svojou bergamotovou, sviežou, kvetinovou vôňou (Sawamura a kol., 2006).  $\beta$ -karyofylén bol identifikovaný vo všetkých extraktoch, je charakteristický drevito-korenistou, klinčekovou arómou. Bol viackrát identifikovaný v extraktoch získaných z rýmovníka (Murthy a kol., 2009; Velasco a kol., 2009; Da Costa a kol., 2010; Joshi a kol., 2011; Hassani a kol., 2012).

Humulén, alebo  $\alpha$ -karyofylén je izomér  $\beta$ -karyofylénu. Tvorí prirodzenú súčasť aromatických látok nachádzajúcich sa v chmeli (*Humulus lupulus*) a je podstatnou aromatickou látkou pri výrobe piva (Hartsel a kol., 2016). Je charakteristický svojou drevitou, korenistou vôňou. Bol identifikovaný v mnohých štúdiách ako látka prítomná v extrakte z rýmovníka (Rojas a kol., 2006; Velasco a kol., 2009; Da Costa a kol., 2010; Senthilkumar a kol., 2010; Joshi a kol., 2011; Hassani a kol., 2012; Kweka a kol., 2012).

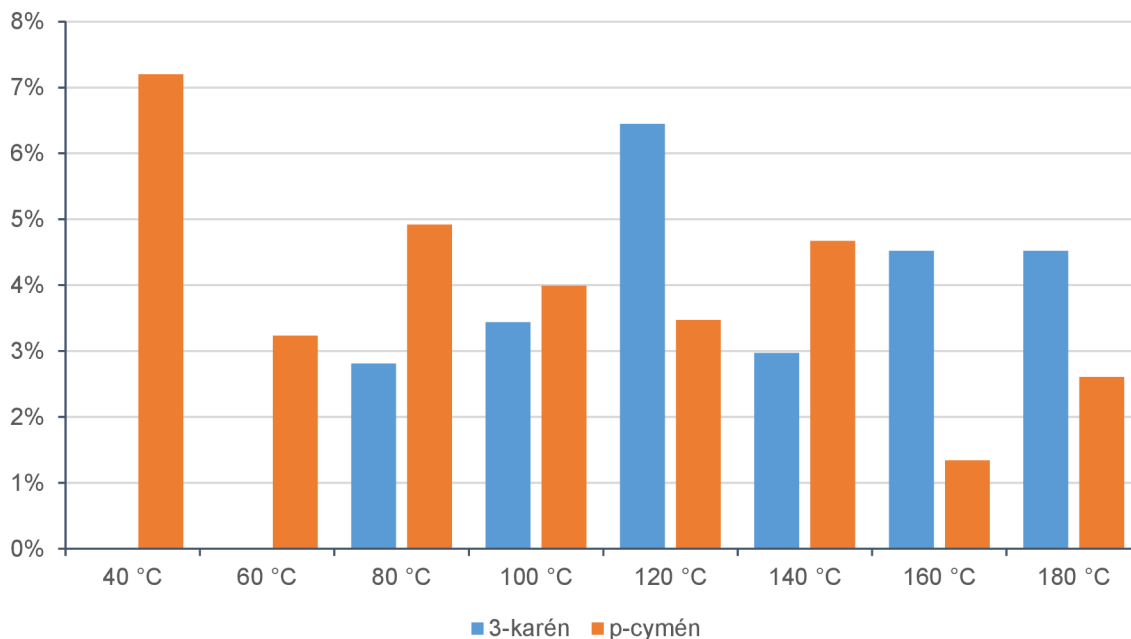
Obsah  $\beta$ -selinénu pri teplote 180 °C bol zo všetkých seskviterpénov najvyšší. Jeho prítomnosť bola potvrdená aj v ďalších štúdiách (Senthilkumar a kol., 2010; Hassani a kol., 2012; Kweka a kol., 2012).

Kadina-1(10)-4-dién zvyšoval svoj obsah takisto so zvyšujúcou sa teplotou extrakcie. Nebola dohľadá publikácia v ktorej sa už vyskytoval v rýmovníku, bol však identifikovaný napríklad jeho izomér  $\gamma$ -kadinén (El Hawary a kol., 2012).



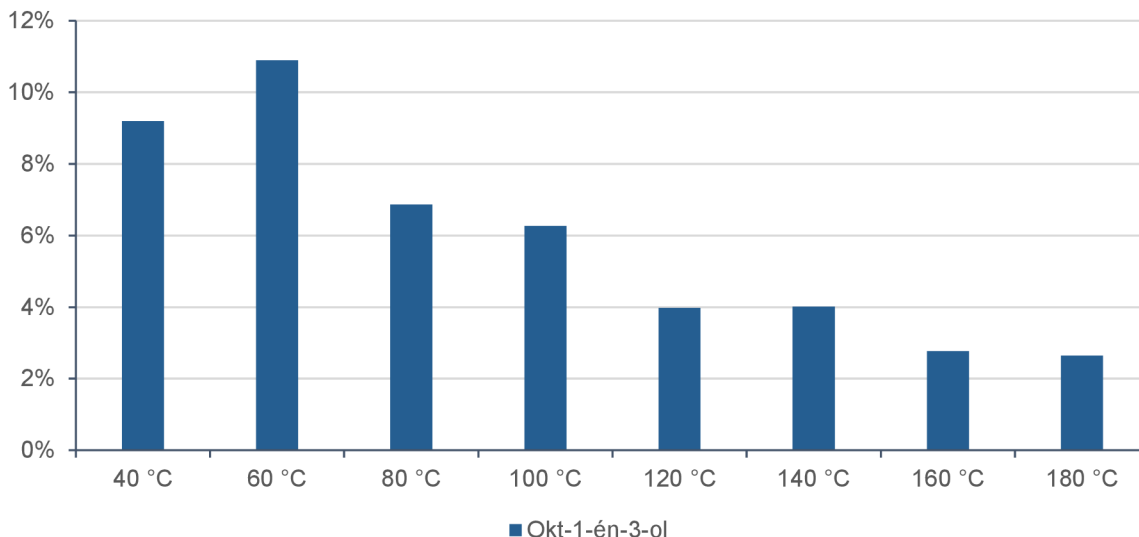
Graf 16: Terpénové uhľovodíky – seskviterpény.

Z monoterpenových uhľovodíkov boli najviac zastúpené zlúčeniny 3-karén a *p*-cymén. 3-karén má sladkú, prenikavú terpentínovú vôňu (Hartsel a kol., 2016). Jeho obsah sa vo vyšších teplotách mierne zvýšil, zatiaľ čo obsah *p*-cyménu sa znížil. *P*-cymén má citrusovú vôňu (Hartsel a kol., 2016) a je prekursorom pre vznik karvakrolu (viď. kap. 2.4.1.2).



Graf 17: Terpénové uhľovodíky – monoterpény.

Obsah okt-1-én-3-olu bol najvyšší pri extrakcii za podmienok 60 °C a následne jeho obsah so zvyšujúcou sa teplotou klesal (viď Graf 18). Jeho pach je sladký, silný, zemitý, bylinkový pripomínajúci levanduľu, ružu a seno. Chuť je sladká, bylinná (Hartsel a kol., 2016). Jeho prítomnosť v rýmovníkovom esenciálnom oleji bola potvrdená napríklad štúdiami Velasco a kol. (2009) či Tewari a kol. (2012).



Graf 18: Alkoholy

## 4.5 Charakterizácia „optimálneho“ extraktu

Za „optimálny“ extrakt z hľadiska obsahu polyfenolických a aromatických látok bol v rámci tejto práce, na základe zhodnotenia všetkých získaných výsledkov, zvolený extrakt získaný maceráciou, ktorého podmienky boli optimalizované pomocou metódy plánovania experimentu (viď kap. 4.2.2). Tento extrakt bol následne znovu pripravený v troch paralelných opakovaní za získaných optimálnych podmienok: teplota 60 °C, rozpúšťadlo 40% etanol, doba 90 minút a navážka 10 g na 100 ml (pomer navážky a rozpúšťadla 1:10) a charakterizovaný z hľadiska obsahu polyfenolov, aromatických látok a antioxidačnej aktivity za použitia totožných metód, ako v procese optimalizácie.

### 4.5.1 Celkový obsah polyfenolov

Celkový obsah polyfenolov v „optimálnom“ extrakte, stanovený spektrofotometricky Folin-Ciocalteuovou metódou, bol zistený  $0,18 \pm 0,05 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{ml}^{-1}$ , čo je v prepočte  $1,83 \pm 0,53 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  rastliny (viď Tabuľka 14).

Rastlinné polyfenoly sú spájané s antioxidačnou a antibakteriálnou aktivitou vďaka ich unikátnej štruktúre. Pozostávajú z jedného alebo viacerých aromatických kruhov, na ktoré je naviazaná jedna alebo viac hydroxylových skupín. Vďaka tomu sú polyfenoly schopné vychytávať voľné radikály formovaním rezonančne stabilizovaného fenoxylového radikálu.

V štúdií Dudonné a kol. (2009) boli porovnávané antioxidačné aktivity a celkové obsahy polyfenolov celkovo 30 rastlín, celkový obsah polyfenolov bol v rozsahu 6,86–397,03  $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  extraktu. Rastlina patriaca do čeľade hluchavkovitých, *Salvia sclarea*, mala celkový obsah polyfenolov  $17,56 \pm 0,24 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  extraktu.

V štúdií Sulaiman a kol. (2018) bol charakterizovaný extrakt získaný pomocou Soxhletovej extrakcie, ktorý bol následne odparený do sucha a rozpustený v rozpúšťadle (acetón, etanol, *n*-butanol). Extrakt získaný pomocou etanolu vykazoval najvyšší obsah polyfenolických látok, a to  $29,3 \pm 0,3 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  extraktu.

