

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Sledování biologicky aktivních látek ve vybraných druzích
rodu *Origanum***

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Kateřina Ešlerová

Vedoucí práce: doc. Ing. Lenka Kouřimská

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Sledování biologicky aktivních látek ve vybraných druzích rodu *Origanum*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Lence Kouřimské, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a podnětné připomínky. Dále bych chtěla poděkovat paní Blance Dvořákové a Ing. Lence Zárubové za cenné rady a pomoc při analýze bylin v laboratoři.

Můj dík dále patří rodině, která mi byla oporou v průběhu celého studia.

Sledování biologicky aktivních látek ve vybraných druzích rodu *Origanum*

Souhrn

Předložená diplomová práce se zabývá antioxidantní aktivitou, obsahem celkových fenolů, výtěžností a složením silice a obsahem vitamínu C u čerstvých, sušených a mražených bylin rodu *Origanum* dobromysli obecné (*Origanum vulgare* L.) a řeckého oregana (*Origanum heracleoticum* L.).

Hlavní vědeckou hypotézou práce bylo: antioxidantní aktivita a složení silic vybraných bylin rodu *Origanum* a jejich extraktů jsou ovlivněny způsobem posklizňové úpravy bylin. Dílčí hypotéza bylo, že antioxidantní aktivita sušených bylin je vyšší než antioxidantní aktivita bylin čerstvých a mražených.

V teoretické části byly shrnuty aktuální poznatky týkající se především antioxidantní aktivity zkoumaných bylin rodu *Origanum* a faktorů ovlivňujících tuto aktivitu.

Experimentální část zahrnovala určení antioxidantní aktivity čerstvých, sušených a mražených bylin dobromysli obecné a řeckého oregana pomocí metody DPPH, stanovení obsahu celkových fenolů prostřednictvím Folin-Ciocalteuova činidla a stanovení obsahu vitamínu C. Sledována byla také výtěžnost silic a jejich složení. Kvalitativní analýza silic byla provedena metodou GC/MS.

U všech testovaných vzorků byla zjištěna významná antioxidantní aktivita prostřednictvím metody DPPH. Statisticky významný rozdíl byl určen pouze u hodnot přepočtených na 100 g byliny, kdy sušené byliny vykazovaly výrazně vyšší antioxidantní aktivitu oproti bylinám čerstvým a mraženým. Obsah celkových fenolů byl statisticky významně vyšší u sušených bylin v porovnání s mraženými bylinami, avšak pouze u hodnot přepočtených na 100 g byliny. Silná korelace mezi hodnotami DPPH a obsahem celkových fenolů byla nalezena u hodnot na 100 g bylin. Působením posklizňových úprav dochází ke změně složení silic sledovaných bylin. U žádného ze vzorků nebyl vitamin C zastoupen ve významném množství (do 8 mg/100 g byliny).

Hlavní i dílčí hypotéza byly částečně potvrzeny.

Klíčová slova: Lamiaceae, DPPH metoda, obsah fenolů, vitamin C, silice

Determination of biologically active compounds in selected herbs of the genus *Origanum*

Summary

This thesis is focused on the antioxidant activity, the content of total phenolic compounds, the essential oil content, the essential oil profile and the vitamin C content of fresh, dried and frozen herbs of the genus *Origanum* namely oregano (*Origanum vulgare* L.) and Greek oregano (*Origanum heracleoticum* L.).

The main scientific hypothesis of the thesis was: the antioxidant activity and composition of essential oils of selected herbs of the genus *Origanum* and their extracts are influenced by postharvest treatment. The sub-hypothesis proposes higher antioxidant activity of dried herbs in comparison with fresh and frozen herbs.

Literature review summarizes current research findings on the antioxidant activity and factors affecting this activity of tested herbs of the genus *Origanum*.

The experimental part assesses the antioxidant activity determined by the DPPH method, the content of total phenolic compounds measured by using Folin-Ciocalteu reagent and the vitamin C content of fresh, dried and frozen herbs of the genus *Origanum*. Yield and composition of essential oils were also investigated. Qualitative and quantitative analysis of essential oils was performed by GC/MS.