V štúdií Bhatt a kol. (2013) získavali extrakt maceráciou v etanole, ktorý následne odparili do sucha. Stanovený celkový obsah polyfenolov bol  $49,91 \pm 0,3 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  extraktu.

Ako je vidieť, v našom prípade bol zisk polyfenolov podstatne menší, je však potrebné brať do úvahy, že v štúdiách sa najčastejšie uvádza obsah polyfenolov v prepočte na odparený

extrakt v gramoch. Samozrejme tým dochádza k zahusťovaniu a k zvýšeniu obsahu polyfenolov. V tejto práci nebolo prípadné odparenie zakomponované, predovšetkým kvôli zachovaniu maximálnej šetrnosti prípravy extraktu, výsledky sú teda obtiažne porovnateľné.

V prípade, že by pre aplikáciu do potravín nebol vhodný etanol z hľadiska technológie spracovania danej potraviny, bolo by nutné extrakt odpariť do sucha a následne rozpustiť vo vhodnom rozpúšťadle (napr. voda) alebo ho použiť ako prášok. V takomto prípade by extrakt obsahoval vyššie množstvo polyfenolických látok, nakoľko by došlo k jeho zakonzentrovaniu, avšak je možné, že by sa zmenil jeho aromatický profil.

V prípade použitia extraktu do kozmetického priemyslu je etanol z hľadiska technológie vo všeobecnosti menším problémom a teda by nemuselo dochádzať k finálnemu odparovaniu.

#### 4.5.2 Antioxidačná aktivita

V získanom optimálnom extrakte bola stanovená antioxidačná aktivita pomocou metódy TEAC. Táto metóda je založená na meraní schopnosti vzorky zhášať radikál kation ABTS<sup>•+</sup>. Redukujúce zlúčeniny môžu redukovať oxidované medziprodukty procesu lipidovej peroxidácie a vďaka tomu pôsobiť ako primárne a sekundárne antioxidanty. Bola zistená antioxidačná aktivita extraktu  $148,69 \pm 26,92 \mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Táto metóda meria antioxidačnú aktivitu vo vode aj v tukoch rozpustných antioxidantov. Vyjadruje sa ako ekvivalent štandardu Trolox (TEAC). Čím je vyššia hodnota TEAC, tým je vyššia antioxidačná aktivita. Ďalším častým spôsobom, ako sa zisťuje antioxidačná aktivita je pomocou radikálu DPPH (Bhatt a kol., 2013; Bhatt, Negi, 2012).

Percento zhášania radikálu ABTS<sup>•+</sup> v optimálnom extrakte bolo podľa rovnice (2) vypočítané na  $30,03 \pm 5,44 \%$ .

Tabuľka 14: Charakteristiky optimálneho extraktu.

Celkový obsah polyfenolov	$0,18 \pm 0,05 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{ml}^{-1}$	$1,83 \pm 0,53 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$ rastliny
Antioxidačná aktivita	$148,69 \pm 26,92 \mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}$	
% zhášania radikálu	$30,03 \pm 5,44 \%$	

V štúdií Bhatt a Negi (2012) bola študovaná antioxidačná kapacita viacerých extraktov (metanolový, etanolový, acetónový, hexánový). Antioxidačnú kapacitu vyjadrili pomocou percenta zhášania radikálu DPPH. 50% etanolový extrakt vykazoval pri koncentrácii 100 ppm 30,4% aktivitu zhášania DPPH. V tejto štúdií bola takisto potvrdená korelácia medzi aktivitou zhášania radikálu a obsahom celkových polyfenolov.

Antioxidačnou aktivitou sa zaoberali aj niektoré ďalšie štúdie (viď 2.4.1.1). Porovnanie s antioxidačnou aktivitou získaného extraktu je obtiažne či už z dôvodu odlišnosti získania extraktu, odlišnosti metódy a v neposlednom rade odlišnosťou pôvodu a pestovania rastliny.

Nakoľko bola antioxidačná aktivita meraná v neodparenom extrakte, jeho prípadným zakonzentrováním by mohla byť antioxidačná aktivita vyššia, pri potenciálnom využití zmesi viacerých rastlín s bioaktívnymi zlúčeninami by mohol takýto extrakt vhodne poslúžiť ako antioxidačné činidlo v potravinách.



### 4.5.3 Aromatické látky

Aromatické látky sú dôležitou súčasťou bylín, okrem toho, že charakterizujú vôňu a chuť bylín, mnohé z nich majú aj bioaktívne účinky. Optimálny extrakt a zároveň aj samotná bylina bola podrobená analýze HS-SPME-GS-MS pre identifikáciu a semikvantifikáciu prítomných prchavých zlúčenín. Nakoľko boli aromatické látky prítomné v byline extrahované priamo pomocou SPME, zatiaľ čo v optimálnom extrakte boli najskôr extrahované do etanolu, možno pozorovať prípadnú účinnosť/neúčinnosť macerácie.

Celkovo bolo vo vzorkách identifikovaných 43 prchavých látok. Tabuľka 15 zobrazuje všetky identifikované látky a ich zaradenie do príslušnej skupiny. Celkovo bolo v byline identifikovaných 84,45 % prítomných zlúčenín a v extrakte 92,47 %. Do tohto percentuálneho vyjadrenia neboli započítané prvky so stopovým množstvom.

*Tabuľka 15: Identifikované zlúčeniny v optimálnom extrakte a ich percentuálne vyjadrenie. Stopové množstvo (st) < 0,5 %. Skupina terpénových uhľovodíkov je rozdelená na monoterpény a seskviterpény. Percentuálne zastúpenie je vyjadrené na základe ploch pík. Pri referenciách bola vždy vybratá len jedna publikácia.*

RT (min)	Zlúčenina	Percentuálne zastúpenie		Skupina	Referencie
		Optimálny extrakt	Bylina		
8,87	3-karén	8,22%	6,28%	Monoterpény	Hassani a kol. (2012)
8,94	$\alpha$ -pinén	2,68%	2,35%	Monoterpény	Galvão Rodrigues a kol. (2013)
8,89	sabinén	0,65%	st	Monoterpény	Hassani a kol. (2012)
9,31	$\beta$ -pinén	-	1,26%	Monoterpény	Galvão Rodrigues a kol. (2013)
10,32	limonén	0,68%	0,85%	Monoterpény	Hassani a kol. (2012)
11,15	hex-2-én-1-al	-	st	Aldehydy	
11,39	trans- $\beta$ -ocimén	-	st	Monoterpény	
11,61	3-tujén	-	st	Monoterpény	Velasco a kol. (2009)
11,74	$\gamma$ -terpinén	6,28%	5,37%	Monoterpény	Murthy a kol. (2009)
12,52	$\alpha$ -cymén	st	-	Monoterpény	El Hawary a kol. (2013)
12,57	$p$ -cymén	2,14%	7,68%	Monoterpény	Velasco a kol. (2009)
12,69	terpinolén	2,32%	1,91%	Monoterpény	
15,74	hex-3-én-1-ol	-	st	Alkoholy	
15,89	oktán-3-ol	-	0,54%	Alkoholy	
16,05	nonanal	st	-	Aldehydy	
16,23	fenchón	-	0,51%	Kysl. monoterpény	
17,54	okt-1-én-3-ol	st	2,50%	Alkoholy	Tewari a kol. (2012)
17,73	$\alpha$ -kubebén	st	0,87%	Seskviterpény	Murthy a kol. (2009)
17,98	cis-sabinén hydrát	-	st	Monoterpény	Tewari a kol. (2012)
18,90	$\alpha$ -kopaén	7,55%	5,93%	Seskviterpény	El Hawary a kol. (2013)
19,70	gáfor	1,88%	7,59%	Kysl. monoterpény	Hassani a kol. (2012)
19,97	germacrene D	1,37%	-	Seskviterpény	El Hawary a kol. (2013)
19,99	$\beta$ -kopaén	st	st	Seskviterpény	El Hawary a kol. (2013)

Zlúčenina	Percentuálne zastúpenie		Skupina	
	Optimálny extrakt	Bylina		
20,12 linalol	-	0,58%	Kysl. monoterpény	Hassani a kol. (2012)
20,24 trans-sabinén hydrát	-	st	Monoterpény	Kweka a kol. (2012)
20,95 nonylester acetát	-	st	Estery	
21,17 trans- $\alpha$ -bergamotén	14,22%	11,96%	Seskviterpény	Velasco a kol. (2009)
21,45 $\beta$ -elemén	st	-	Seskviterpény	El Hawary a kol. (2013)
21,70 karyofylén	14,11%	7,41%	Seskviterpény	Velasco a kol. (2009)
21,79 karvakryl metyléter	1,59%	-	Kysl. monoterpény	
23,75 cis- $\beta$ -farnezen	0,51%	1,03%	Seskviterpény	
23,58 humulén	5,87%	4,52%	Seskviterpény	Velasco a kol. (2009)
24,1 $\gamma$ -elemén	-	st	Seskviterpény	
24,52 Isogermacrene D	-	0,93%	Seskviterpény	
24,89 $\beta$ -selinén	16,67%	8,71%	Seskviterpény	Hassani a kol. (2012)
25,67 $\gamma$ -muuroolén	st	-	Seskviterpény	El Hawary a kol. (2013)
25,62 kadina-1(10)-4-dién	5,19%	2,64%	Seskviterpény	
25,70 $\gamma$ -kadinén	-	0,55%	Seskviterpény	El Hawary a kol. (2013)
25,83 $\beta$ -seskvifelandrén	st	st	Seskviterpény	
27,43 kalamén	st	st	Seskviterpény	
29,74 kubebol	-	st	Kysl. seskviterpény	
30,94 karyofylén oxid	-	st	Kysl. seskviterpény	Tewari a kol. (2012)
35,44 karvakrol	0,54%	2,47%	Kysl. monoterpény	Tewari a kol. (2012)
Celkom	92,47%	84,45%		

V byline bolo identifikovaných celkovo 37 zlúčenín a v extrakte 27 (viď Tabuľka 16). Hlavné skupiny identifikované v oboch prípadoch boli seskviterpény a monoterpény. Počet seskviterpénov bol rovnaký, avšak percentuálne zastúpenie v extrakte bolo vyššie. Počet monoterpénov identifikovaných v byline bol vyšší ako v extrakte, čo sa odzrkadlilo aj na percentuálnom zastúpení. Kyslíkové monoterpény mali vyšší obsah v byline, z hľadiska počtu sa jedná len o rozdiel jedného kyslíkového monoterpénu. V extrakte neboli identifikované žiadne estery a kyslíkové seskviterpény, v byline boli identifikované len v stopovom množstve. Aldehydy boli v oboch prípadoch identifikované len v stopovom množstve. Percentuálne zastúpenie jednotlivých skupín prehľadne vyjadruje Graf 19.

Najviac zastúpené v byline boli tieto zlúčeniny: trans- $\alpha$ -bergamotén (11,96 %),  $\beta$ -selinén (8,71 %), *p*-cymén (7,68 %), gáfor (7,59 %), karyofylén (7,41 %), 3-karén (6,28 %),  $\alpha$ -kopaén (5,93 %),  $\gamma$ -terpinén (5,37 %) a humulén (4,52 %).

V extrakte boli najviac zastúpené:  $\beta$ -selinén (16,67 %), trans- $\alpha$ -bergamotén (14,22 %), karyofylén (14,11 %), 3-karén (8,22 %),  $\alpha$ -kopaén (7,55 %),  $\gamma$ -terpinén (6,28 %), humulén (5,87 %), kadina-1(10)-4-dién (5,19 %).

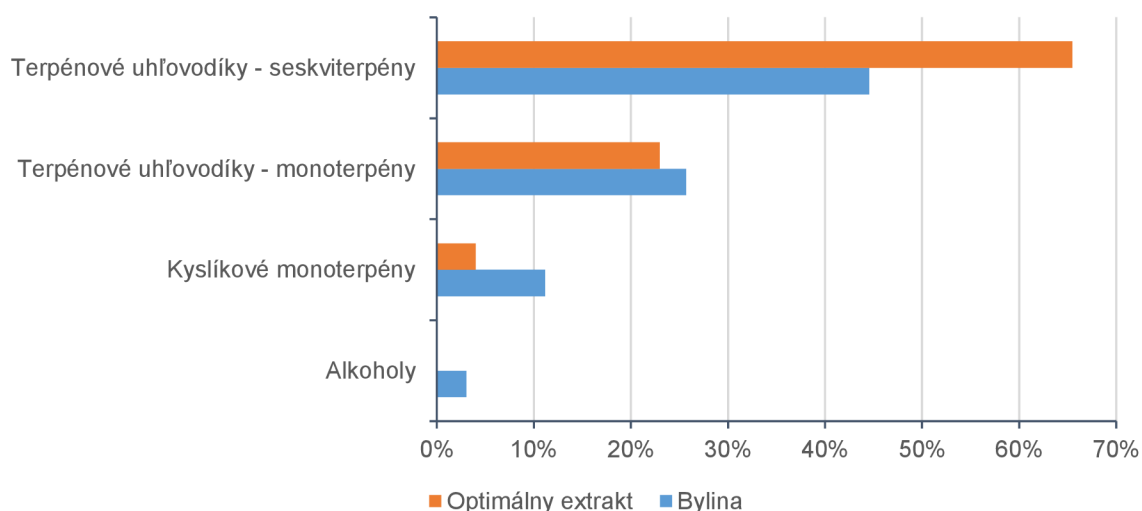
Percentuálne zastúpenie jednotlivých látok v byline a extrakte sa mierne líšil, avšak kvalitatívne sa vyskytujú vo veľkej miere tie isté zlúčeniny. Zlúčeniny, ktoré boli identifikované len v extrakte sú: *o*-cymén, nonanal., germacrene D,  $\beta$ -elemén, karvakryl

metyléter,  $\gamma$ -murolén. Podľa referencií už boli tieto zlúčeniny v minulosti v extraktoch z rýmovníka identifikované. Zo zlúčenín, pre ktoré sa nepodarilo nájsť žiadnu publikáciu, v ktorej boli doteraz identifikované, je najviac zastúpená v byline a extrakte zlúčenina kadina-1(10)-4-dién, ďalej boli ako nové identifikované Isogermacrene D, cis- $\beta$ -farnezén, karvakryl metyléter, fenchón, oktán-3-ol, terpinolén a niektoré ďalšie identifikované v stopovom množstve. Jedná sa prevažne o terpenové zlúčeniny.

Tabuľka 16: Počet identifikovaných zlúčenín rozdelených do skupín a ich percentuálne zastúpenie.

	Počet zlúčenín		Percentuálne zastúpenie skupín	
	Bylin a	Optimálny extrakt	Bylina	Optimálny extrakt
Aldehydy	1	1	st	st
Alkoholy	3	1	3,04%	st
Estery	1	0	st	0,00%
Kyslíkové monoterpény	4	3	11,15%	4,01%
Kyslíkové seskviterpény	2	0	st	0,00%
Terpenové uhľovodíky – monoterpény	12	8	25,70%	22,97%
Terpenové uhľovodíky – seskviterpény	14	14	44,55%	65,49%
Celkom	37	27	84,45%	92,47%

Karvakrol, ktorý bol vo viacerých štúdiách (Gurib-Fakim a kol., 1995; Murthy a kol., 2009; Velasco a kol., 2009; Senthilkumar a kol., 2010; Joshi a kol., 2011; Kweka a kol., 2012) zaznamenávaný ako najviac zastúpená zlúčenina v esenciálnych olejoch rýmovníka, sa v našom extrakte (0,54 %), ale aj v byline (2,47 %), vyskytoval v malom množstve. Naopak v extraktoch PHWE sa už pri teplote 40 °C vyskytoval v pomerne vysokých koncentráciách (viď Graf 15). Pri PHWE mohlo dôjsť k vyššej extrakcii karvakrolu v dôsledku vysokého tlaku a teda vyššiemu porušeniu bunkových stien. SPME ani vyššia teplota pri macerácii a 40% etanol ako rozpúšťadlo pravdepodobne neboli dostatočne účinné nato, aby vyextrahovali vysoké množstvo karvakrolu. V uvedených štúdiách, kde sa vyskytuje karvakrol vo vysokých percentách, sa jedná o esenciálny olej, ktorý sa najčastejšie získava hydrodestiláciou, kde je použitá vysoká teplota po dlhší čas.



Graf 19: Percentuálne zastúpenie jednotlivých skupín.

## 5 ZÁVER

Hlavným cieľom diplomovej práce bolo nájsť optimálny spôsob a podmienky pre zisk extraktu z rýmovníku (*Plectranthus amboinicus*) so zachovaním maxima nutrične a senzoricke cenných zložiek, pre prípadné použitie v potravinárskom alebo kozmetickom priemysle. Pre experimenty boli použité čerstvé listy rýmovníku, vypestovaného v laboratórnych podmienkach.

Celkom boli vykonané tri rôzne spôsoby extrakcie: macerácia, PFE a PHWE extrakcia.

Získané extrakty boli charakterizované z hľadiska antioxidačnej aktivity, resp. celkového obsahu polyfenolov ako dominantných biologicky aktívnych zlúčenín s antioxidačným potenciálom a profilu prchavých (aromatických) látok ako markerov senzorickej kvality.

Antioxidačná aktivita bola meraná metódou TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), celkový obsah polyfenolických zlúčenín spektrofotometricky Folin-Ciocalteu metódou. Pre stanovenie aromatických látok bola použitá metóda headspace mikroextrakcie tuhou fázou v spojení s plynovou chromatografiou s hmotnostnou detekciou.

Podmienky macerácie ako extrakčnej metódy boli optimalizované pomocou matematickej štatistickej metódy plánovania experimentu. Bol navrhnutý dvojúrovňový faktorový dizajn  $2^4$  so sledovanými faktormi: pomer navážky a rozpúšťadla, typ rozpúšťadla, teplota a doba extrakcie. Ako najvýznamnejšie faktory boli identifikované teplota extrakcie a pomer navážky a rozpúšťadla.

Teplota extrakcie mala na extrahované množstvo polyfenolických látok najvyšší vplyv, čo mohlo byť spôsobené väčším porušením bunkových štruktúr a lepším prestupom rozpúšťadla.

Navážka mala naopak vplyv záporný, t. j. čím vyššie množstvo navážky na určitý objem rozpúšťadla, tým nižší obsah získaných polyfenolických látok. Tento jav mohol byť spôsobený nedostatočným prestúpením média k celému povrchu všetkých častíc rastlín. Riešením tohto javu by mohla byť miešaná macerácia.

Samotné rozpúšťadlo – koncentrácia etanolu (%) nemala na obsah polyfenolických látok štatisticky významný vplyv.

Doba macerácie mala kladný vplyv na obsah polyfenolických látok, t. j. čím je vyššia teplota a dlhšia doba macerácie, tým je vyšší zisk polyfenolických látok v macerate. Kladný efekt teploty je dvakrát vyšší ako pri čase, čo napovedá, že napríklad pri prevedení do praxe je pre optimálny zisk polyfenolických látok lepšie zvýšiť teplotu a znížiť čas, ich kombináciou je možné dosiahnuť optimálny výsledok.

Na základe vyhodnotených dát boli ako optimálne podmienky macerácie zvolené: teplota 60 °C, pomer navážky a rozpúšťadla 1:10, doba extrakcie 90 minút, rozpúšťadlo 40% etanol.