All tested samples exhibited significant antioxidant activity determined by the DPPH method. A statistically significant difference was found for the values expressed per 100 g of herbs, dried herbs showed significantly higher antioxidant activity compared to fresh and frozen herbs. The content of total phenolic compounds was significantly higher in dried herbs in comparison with frozen herbs for the values expressed per 100 g of herbs. Strong correlation between DPPH method and the content of total phenolic compounds was found in the values for 100 g of herbs. Postharvest treatment affected composition of essential oils of tested herbs. Vitamin C content was low in all tested samples (did not exceed 8 mg/100 g herbs).

Both the main and sub-hypothesis were partially confirmed.

Keywords: Lamiaceae, DPPH method, phenolic contents, vitamin C, essential oil

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Cíl práce	9
3 Přehled literatury	10
3.1 Byliny rodu <i>Origanum</i>	10
3.1.1 Dobromysl obecná (<i>Origanum vulgare L.</i>).....	10
3.1.2 Řecké oregano (<i>Origanum heracleoticum L.</i>).....	10
3.2 Biologicky aktivní látky	10
3.2.1 Biologicky aktivní látky dobromysli obecné	10
3.2.2 Biologicky aktivní látky řeckého oregana	13
3.3 Faktory ovlivňující antioxidační aktivitu bylin.....	15
3.3.1 Podmínky pěstování.....	16
3.3.2 Doba sklizně	17
3.3.3 Způsob posklizňové úpravy	18
3.3.3.1 Sušení	18
3.3.3.2 Mražení.....	22
3.3.4 Způsob extrakce	23
4 Experimentální část	25
4.1 Materiál.....	25
4.1.1 Byliny a jejich pěstování.....	25
4.1.2 Chemikálie	25
4.1.3 Standardy antioxidantů	25
4.1.4 Přístroje.....	25
4.2 Metody.....	26
4.2.1 Stanovení celkové sušiny.....	26
4.2.2 Příprava extraktů.....	26
4.2.3 Stanovení antioxidační aktivity	27
4.2.3.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH.....	27
4.2.3.2 Stanovení celkového obsahu fenolů	28
4.2.4 Získání a analýza silice	29
4.2.4.1 Hydrodestilace	29
4.2.4.2 Plynová chromatografie.....	30
4.2.5 Stanovení vitamínu C.....	30
4.2.6 Statistické zhodnocení	30
5 Výsledky.....	31

5.1	Sušina bylin.....	31
5.2	Antioxidační aktivita DPPH.....	31
5.3	Celkový obsah fenolů	32
5.4	Silice.....	33
5.4.1	Výtěžnost silic.....	33
5.4.2	Analýza silic	33
5.5	Vitamin C.....	36
5.6	Statistické zhodnocení.....	36
6	Diskuze	38
7	Závěr.....	41
8	Seznam literatury	42
9	Seznam použitých zkratk.....	49
10	Přílohy	50

1 Úvod

Byliny rodu *Origanum* jsou známy pro svou antioxidační aktivitu, která je přisuzována sekundárním metabolitům, především obsahu fenolických látek. Nejen vzhledem k tomuto faktu jsou tyto byliny využívány v řadě oborů.

Již od nepaměti jsou byliny součástí lidové medicíny, kdy byl na základě empirických zkušeností odvozen terapeutický efekt a jejich léčivých účinků je dodnes využíváno i v rámci farmaceutického průmyslu. Díky obsahu aromatických a chuťových látek se byliny staly běžně užívaným ochucovadlem pokrmů, které však tedy vykazuje i již zmíněný pozitivní efekt v podobě antioxidačního účinku. Tohoto účinku je uplatňováno v oblasti potravinářského průmyslu, kdy prostřednictvím zpomalení procesu oxidace dochází k prodloužení udržitelnosti potravin. I když je v potravinářství v poslední době na vzestupu používání přírodně identických antioxidantů, přírodní antioxidanty mají stále velmi významné zastoupení.

Pro zachování kvality bylin při jejich skladování je vhodné dbát na vhodnou posklizňovou úpravu. Nejčastěji uplatňovanou metodou je sušení. V průběhu sušení dochází k řadě mechanismů, které ovlivňují obsah celkových fenolů, a mělo by docházet ke zvýšení antioxidační aktivity oproti bylinám čerstvým. Další možnou posklizňovou úpravou je mražení. Tato metoda je méně užívaná, avšak z hlediska zachování kvality bylin je také vhodnou technikou.

Sledování antioxidační aktivity sušených bylin bylo předmětem zkoumání řady studií. Naproti tomu testování vlivu mražení na antioxidační aktivitu bylin je poměrně opomíjené.

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo v teoretické části vypracování literární rešerše orientované na antioxidační aktivitu čerstvých, sušených a mražených bylin rodu *Origanum*, konkrétně dobromysli obecné (*Origanum vulgare* L.) a řeckého oregana (*Origanum heracleoticum* L.).

Experimentální část byla zaměřena na stanovení a porovnání antioxidační aktivity, obsahu celkových fenolů a obsahu vitamínu C čerstvých, sušených a mražených bylin. Zkoumán byl také kvantitativní a kvalitativní obsah silic testovaných bylin.

Hlavní vědecká hypotéza byla formulována následovně: antioxidační aktivita a složení silic vybraných bylin rodu *Origanum* a jejich extraktů jsou ovlivněny způsobem posklizňové úpravy bylin. Dílčí hypotézou je, že antioxidační aktivita sušených bylin je vyšší než antioxidační aktivita bylin čerstvých a mražených.

3 Přehled literatury

3.1 Byliny rodu *Origanum*

Rod *Origanum* je rod čeledi *Lamiaceae* a byliny tohoto rodu se vyskytují především v oblasti Středomoří a Asie. Tento rod je bohatý na obsah esenciálních olejů, přičemž je zde značná variabilita v jejich množství a kvalitě (Asensio et al., 2015). V hojném množství byliny rodu *Origanum* obsahují také fenoly, lipidy, mastné kyseliny, flavonoidy a anthokyany (Kintzios, 2002).

3.1.1 Dobromysl obecná (*Origanum vulgare* L.)

Dobromysl obecná je vytrvalá rostlina z čeledi *Lamiaceae*, vyskytující se v oblasti Asie, Evropy a severní Afriky. V tradiční medicíně byla tato bylina používána při respiračních onemocněních, onemocněních trávicího traktu a močových cest a také pro léčbu drobných kožních poranění (Kintzios, 2002). Tato aromatická bylina je hojně využívána v mnoha světových kuchyních (Teixeira, 2013). Účinek dobromysli obecné na uchování potravin byl zkoumán v několika studiích (Carmo, 2008; Chorianopoulos, 2004; Chouliara, 2007). Antioxidační aktivita dobromysli obecné byla předmětem zkoumání mnoha studií (Sahin et al., 2004; Capecka et al., 2004; Ličina et al., 2013).

3.1.2 Řecké oregano (*Origanum heracleoticum* L.)

Řecké oregano je vytrvalou bylinou pocházející z oblasti Středomoří, patřící do čeledi *Lamiaceae*. Široké uplatnění nachází v oblasti gastronomie jako koření, přičemž typické aroma je dáno přítomností silice, jak uvádí Stamenic et al. (2014). U této aromatické byliny byl zkoumán účinek antimikrobiální (De Martino et al., 2009; Govaris et al., 2010; Stamenic et al., 2014), antifungální (Adam et al., 1998) a antioxidační (Kulisic et al., 2004; Zheng et al., 2009).

3.2 Biologicky aktivní látky

3.2.1 Biologicky aktivní látky dobromysli obecné

Dobromysl obecná obsahuje širokou škálu látek, jako jsou fenoly, fenolické kyseliny, flavonoidy, estery a jejich glykosidy, steroidy a těkavé sloučeniny. Dle Crocoll et al. (2010) dominují v esenciálním oleji této byliny monoterpeny a seskviterpeny. Tyto terpeny vykazují značnou antioxidační aktivitu (Kintzios et al., 2002; Graßmann, 2005). V esenciálním oleji

byly nalezeny dvě látky s antifungálním účinkem, a to thymol a karvakrol. (Rao et al, 2011). Tyto fenolické monoterpeny jsou však známy především pro svůj antioxidační účinek, jak uvádí Beena et al. (2013). Antioxidační aktivitu vykazují také další fenolické látky. V dobromysli obecné sbírané v Japonsku byly nalezeny tyto sloučeniny: derivát kyseliny rozmarýnové, kávová kyselina, protokatechová kyselina, fenyl glukosid a 2-kafeyloxy-3-[2-(4-hydroxybenzyl)-4,5-dihydroxy]-fenyl propionová kyselina (Rao et al, 2011).