Na Ústave analytickej chémie AVČR boli pre porovnanie prevedené extrakcie PFE (*Pressurised Fluid Extraction*) a PHWE (*Pressurised Hot Water Extraction*). Tieto metódy sa radia medzi tzv. „zelené metódy“ a ponúkajú oproti macerácii radu výhod, napr. rýchlosť, efektívnosť, využitie vody ako rozpúšťadla. Nepodarilo sa však získať výrazne vyššie výťažky polyfenolov, naviac v prípade PHWE použitá vysoká teplota mala negatívny vplyv na profil aromatických látok, pri vysokých teplotách sa objavila tmavá hnedá farba extraktu a senzoricke neprijemný zápach. Ktoré látky sú za tento pach zodpovedné je bez príslušnej metodiky, najlepšie plynová chromatografia s olfaktometriou, obtiažne určiť.

Pokiaľ vezmeme do úvahy aj obmedzenú dostupnosť a vyššie náklady na extrakciu, ako najvhodnejšie pre naše účely bola zvolená macerácia za vyššie zmienených optimálnych podmienok, predovšetkým kvôli jednoduchosti prevedenia.

Získaný optimálny macerát bol charakterizovaný z hľadiska obsahu polyfenolických látok, antioxidačnej aktivity a aromatických látok. Jeho celkový obsah polyfenolických látok bol  $0,18 \pm 0,05 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{ml}^{-1}$ , čo je v prepočte  $1,83 \pm 0,53 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}^{-1}$  rastliny, antioxidačná aktivita

bola  $148,69 \pm 26,92 \mu\text{g}_{\text{TEAC}} \cdot \text{ml}^{-1}$  a percento zhášania radikálu ABTS<sup>•+</sup>  $30,03 \pm 5,44 \%$ . Najviac zastúpené identifikované aromatické látky v extrakte boli:  $\beta$ -selinén (16,67 %), trans- $\alpha$ -bergamotén (14,22 %), karyofylén (14,11 %), 3-karén (8,22 %),  $\alpha$ -kopaén (7,55 %),  $\gamma$ -terpinén (6,28 %), humulén (5,87 %), kadina-1(10)-4-dién (5,19 %).

Výsledky tejto diplomovej práce môžu byť považované za prvé údaje použiteľné k výberu jednoduchej, rýchlej, lacnej, účinnej ale pokiaľ možno šetrnej, v praxi ľahko použiteľnej extrakčnej metódy, vhodnej pre získanie biologicky účinných látok z rôznych rastlinných materiálov.

## 6 POUŽITÁ LITERATÚRA

AGUIAR, José J.S., Cicera P.B. SOUSA, Mariana K.A. ARARUNA, Maria K.N. SILVA, Aline C. PORTELO, Jeferson C. LOPES a Victória R.A. CARVALHO, 2015. Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. *European Journal of Integrative Medicine* [online]. **7**(2), 151-156 [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.1016/j.eujim.2014.10.005. ISSN 18763820. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876382014003084?via%3Dihub>

AJITHA, B., Y. ASHOK KUMAR REDDY a P. SREEDHARA REDDY, 2014. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Plectranthus amboinicus* leaf extract and its antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. **128**, 257-262 [cit. 2020-05-02]. DOI: 10.1016/j.saa.2014.02.105. ISSN 13861425. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142514002923>

ANTOLOVICH, Michael, Paul D. PRENZLER, Emiliós PATSALIDES, Suzanne MCDONALD a Kevin ROBARDS, 2002. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst* [online]. **127**(1), 183-198 [cit. 2020-02-02]. DOI: 10.1039/b009171p. ISSN 00032654. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b009171p>

APAK, Reşat, Shela GORINSTEIN, Volker BÖHM, Karen M. SCHAICH, Mustafa ÖZYÜREK a Kubilay GÜÇLÜ, 2013. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* [online]. **85**(5), 957-998 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1351/PAC-REP-12-07-15. ISSN 1365-3075. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.2013.85.issue-5/pac-rep-12-07-15/pac-rep-12-07-15.xml>

ARUMUGAM, Greetha, Mallappa SWAMY a Uma SINNIHAH, 2016. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance. *Molecules* [online]. **21**(4) [cit. 2020-02-01]. DOI: 10.3390/molecules21040369. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/4/369>

AZMIR, J., I.S.M. ZAIDUL, M.M. RAHMAN, et al., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* [online]. **117**(4), 426-436 [cit. 2020-01-26]. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014. ISSN 02608774. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877413000277>

AZWANIDA, NN, 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants* [online]. **04**(03) [cit. 2020-01-19]. DOI: 10.4172/2167-0412.1000196. ISSN 21670412. Dostupné z: <http://www.omicsgroup.org/journals/a-review-on-the-extraction-methods-use-in-medicinal-plants-principle-strength-and-limitation-2167-0412-1000196.php?aid=58448>

BAKKALI, F., S. AVERBECK, D. AVERBECK a M. IDAOMAR, 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **46**(2), 446-475 [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507004541>

BALZ, Rodolphe, 1996. *The Healing Power of Essential Oils: Fragrance Secrets for Everyday Use: Fragrance Secrets for Everyday Use. This handbook is a compact reference*

work on the effects and applications of 248 essential oils for health, fitness, and well-being. USA: Lotus Press. ISBN 81-208-1612-9.

BARBA, Francisco J., María J. ESTEVE a Ana FRÍGOLA, 2014. Bioactive Components from Leaf Vegetable Products. *Studies in Natural Products Chemistry* [online]. Elsevier, 2014, (vol 41), 321-346 [cit. 2020-02-01]. *Studies in Natural Products Chemistry*. DOI: 10.1016/B978-0-444-63294-4.00011-5. ISBN 9780444632944. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444632944000115>

BHATT, Praveena, Gilbert Stanley JOSEPH, Pradeep Singh NEGI a Mandyam Chakravarthy VARADARAJ, 2013. Chemical Composition and Nutraceutical Potential of Indian Borage ( *Plectranthus amboinicus* ) Stem Extract. *Journal of Chemistry* [online]. 2013, 1-7 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1155/2013/320329. ISSN 2090-9063. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jchem/2013/320329/>

BHATT, Praveena a Pradeep S. NEGI, 2012. Antioxidant and Antibacterial Activities in the Leaf Extracts of Indian Borage ( *Plectranthus amboinicus* ). *Food and Nutrition Sciences* [online]. 03(02), 146-152 [cit. 2020-02-01]. DOI: 10.4236/fns.2012.32022. ISSN 2157-944X. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/fns.2012.32022>

BURDĚJOVÁ, L. Komplexní charakterizace léčivých rostlin a jejich potenciál při využití v potravinářském průmyslu jako zdroje funkčních komponent. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 196 s.

BURDOCK, George A., 2010. *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*. 6th ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN 9781420090772.

BURT, Sara, 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 94(3), 223-253 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160504001680>

CAN BAŞER, K. Hüsnü a Temel ÖZEK, 2012. Analysis of Essential Oils and Fragrances by Gas Chromatography. *Gas Chromatography* [online]. Vol.1. Oxford, UK: Elsevier, 2012, s. 519-527 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1016/B978-0-12-385540-4.00022-5. ISBN 9780123855404. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123855404000225>

CARSON, C. F., B. J. MEE a T. V. RILEY, 2002. Mechanism of Action of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil on Staphylococcus aureus Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 46(6), 1914-1920 [cit. 2020-01-28]. DOI: 10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002>

CICCO, Nunzia, Maria T. LANORTE, Margherita PARAGGIO, Mariassunta VIGGIANO a Vincenzo LATTANZIO, 2009. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* [online].

91(1), 107-110 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1016/j.microc.2008.08.011. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X08001070>

COOK, F.E.M., 1995. *Economic Botany Data Collection Standard: International Working Group on Taxonomic Databases for Plant Sciences (TDWG)*. 1. UK: Royal Botanic Gardens (Kew). ISBN 0947643710.

ĆUJIĆ, Nada, Katarina ŠAVIKIN, Teodora JANKOVIĆ, Dejan PLJEVLJAKUŠIĆ, Gordana ZDUNIĆ a Svetlana IBRIĆ, 2016. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry* [online]. **194**, 135-142 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.08.008. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615011917>

DA COSTA, José G.M., Carla K.B. PEREIRA, Fabíola F.G. RODRIGUES a Sidney G. DE LIMA, 2010. Chemical Composition, Antibacterial and Fungicidal Activities of Leaf Oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Journal of Essential Oil Research* [online]. **22**(2), 183-185 [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.1080/10412905.2010.9700298. ISSN 1041-2905. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2010.9700298>

DÁVILA-RODRÍGUEZ, Mónica, Aurelio LÓPEZ-MALO, Enrique PALOU, Nelly RAMÍREZ-CORONA a María Teresa JIMÉNEZ-MUNGUÍA, 2019. Antimicrobial activity of nanoemulsions of cinnamon, rosemary, and oregano essential oils on fresh celery. *LWT* [online]. **112** [cit. 2020-05-02]. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.06.014. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643819305778>

DENT, Maja, Veronica DRAGOVIĆ-UZELAC, Marija PENIĆ, Mladen BRNČIĆ, Tomislav BOSILJKOV a Branka LEVAJ, 2013. The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technology Biotechnology* [online]. (51), 84-91 [cit. 2020-03-30]. ISSN 1330-9862. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/236964212> The Effect of Extraction Solvents Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage *Salvia officinalis* L Extracts

DI PASQUA, Rosangela, Gianfranco MAMONE, Pasquale FERRANTI, Danilo ERCOLINI a Gianluigi MAURIELLO, 2010. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *PROTEOMICS* [online]. **Vol 10**(No 5), NA-NA [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.1002/pmic.200900568. ISSN 16159853. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200900568>

DORMAN, H. J. D. a S. G. DEANS, 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **88**(2), 308-316 [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>

DUDONNÉ, Stéphanie, Xavier VITRAC, Philippe COUTIÈRE, Marion WOILLEZ a Jean-Michel MÉRILLON, 2009. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **57**(5), 1768-1774 [cit.



2020-05-04]. DOI: 10.1021/jf803011r. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf803011r>

EGHBALIFERIZ, Samira a Mehrdad IRANSHAHI, 2016. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. *Phytotherapy Research* [online]. **30**(9), 1379-1391 [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.1002/ptr.5643. ISSN 0951418X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.5643>

EL HAWARY, Seham S., Rabie H. EL SOFANY, Azza Ramy ABDEL-MONEM, Rehab M.S. ASHOUR a Amany Ameen SLEEM, 2013. Seasonal variation in the composition of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil and its biological activities. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* [online]. **1**(2), 11-18 [cit. 2020-05-02]. ISSN 2321 9114. Dostupné z: <http://www.essencejournal.com/vol1/issue2/pdf/6.1.pdf>

ERNY SABRINA, M.N., M. RAZALI, M.A. MOHD SHUKRI a A.H.S. MIRFAT, 2014. Antimicrobial activity and bioactive evaluation of *Plectranthus amboinicus* essential oil. *American Journal of Research Communication* [online]. **2**(12), 121-127 [cit. 2020-04-04]. ISSN 2325-4076. Dostupné z: [http://www.usa-journals.com/wp-content/uploads/2014/11/Erny\\_Vol212.pdf](http://www.usa-journals.com/wp-content/uploads/2014/11/Erny_Vol212.pdf)

FIGUEIREDO, A. Cristina, José G. BARROSO, Luis G. PEDRO a Johannes J. C. SCHEFFER, 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. **23**(4), 213-226 [cit. 2020-05-02]. DOI: 10.1002/ffj.1875. ISSN 08825734. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1875>

FRIEDMAN, Mendel, Robert BUICK a Christopher T. ELLIOTT, 2006. Antimicrobial activities of plant compounds against antibiotic-resistant *Micrococcus luteus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. **28**(2), 156-158 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2006.05.023. ISSN 09248579. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092485790600197X>

FRIEDMAN, MENDEL, PHILIP R. HENIKA a ROBERT E. MANDRELL, 2002. Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* [online]. **65**(10), 1545-1560 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.4315/0362-028X-65.10.1545. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-65.10.1545>

GALVÃO RODRIGUES, Fabíola Fernandes, José Galberto Martins COSTA, Fábio Fernandes Galvao RODRIGUES a Adriana Rolim CAMPOS, 2013. Study of the Interference between *Plectranthus* Species Essential Oils from Brazil and Aminoglycosides. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. **2013**, 1-7 [cit. 2020-05-02]. DOI: 10.1155/2013/724161. ISSN 1741-427X. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/724161/>

GIACOMETTI, Jasminka, Predrag PUTNIK, Domagoj GABRIĆ, et al., 2018. Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International* [online]. **2018**(Volume

113), 245-262 [cit. 2019-11-24]. ISSN 0963-9969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.036>

GONÇALVES, Thially Braga, Milena Aguiar BRAGA, Francisco F.M. DE OLIVEIRA, et al., 2012. Effect of subinhibitory and inhibitory concentrations of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on *Klebsiella pneumoniae*. *Phytomedicine* [online]. **19**(11), 962-968 [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.1016/j.phymed.2012.05.013. ISSN 09447113. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711312001912?via%3Dihub>

GOUVEIA, Ana Rita, Márcio ALVES, José António SILVA a Cristina SARAIVA, 2016. The Antimicrobial Effect of Rosemary and Thyme Essential Oils Against *Listeria Monocytogenes* in Sous Vide Cook-chill Beef During Storage. *Procedia Food Science* [online]. **7**, 173-176 [cit. 2020-01-28]. DOI: 10.1016/j.profoo.2016.10.001. ISSN 2211601X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X16300293>

GRANATO, Daniel, Domingos Sávio NUNES a Francisco J. BARBA, 2017. An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **62**, 13-22 [cit. 2020-02-01]. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.12.010. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224416303284>

GURIB-FAKIM, Ameenah, Mala D. SEWRAJ, Fawzia NAROD a Chantal MENUT, 1995. Aromatic Plants of Mauritius: Volatile Constituents of the Essential Oils of *Coleus aromaticus* Benth., *Triphasia trifolia* (Burm.f.) and *Eucalyptus kirtoniana* F. Muell. *Journal of Essential Oil Research* [online]. **7**(2), 215-218 [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.1080/10412905.1995.9698504. ISSN 1041-2905. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1995.9698504>

HALLIWELL, Barry a John M.C. GUTTERIDGE, 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **280**(1), 1-8 [cit. 2020-01-29]. DOI: 10.1016/0003-9861(90)90510-6. ISSN 00039861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003986190905106>

HARTSEL, Joshua A., Joshua EADES, Brian HICKORY a Alexandros MAKRIYANNIS, 2016. Cannabis sativa and Hemp. *Nutraceuticals* [online]. Academic Press: Elsevier, 2016 [cit. 2020-04-29]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802147-7.00053-X. ISBN 9780128021477. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012802147700053X>

HASHEMI, Seyed Mohammad Bagher, Amin Mousavi KHANEGHAH a Anderson de Souza SANT'ANA, 2018. *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications*. Hoboken, NJ: John Wiley. IFT Press series. ISBN 978-111-9149-347.

HASSANI, M. Saïd, I. ZAINATI, S. ZRIRA, S. MAHDI a M. OUKESSOU, 2012. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spring. Essential Oil from Archipelago of Comoros. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* [online]. **15**(4), 637-644 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.1080/0972060X.2012.10644098. ISSN 0972-060X. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2012.10644098>

HOLČAPEK, Michal, 2016. *Spojení hmotnostní spektrometrie a separačních technik* [online]. In: . [cit. 2020-02-15]. Dostupné z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/09\\_Spojeni\\_MS\\_separace.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/09_Spojeni_MS_separace.pdf)

HOSSAIN, M.B., C. BARRY-RYAN, A.B. MARTIN-DIANA a N.P. BRUNTON, 2011. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chemistry* [online]. **126**(1), 339-346 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.10.076. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610013336>

HUANG, Hsiao-Wen, Chiao-Ping HSU, Binghuei Barry YANG a Chung-Yi WANG, 2013. Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. *Trends in food science & technology* [online]. **33**(1), 54-62 [cit. 2020-01-21]. DOI: 10.1016/j.tifs.2013.07.001. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224413001386>

HYLDGAARD, Morten, Tina MYGIND a Rikke Louise MEYER, 2012. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology* [online]. **3**(Article 12), 1-24 [cit. 2020-02-16]. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00012. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00012/abstract>

CHEMAT, Farid, Maryline ABERT-VIAN, Anne Sylvie FABIANO-TIXIER, Jochen STRUBE, Lukas UHLENBROCK, Veronika GUNJEVIC a Giancarlo CRAVOTTO, 2019. Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. **118**, 248-263 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1016/j.trac.2019.05.037. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993619300706>

CHEMAT, Farid, Natacha ROMBAUT, Alice MEULLEMIESTRE, Mohammad TURK, Sandrine PERINO, Anne-Sylvie FABIANO-TIXIER a Maryline ABERT-VIAN, 2017. Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [online]. **41**, 357-377 [cit. 2020-01-23]. DOI: 10.1016/j.ifset.2017.04.016. ISSN 14668564. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856416307032>

CHENDYNSKI, L.T., T. CORDEIRO, G.B. MESSIAS, A.C.G. MANTOVANI, K.R. SPACINO, M.L. ZERAIK a D. BORSATO, 2020. Evaluation and application of extracts of rosemary leaves, araçá pulp and peel of bacuri in the inhibition of the oxidation reaction of biodiesel. *Fuel* [online]. **261** [cit. 2019-12-26]. DOI: 10.1016/j.fuel.2019.116379. ISSN 00162361. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236119317338>

CHEYNIER, Véronique, Gilles COMTE, Kevin M. DAVIES, Vincenzo LATTANZIO a Stefan MARTENS, 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry* [online]. (vol. 72), 1-20 [cit. 2020-01-29]. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.05.009. ISSN 09819428. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942813001745>

CHIZZOLA, Remigius, Hanneliese MICHITSCH a Chlodwig FRANZ, 2008. Antioxidative Properties of Thymus vulgaris Leaves: Comparison of Different Extracts and Essential Oil Chemotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **56**(16), 6897-6904 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1021/jf800617g. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf800617g>

INÁCIO, Marielle C., Rita Maria MORAES, Patrícia C. MENDONÇA, Lucas J. F. MOREL, Suzelei C. FRANÇA, Bianca W. BERTONI a Ana M. S. PEREIRA, 2013. Phenolic Compounds Influence Seed Dormancy of *Palicourea rigida* H.B.K. (Rubiaceae), a Medicinal Plant of the Brazilian Savannah. *American Journal of Plant Sciences* [online]. **04**(01), 129-133 [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.4236/ajps.2013.41017. ISSN 2158-2742. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ajps.2013.41017>

JOSHI, R.K., V. BADA KAR a S.D. KOHLKUTE, 2011. Carvacrol Rich Essential Oils of Coleus aromaticus (Benth.) from Western Ghats Region of North West Karnataka, India. *Advances in Environmental Biology* [online]. **5**(6), 1307-1310 [cit. 2020-04-05]. ISSN 1995-0756. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/95fb/e6cb34528ae6f8870296858431e3c29e9f26.pdf>

JOVANOVIĆ, Aleksandra A., Verica B. ĐORĐEVIĆ, Gordana M. ZDUNIĆ, Dejan S. PLJEVLJAKUŠIĆ, Katarina P. ŠAVIKIN, Dejan M. GOĐEVAC a Branko M. BUGARSKI, 2017. Optimization of the extraction process of polyphenols from Thymus serpyllum L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Separation and Purification Technology* [online]. **179**, 369-380 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.1016/j.seppur.2017.01.055. ISSN 13835866. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586616318421>

KALEMBA, D. a A. KUNICKA, 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry* [online]. **10**(10), 813-829 [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.2174/0929867033457719. ISSN 09298673. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12678685>