Derwich et al. (2010) analyzovali složky esenciálního oleje dobromysli obecné pěstované v Maroku. Prostřednictvím metody GC/MS byly hlavními složkami esenciálního oleje určeny karvakrol (18,06 %), thymol (7,36 %), γ -terpinen (5,25 %), p-cymen (5,02 %), limonen (4,68 %), karyofylen (4,12 %), cymen (3,56 %). Výtěžnost esenciálního oleje byla 1,15 %. Sledována byla také antibakteriální aktivita, kdy silná aktivita byla nalezena proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Basillus subtilis*, *Listeria monocytogene*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni* a *Vibrio cholerae*.

Chemickým složením esenciálního oleje dobromysli obecné se zabývali Mockutě et al. (2004). Byliny vypěstované v oblasti východní Litvy byly analyzovány pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Hlavními složkami esenciálního oleje z květenství byly sabinen (8,7 - 19,5 %), β -karyofylen (15,4 - 24,9 %) a germacren D (12,3 - 16,0 %) a u vzorků z listů to byly β -karyofylen (15,9 - 21,3 %), germacren D (12,1 - 15,7 %) a karyofylen oxid (4,7 - 11,1 %). Množství fenolů thymolu a karvakrolu se pohybovalo v rozmezí 0 - 3,9 %.

Sahin et. al (2004) se ve své práci zajímali o biologickou aktivitu esenciálního oleje dobromysli obecné vypěstované na území Turecka. Složení esenciálního oleje bylo určeno metodou GC/MS, kdy bylo identifikováno 62 složek, z nichž byly nejvíce zastoupeny karyofylen, spathulenol, germacren D a α -terpineol. Folin-Ciocalteovou metodou bylo stanoveno celkové množství fenolů extraktu ze sušené byliny na 220 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Pro vyhodnocení antioxidační aktivity byla použita metoda DPPH. Významná antioxidační aktivita byla zjištěna u metanolového extraktu na rozdíl od aktivity esenciálního oleje, což autoři studie vysvětlují nízkým obsahem karvakrolu a thymolu.

Biologickou aktivitu divoce rostoucí dobromysli obecné zkoumali Ličina et al. (2013). V této práci sledovali celkový obsah fenolů, flavonoidů, tříslovin, složení silice a také antioxidační a antimikrobiální aktivitu. Hlavními složkami silice byly sabinen, terpinen-4-ol, 1,8 cineol, γ -terpinen a karyofylen oxid. Množství celkových fenolů bylo určeno pomocí Folin-Ciocalteovy metody v rozmezí 84,5-235 mg GAE/g extraktu. Metodou DPPH byla

prokázána významná antioxidační aktivita, přičemž nejvyšší antioxidační aktivita byla nalezena u etanolového extraktu s hodnotou IC_{50} 34.5 $\mu\text{g/ml}$. Dalším výsledkem práce bylo zjištění silné antibakteriální aktivity proti grampozitivním bakteriím rodu *Bacillus* a *Staphylococcus aureus*.

Chrpová et al. (2010) ve své práci studovali antioxidační aktivitu a celkový obsah fenolů ve vybraných bylinách. Obsah celkových fenolů dobromysli obecné měřený metodou Folin-Ciocalteu byl stanoven na 91,4 mg GAE/g sušené byliny. Metodou DPPH byla u dobromysli obecné zjištěna velmi silná antioxidační aktivita s hodnotou 209,1 mg AAE/g sušené byliny. Naměřená aktivita je dle autorů studie srovnatelná s antioxidační aktivitou zeleného čaje. Výsledky práce prokázaly významnou korelaci mezi antioxidační aktivitou a obsahem celkových fenolů.

Práce Wojdylo et al. (2007) se zabývala antioxidační aktivitou a obsahem fenolů ve 32 vybraných bylinách, kdy jednou ze zkoumaných bylin byla dobromysl obecná. Obsah celkových fenolů byl určen pomocí metody Folin-Ciocalteu, kdy u dobromysli obecné bylo naměřeno 0,15 mg GAE/100 g sušiny. Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí metod ABTS, DPPH, FRAP. Metodou DPPH byla u dobromysli obecné zjištěna hodnota 79,6 μM Trolox/100 g sušiny. Autoři uvádí, že antioxidační aktivita této byliny je dána obsahem fenolických kyselin, především kávové kyseliny a p-kumarové kyseliny. V této studii byla nalezena významná korelace mezi obsahem celkových fenolů a antioxidační aktivitou u bylin z čeledí *Lamiaceae* a *Compositae*.