KARAMANOLI, K., D. VOKOU, U. MENKISSOGLU a H.-I. CONSTANTINIDOU, 2000. Bacterial colonization of phyllosphere of mediterranean aromatic plants. *Journal of Chemical Ecology* [online]. **26**(9), 2035-2048 [cit. 2020-02-01]. DOI: 10.1023/A:1005556013314. ISSN 00980331. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1005556013314>

KHANUM, Hafeeza, Kulathooran RAMALAKSHMI, Pullabhatla SRINIVAS a Babasaheb Bhaskarrao BORSE, 2011. Synergistic Antioxidant Action of Oregano, Ajowan and Borage Extracts. *Food and Nutrition Sciences* [online]. **02**(05), 387-392 [cit. 2020-02-01]. DOI: 10.4236/fns.2011.25054. ISSN 2157-944X. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/fns.2011.25054>

KIM, Il-Young, Sang-Hoon SUH, In-Kyu LEE a Robert R WOLFE, 2016. Applications of stable, nonradioactive isotope tracers in in vivo human metabolic research. *Experimental & Molecular Medicine* [online]. **48**(1), e203-e203 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1038/emm.2015.97. ISSN 2092-6413. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/emm201597>

KNOBLOCH, Karl, Alexander PAULI, Bernard IBERL, Hildegunde WEIGAND a Norbert WEIS, 2011. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components. *Journal of Essential Oil Research* [online]. **1**(3), 119-128 [cit. 2020-02-08]. DOI: 10.1080/10412905.1989.9697767. ISSN 1041-2905. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10412905.1989.9697767>

KRIS-ETHERTON, Penny M, Kari D HECKER, Andrea BONANOME, Stacie M COVAL, Amy E BINKOSKI, Kirsten F HILPERT, Amy E GRIEL a Terry D ETHERTON, 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine* [online]. **113**(9), 71-88 [cit. 2020-02-01]. DOI: 10.1016/S0002-9343(01)00995-0. ISSN 00029343. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002934301009950>

KUBÍNOVÁ, Renata a Miroslava STRUŽKOVÁ, 2014. Fytoterapeutický potenciál vybraných druhů rodu *Plectranthus*. *Praktické lékarenství* [online]. **10**(3), 112-114 [cit. 2020-05-04]. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/artkey/lek-201403-0009> Fytoterapeuticky potencial vybranych druhu rodu *Plectranthus*.php

KUMARAN, A. a R. Joel KARUNAKARAN, 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry* [online]. **97**(1), 109-114 [cit. 2020-02-01]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.03.032. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605002827>

KUMARAN, A. a R. Joel KARUNAKARAN, 2007. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry* [online]. **100**(1), 356-361 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.09.051. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605008782>

KUMAR, Shashank a Abhay K. PANDEY, 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* [online]. **2013**, 1-16 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1155/2013/162750. ISSN 1537-744X. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/162750/>

KWEKA, Eliningaya J, Annadurai SENTHILKUMAR a Venugopalan VENKATESALU, 2012. Toxicity of essential oil from Indian borage on the larvae of the African malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Parasites & Vectors* [online]. **5**(1) [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.1186/1756-3305-5-277. ISSN 1756-3305. Dostupné z: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-277>

LEE, Kyung Hyun, Ji-Soo LEE, Eun Suh KIM a Hyeon Gyu LEE, 2019. Preparation, characterization, and food application of rosemary extract-loaded antimicrobial nanoparticle dispersions. *LWT* [online]. **101**, 138-144 [cit. 2020-01-28]. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.10.072. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643818309186>

LI, Donghao, Han Yeong KAW a Xiangzi JIN, 2020. Extraction of Plant Materials. *Liquid-Phase Extraction* [online]. Elsevier, 2020 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1016/B978-0-12-816911-

7.00022-0. ISBN 978-0-12-816911-7. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128169117000220>

LORD, H., E. CUDJOE, D. VUCKOVIC, et al., 2011. Biocompatible SPME Devices for Bioanalysis and in vivo Sampling. *Reporter* [online]. (Volume 29.2) [cit. 2020-02-15]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/bioanalysis-with-spme.html>

LORD, Heather a Janusz PAWLISZYN, 2000. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A* [online]. **885**(1-2), 153-193 [cit. 2020-02-15]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00535-5. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300005355>

MALLAVARAPU, Gopal R., Laxmi RAO a Srinivasaiyer RAMESH, 1999. Essential Oil of *Coleus aromaticus* Benth. from India. *Journal of Essential Oil Research* [online]. **11**(6), 742-744 [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.1080/10412905.1999.9712009. ISSN 1041-2905. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1999.9712009>

MANDAL, Santi M., Dipjyoti CHAKRABORTY a Satyahari DEY, 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior* [online]. **5**(4), 359-368 [cit. 2020-04-12]. DOI: 10.4161/psb.5.4.10871. ISSN 1559-2324. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/psb.5.4.10871>

MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ, 2006. *Kompendium statistického zpracování dat: metody a řešené úlohy*. Vyd. 2., přeprac. a rozš. Praha: Academia, 982 s. ISBN 80-200-1396-2.

MIRON, T.L., M. PLAZA, G. BAHRIM, E. IBÁÑEZ a M. HERRERO, 2011. Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Journal of Chromatography A* [online]. **1218**(30), 4918-4927 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.11.055. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967310016298>

MOHAMMAD AZMIN, Siti Nuurul Huda, Zainuddin ABDUL MANAN, Sharifah Rafidah WAN ALWI, Lee Suan CHUA, Azizul Azri MUSTAFFA a Nor Alafiza YUNUS, 2016. *Herbal Processing and Extraction Technologies: Current status and future directions* [online]. **45**(4), 305-320 [cit. 2020-01-19]. DOI: 10.1080/15422119.2016.1145395. ISSN 1542-2119. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15422119.2016.1145395>

MUHAMAD, Shamsul a Siti Fatimah Zahrah MAT ALI, 2019. Boiling increase antioxidant activity, total phenolic content and total flavonoid content in *Plectranthus amboinicus* leaves. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences* [online]. **6**(3), 024-030 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.30574/gscbps.2019.6.3.0023. ISSN 25813250. Dostupné z: <https://gsconlinepress.com/journals/gscbps/content/boiling-increase-antioxidant-activity-total-phenolic-content-and-total-flavonoid-content>

MURTHY, Pushpa S., K. RAMALAKSHMI a P. SRINIVAS, 2009. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. *Food Chemistry* [online]. **114**(3), 1014-1018 [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.10.064. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460801282X>

MUSTAFA, Arwa a Charlotta TURNER, 2011. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. **703**(1), 8-18 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1016/j.aca.2011.07.018. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267011009597>

MUT-SALUD, Nuria, Pablo Juan ÁLVAREZ, Jose Manuel GARRIDO, Esther CARRASCO, Antonia ARÁNEGA a Fernando RODRÍGUEZ-SERRANO, 2016. Antioxidant Intake and Antitumor Therapy: Toward Nutritional Recommendations for Optimal Results. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. **2016**, 1-19 [cit. 2020-01-29]. DOI: 10.1155/2016/6719534. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/6719534/>

NEGI, Pradeep Singh, 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **156**(1), 7-17 [cit. 2020-02-01]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160512001250>

NEUWINGER, Hans Dieter, 2000. *African traditional medicine: a dictionary of plant use and applications with supplement : search system for diseases*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers. ISBN 978-388-7630-867.

NORIEGA, Peko, Débora de Freitas MAFUD, Bruna de SOUZA, Marta SOARES-SCOTT, Diogo Pineda RIVELLI, Silvia Berlanga de Moraes BARROS a Elfriede Marianne BACCHI, 2012. Applying design of experiments (DOE) to flavonoid extraction from *Passiflora alata* and *P. edulis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online]. **22**(5), 1119-1129 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1590/S0102-695X2012005000036. ISSN 0102-695X. Dostupné z: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v22n5/aop02812.pdf>

NOVOTNÁ, Radka, Tomáš ŠILHA a Zdeněk TRÁVNIČEK, 2011. *Spektrální metody studia chemických látek* [online]. Olomouc: Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: [http://agch.upol.cz/userfiles/file/Spektralni\\_metody.pdf](http://agch.upol.cz/userfiles/file/Spektralni_metody.pdf)

OKOH, O.O., A.P. SADIMENKO a A.J. AFOLAYAN, 2010. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry* [online]. **120**(1), 308-312 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.09.084. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609011443>

PANDEY, Kanti Bhooshan a Syed Ibrahim RIZVI, 2009. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. **2**(5), 270-278 [cit. 2020-02-22]. DOI: 10.4161/oxim.2.5.9498. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2009/897484/>

PATEL, Roshan D., Naveen K. MAHOBIA, Manjul P. SINGH, Anita SINGH, Naheed W. SHEIKH, Gulzar ALAM a Sudarshan K. SINGH, 2010. Antioxidant Potential of Leaves of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. *Der Pharmacia Lettre* [online]. **2**(4), 240-245 [cit. 2020-02-08]. ISSN 0975-2071. Dostupné z:

<https://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/antioxidant-potential-of-leaves-of-plectranthus-amboinicus-lourspreng.pdf>

PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ, 2004. Módy stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy* [online]. (98), 174-179 [cit. 2020-02-09]. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004\\_04\\_03.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf)

PÓL, Jaroslav, Elena VARAĐOVÁ OSTRÁ, Pavel KARÁSEK, Michal ROTH, Karolínka BENEŠOVÁ, Pavla KOTLAŘÍKOVÁ a Josef ČÁSLAVSKÝ, 2007. Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **388**(8), 1847-1857 [cit. 2020-03-29]. DOI: 10.1007/s00216-007-1404-y. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-007-1404-y>

PRIOR, Ronald L., Xianli WU a Karen SCHAICH, 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **53**(10), 4290-4302 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1021/jf0502698. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0502698>

PROCHÁZKOVÁ, Dana, 2002. Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů. *Chemické listy*. (96), 827–852.

PRUDENT, D., F. PERINEAU, J. M. BESSIERE, G. M. MICHEL a J. C. BACCOU, 1995. Analysis of the Essential Oil of Wild Oregano from Martinique (*Coleus aromaticus* Benth.)—Evaluation of Its Bacteriostatic and Fungistatic Properties. *Journal of Essential Oil Research* [online]. **7**(2), 165-173 [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.1080/10412905.1995.9698492. ISSN 1041-2905. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1995.9698492>

PUTNIK, Predrag, Danijela BURSAĆ KOVAČEVIĆ, Damir JEŽEK, Ivana ŠUSTIĆ, Zoran ZORIĆ a Verica DRAGOVIĆ-UZELAC, 2018. High-pressure recovery of anthocyanins from grape skin pomace (*Vitis vinifera* cv. Teran) at moderate temperature. *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. **42**(1) [cit. 2020-01-21]. ISSN 01458892. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jfpp.13342>

RICE, L.J., G.J. BRITS, C.J. POTGIETER a J. VAN STADEN, 2011. Plectranthus: A plant for the future? *South African Journal of Botany* [online]. **77**(4), 947-959 [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.1016/j.sajb.2011.07.001. ISSN 02546299. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254629911001050>

ROJA, G., B. B. POL, A. S. SUBBARAMAN, G. J. CHINTALWAR a Susan EAPEN, 2006. Accumulation of Essential Oils in Tissue Cultures of *Coleus amboinicus*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* [online]. **11**(4), 1-7 [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.1300/J044v11n04\_01. ISSN 1049-6475. Dostupné z: [http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1300/J044v11n04\\_01](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1300/J044v11n04_01)

ROJAS-GRAÜ, Maria A., Roberto J. AVENA-BUSTILLOS, Carl OLSEN, Mendel FRIEDMAN, Philip R. HENIKA, Olga MARTÍN-BELLOSO, Zhongli PAN a Tara H. MCHUGH, 2007. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and



antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *Journal of Food Engineering* [online]. **81**(3), 634-641 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2007.01.007. ISSN 02608774. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877407000453>  
SANDOVAL-ACUÑA, Cristian, Jorge FERREIRA a Hernán SPEISKY, 2014. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **559**, 75-90 [cit. 2020-02-15]. DOI: 10.1016/j.abb.2014.05.017. ISSN 00039861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000398611400174X>

SÁNCHEZ-RANGEL, Juan Carlos, Jorge BENAVIDES, J. Basilio HEREDIA, Luis CISNEROS-ZEVALLOS a Daniel A. JACOBO-VELÁZQUEZ, 2013. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods* [online]. **5**(21), 5990-5999 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1039/c3ay41125g. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ay41125g>

SANTOS, Jânio Sousa, Carolina Turnes Pasini DEOLINDO, Luis Antônio ESMERINO, et al., 2016. Effects of time and extraction temperature on phenolic composition and functional properties of red rooibos (*Aspalathus linearis*). *Food Research International* [online]. **89**, 476-487 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.08.041. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996916303702>

SANTOYO, S., S. CAVERO, L. JAIME, E. IBAÑEZ, F. J. SEÑORÁNS a G. REGLERO, 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection* [online]. **68**(4), 790-795 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.4315/0362-028X-68.4.790. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-68.4.790>

SAULIS, Gintautas, 2010. Electroporation of Cell Membranes: The Fundamental Effects of Pulsed Electric Fields in Food Processing. *Food Engineering Reviews* [online]. **2**(2), 52-73 [cit. 2020-01-23]. DOI: 10.1007/s12393-010-9023-3. ISSN 1866-7910. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12393-010-9023-3>

SAWAMURA, Masayoshi, Yuji ONISHI, Junko IKEMOTO, Nguyen Thi Minh TU a Nguyen Thi Lan PHI, 2006. Characteristic odour components of bergamot (*Citrus bergamia* Risso) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. **21**(4), 609-615 [cit. 2020-04-29]. DOI: 10.1002/ffj.1604. ISSN 0882-5734. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1604>

SENTHILKUMAR, Annadurai a Venugopalan VENKATESALU, 2010. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Anopheles stephensi*: a malarial vector mosquito. *Parasitology Research* [online]. **107**(5), 1275-1278 [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.1007/s00436-010-1996-6. ISSN 0932-0113. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-010-1996-6>

SEYDIM, A.C. a G. SARIKUS, 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International* [online]. **39**(5), 639-644 [cit. 2020-01-28]. DOI: 10.1016/j.foodres.2006.01.013. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996906000159>

SHARIFI-RAD, Mehdi, Elena Maria VARONI, Marcello IRITI, et al., 2018. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research* [online]. **32**(9), 1675-1687 [cit. 2020-01-28]. DOI: 10.1002/ptr.6103. ISSN 0951418X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.6103>

SILVESTRE, W.P., N.F. LIVINALLI, C. BALDASSO a I.C. TESSARO, 2019. Pervaporation in the separation of essential oil components: A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **93**, 42-52 [cit. 2020-04-16]. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.09.003. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224419304212>

SINGH, Gurdip, Om Prakash SINGH, Y. R. PRASAD, M. P. DE LAMPASONA a C. CATALAN, 2002. Studies on essential oils, Part 33: chemical and insecticidal investigations on leaf oil of *Coleus amboinicus* Lour. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. **17**(6), 440-442 [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.1002/ffj.1123. ISSN 0882-5734. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1123>

SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH, 2019. *Analytická chemie*. Preložil Karel NESMĚRÁK, preložil Václav ČERVENÝ, preložil Tomáš KRÍŽEK, preložil Eliška NOVÁKOVÁ. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7592-043-0.

STRATIL, Pavel a Vlastimil KUBÁŇ, 2018. *Reaktivní kyslíkové radikály, přírodní antioxidanty a jejich zdravotní účinky*. Český Těšín: 2 THETA. ISBN 978-80-86380-91-9.

SULAIMAN, C.T., M. DEEPAK a Indira BALACHANDRAN, 2018. Spectrophotometric and tandem mass spectroscopic analysis of Indian borage (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) for its polyphenolics characterization. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* [online]. **7**(4), 471-473 [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.1016/j.bjbas.2018.04.004. ISSN 23148535. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S231485351730402X>

SWAMY, Mallappa Kumara, Greetha ARUMUGAM, Ravinder KAUR, Ali GHASEMZADEH, Mazina Mohd. YUSOFF a Uma Rani SINNIAN, 2017. GC-MS Based Metabolite Profiling, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Different Solvent Extracts of Malaysian *Plectranthus amboinicus* Leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. **2017**, 1-10 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.1155/2017/1517683. ISSN 1741-427X. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2017/1517683/>

TEIXEIRA, A.M.R., I.K.C. LIMA, M.R. XAVIER, et al., 2018. Vibrational spectroscopy study of essential oils from *Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng and *Vanillosmopsis arborea* Baker. *Vibrational Spectroscopy* [online]. **2018**(Volume 98), 22-29 [cit. 2019-11-23]. ISSN 0924-2031. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.05.008>

TEWARI, G., C. PANDE, G. KHARKWAL, S. SINGH a C. SINGH, 2012. Phytochemical study of essential oil from the aerial parts of *Coleus aromaticus* Benth. *Natural Product Research* [online]. **26**(2), 182-185 [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.1080/14786419.2011.574135. ISSN 1478-6419. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2011.574135>

TIWARI, Brijesh K., 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. **71**, 100-109 [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.1016/j.trac.2015.04.013. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016599361500148X>

TOHIDI, Behnaz, Mehdi RAHIMMALEK a Helena TRINDADE, 2019. Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of Thymus species in Iran. *Industrial Crops and Products* [online]. **134**, 89-99 [cit. 2020-02-01]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.02.038. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669019301360>

TONGNUANCHAN, Phakawat a Soottawat BENJAKUL, 2014. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science* [online]. **79**(7), R1231-R1249 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1111/1750-3841.12492. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.12492>

TRANCHIDA, Peter Q, 2020. *Advanced Gas Chromatography in Food Analysis* [online]. Food Chemistry, Function and Analysis No 17. United Kingdom: The Royal Society of Chemistry [cit. 2020-02-15]. ISBN 978-1-78801-575-2. Dostupné z: <https://books.google.sk/books?id=cB-7DwAAQBAJ&pg=PA434&dq=spme%20gcms&hl=sk&sa=X&ved=0ahUKEwjuz-nD3M7nAhUgysQBHXmOCIEQ6AEIVDAE&fbclid=IwAR27ZCFKOY a19Uwh0tnOngySzfF1ZM24QpYKivUFdx4gHAtPfGsm05VWo8w#v=onepage&q&f=true>

VAJIĆ, Una-Jovana, Jelica GRUJIĆ-MILANOVIĆ, Jelena ŽIVKOVIĆ, Katarina ŠAVIKIN, Dejan GOĐEVAC, Zoran MILORADOVIĆ, Branko BUGARSKI a Nevena MIHAILOVIĆ-STANOJEVIĆ, 2015. Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. *Industrial Crops and Products* [online]. **74**, 912-917 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.06.032. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015301977>

VASCONCELOS, Sara Edwrigens Costa Benício, Hider Machado MELO, Theodora Thays Arruda CAVALCANTE, Francisco Eduardo Aragão Catunda JÚNIOR, Mário Geraldo DE CARVALHO, Francisca Gleire Rodrigues MENEZES, Oscarina Viana DE SOUSA a Renata Albuquerque COSTA, 2017. Plectranthus amboinicus essential oil and carvacrol bioactive against planktonic and biofilm of oxacillin- and vancomycin-resistant Staphylococcus aureus. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [online]. **17**(1) [cit. 2020-02-01]. DOI: 10.1186/s12906-017-1968-9. ISSN 1472-6882. Dostupné z: <http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-017-1968-9>

VELASCO, Judith, Luis B. ROJAS, Tulia DÍAZ a Alfredo USUBILLAGA, 2009. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of Coleus amboinicus Lour., Against Enteric Pathogens. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* [online]. **12**(4), 453-461 [cit. 2020-04-04]. DOI: 10.1080/0972060X.2009.10643744. ISSN 0972-060X. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2009.10643744>

VELDHUIZEN, Edwin J. A., Johanna L. M. TJEERDSMA-VAN BOKHOVEN, Cindy ZWEIJTZER, Sara A. BURT a Henk P. HAAGSMAN, 2006. Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **54**(5),

1874-1879 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.1021/jf052564y. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf052564y>

WANG, Lijun a Curtis L. WELLER, 2006. *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants* [online]. **17**(6), 300-312 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.12.004. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224405003559>

WANG, Yan a S.J. KAYS, 2000. Contribution of Volatile Compounds to the Characteristic Aroma of Baked `Jewel' Sweetpotatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* [online]. **125**(5), 638-643 [cit. 2020-04-29]. DOI: 10.21273/JASHS.125.5.638. ISSN 0003-1062. Dostupné z: <https://journals.ashs.org/view/journals/jashs/125/5/article-p638.xml>

WOJDYLO, A, J OSZMIANSKI a R CZEMERYYS, 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* [online]. **105**(3), 940-949 [cit. 2020-01-29]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.04.038. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607003974>

WOUTERS, Patrick C, Ignacio ALVAREZ a Javier RASO, 2001. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **12**(3-4), 112-121 [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.1016/S0924-2244(01)00067-X. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422440100067X>

YANG, Yu, Berkant KAYAN, Neval BOZER, Bryan PATE, Christopher BAKER a Ahmet M. GIZIR, 2007. Terpene degradation and extraction from basil and oregano leaves using subcritical water. *Journal of Chromatography A* [online]. **1152**(1-2), 262-267 [cit. 2020-04-29]. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.11.037. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967306021637>

ZÁRUBA, Kamil a , 2016. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7080-951-8.

ZHANG, Qing-Wen, Li-Gen LIN a Wen-Cai YE, 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* [online]. **13**(1) [cit. 2020-01-19]. DOI: 10.1186/s13020-018-0177-x. ISSN 1749-8546. Dostupné z: <https://cmjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13020-018-0177-x>

*Coleus amboinicus* Lour., 2020. *Plants of the World Online*. [online]. the Royal Botanic Gardens, Kew [cit. 2020-02-23]. Dostupné z: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:445902-1>

*Nariadenie komisie (EÚ) č. 231/2012 z 9. marca 2012, ktorým sa ustanovujú špecifikácie prídavných látok uvedených v prílohách II a III k nariadeniu Európskeho parlamentu a rady (ES) č. 1333/2018,*

*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.: Taxonomic Serial No.: 504444, 2020. *Integrated Taxonomic Information System (ITIS)* [online]. [cit. 2020-02-23]. Dostupné z: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:445902-1>

Plectranthus L'Hér., 2020. *Plants of the World Online* [online]. the Royal Botanic Gardens, Kew [cit. 2020-02-23]. Dostupné z: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:328178-2#sources>

SMERNICA KOMISIE 2010/67/EÚ z 20. októbra 2010, ktorou sa mení a dopĺňa smernica 2008/84/ES ustanovujúca osobitné kritériá čistoty potravinárskych prídavných látok iných ako farbivá a sladidlá

Volatile constituents and antioxidant property of essential oil from *Plectranthus amboinicus* (Lour.), 2012. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* [online]. 3(4), 445 - 458 [cit. 2020-04-05]. ISSN 0975-6299. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.450.294&rep=rep1&type=pdf>

## 7 POUŽITÉ SKRATKY

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropán)dihydrochlorid
ABTS	2,2'-azinobis(3-etylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina
ANOVA	Analýza rozptylu (Analysis of Variance)
ASE	Vysokotlaká extrakcia rozpúšťadlom (Accelerated Solvent Extraction)
ATP	Adenosintrifosfát
BAC	Bioaktívne aromatické látky (Biologically Active Compounds)
BHA	Butylhydroxyanizol
BHT	Butylhydroxytoluén
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOE	Plánovaný experiment (Design of Experiments)
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
EDTA	Etlén-diamín-tetraoctová kyselina
F-C	Folin-Ciocalteu
F-D	Folin-Denis
Fe <sup>2+</sup> -TPTZ	Fe <sup>2+</sup> -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazín)
Fe <sup>3+</sup> -TPTZ	Fe <sup>3+</sup> -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazín)
FRAP	Antioxidačný potenciál redukcie železnatých katiónov (Ferric reducing antioxidant potential)
GAE	Ekvivalent kyseliny gallovej (Gallic Acid Equivalent)
GC-MS	Plynová chromatografia/hmotnostná spektrometria (Gas chromatography/Mass spectrometry)
GPx	Glutatión peroxidáza (Glutathione Peroxidase)
GRAS	Všeobecne považované za bezpečné (Generally Recognised As Safe)
HPAE	Vysokotlaká extrakcia (High Pressure Accelerated Extraction)
HS	Priestor nad vzorkou (Head Space)
IT	Iónová past (Ion Trap)
MAE	Mikrovlnná extrakcia (Microwave Assisted Extraction)
MIC	Minimálna inhibičná koncentrácia (Minimal Inhibitory Concentration)
MLC	Minimálna letálna koncentrácia (Minimal Lethal Concentration)
ORAC	Kapacita absorpcie kyslíkových radikálov (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
PEF	Extrakcia využívajúca pulzné elektrické pole (Pulsed Electric Field Assisted Extraction)
PFE	Vysokotlaká extrakcia, (Pressurised Fluid Extraction)
PHWE	Extrakcia stlačenou kvapalnou horúcou vodou (Pressurised Hot Water Extraction)
PSE	Vysokotlaká extrakcia rozpúšťadlom (Pressurised Solvent Extraction)
Q	Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole)
RNS	Reaktívne dusíkové formy (Reactive Nitrogen Species)
ROS	Reaktívne kyslíkové formy (Reactive Oxygen Species)
RSS	Reaktívne sírne formy (Reactive Sulfur Species)
SFE	Superkritická fluidná extrakcia (Supercritical Fluid Extraction)
SOD	Superoxid dismutáza (Superoxide Dismutase)
SPME	Mikroextrakcia tuhou fázou (Solid Phase Micro Extraction)
TBHQ	Terciálny butylhydrochinón
TBHQ	Terciálny butylhydrochinón
TEAC	Ekvivalent antioxidačnej kapacity Troloxu (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
TRAP	Celkový potenciál zhasania radikálov (Total Radical-Trapping Potential)
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina

TOF	Analyzátor doby letu (Time Of Flight)
UAE	Ultrazvuková extrakcia (Ultrasound Assisted Extraxtion)
UV	Ultrafialové (Ultraviolet)
VIS	Viditeľné (Visible)

## 8 ZOZNAM PRÍLOH

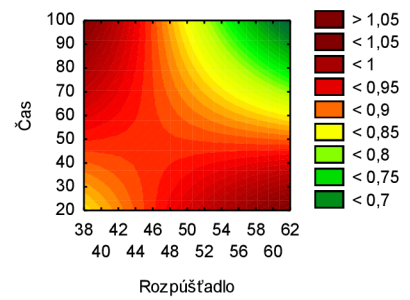
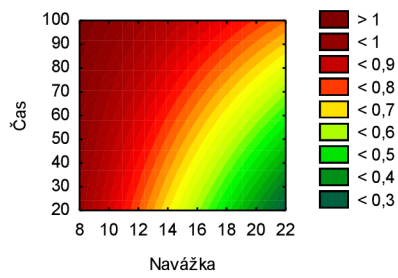
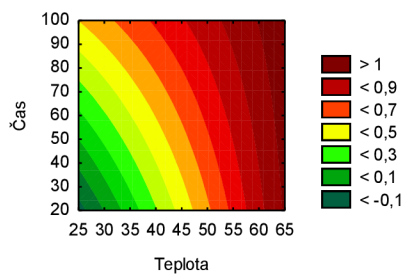
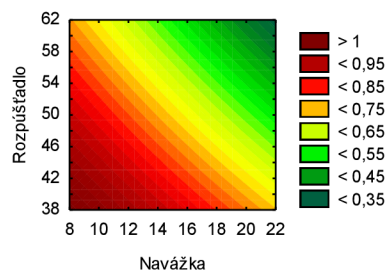
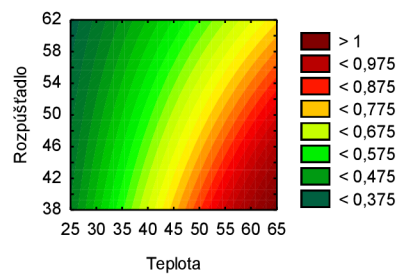
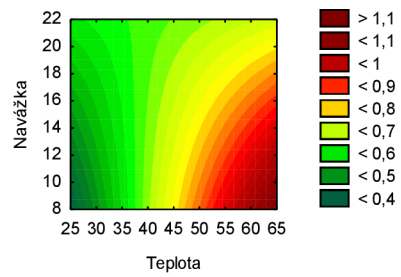
*Príloha 1: Grafická modelácia interakcií faktorov*

*Príloha 2: Ukážka chromatogramu prchavých látok rýmovníku (*Plectranthus amboinicus*);  
identifikácia zlúčenín vid' Tabuľka 15.*



## 9 PRÍLOHY

Príloha 1: Grafická modelácia interakcií faktorov.



Príloha 2: Ukážka chromatogramu prchavých látok rýmovníku (*Plectranthus amboinicus*); identifikácia zložení vid' Tabuľka 15.

C:\Vitova\...rymovnik\_bylina01

11/19/19 12:37:48

RT: 0.00 - 59.11