Stanovení antioxidační aktivity a obsahu fenolů u vybraných léčivých rostlin, používaných v Bulharsku, bylo cílem práce Ivanova et al. (2005). Příprava extraktů bylin se shodovala s tradiční přípravou bylinných čajů. Folin-Ciocalteovou metodou byl vypočítán obsah celkových fenolů extraktu dobromysli obecné na 1653,61 μM QE. Antioxidační aktivita extraktu dobromysli obecné byla určena metodou ABTS na hodnotu TEAC 5,87 mM. Dobromysl obecná tedy dle výsledků vykazovala velmi vysoký obsah celkových fenolů a vysokou antioxidační aktivitu. Mezi těmito zkoumanými parametry byla zjištěna vzájemná souvislost.

Capecka et al. (2004) zkoumali kromě antioxidační aktivity, celkového obsahu fenolů čerstvých a sušených bylin čeledi *Lamiaceae* také obsah L-askorbové kyseliny a karotenoidů. V čerstvé dobromysli obecné byl obsah L-askorbové kyseliny 23,1 mg/100 g čerstvé byliny. Procesem sušení došlo k významnému poklesu množství této kyseliny, a to na hodnotu 4,2 mg/100 g čerstvé byliny.

Stanovení obsahu askorbové kyseliny (vitaminu C) bylo součástí práce Baranauskienė et al. (2013). Množství vitaminu C bylo sledováno u dobromysli obecné a řeckého oregana v závislosti na vegetačním stádiu bylin. Po sklizení byly byliny usušeny v sušičce za teploty 40 °C. Titrační metodou byla u dobromysli obecné naměřena nejvyšší hodnota vitaminu C (14,0 mg/100 g čerstvé byliny) u sklizně z období plného květenství byliny. Nejnižší koncentrace (4,6 mg/100 g čerstvé byliny) byla nalezena u bylin sklizených na počátku vegetačního období. Bylo zjištěno, že obsah vitaminu C v dobromysli obecné je ve všech sledovaných stádiích vyšší než v řeckém oreganu.

3.2.2 Biologicky aktivní látky řeckého oregana

Řecké oregano obsahuje jak produkty primárního metabolismu zastoupené především bílkovinami, sacharidy, tuky, organickými kyselinami, tak i sekundární metabolity. Charles (2013) uvádí, že ze sekundárních metabolitů jsou v této bylině obsaženy třísloviny, pryskyřice, flavonoidy, hořčiny, steroly, fenoly a silice. Kikuzaki et al. (1989) našli v řeckém oreganu řadu fenolických látek s antioxidačním účinkem: derivát kyseliny rozmarýnové, kávová kyselina, protocatechová kyselina, fenyl glukosid. Řecké oregano obsahuje dle Koukoulitsa et al. (2006) polární sloučeniny jako apigenin, luteolin, chrysoeriol, diosmetin, quercetin, eriodictyol, cosmocidin, vicenin-2, kávová kyselina, rozmarýnová kyselina, aj. Chen a Ho (1997) uvádí, že kromě rozmarýnové kyseliny vykazují vysokou schopnost zhaset DPPH radikál také fenolické kyseliny (kávová kyselina, chlorogenová kyselina, ferulová kyselina).

Milos et al. (2000) se ve své práci zaměřili na obsah a složení glykosidicky vázaných těkavých látek v řeckém oreganu a na jejich antioxidační aktivitu. V sušených listech a květech stanovili obsah těchto látek na 20 mg/kg. Bylo identifikováno čtrnáct těkavých aglykonů, z nichž hlavními byly tymochinon, benzylalkohol, eugenol, 2-fenyl-ethanol, thymol, 3-hexen-1-ol a karvakrol. U všech aglykonů byla nalezena antioxidační aktivita. Ta byla porovnána s antioxidační aktivitou esenciálního oleje řeckého oregana, čistým thymolem, tymochinonem a α -tokoferolem. Aglykony a esenciální olej ukázaly téměř shodnou antioxidační aktivitu, která převyšovala aktivitu přirozeného antioxidantu α -tokoferolu. Thymol a tymochinon vykazovaly nižší aktivitu, a to i ve srovnání s α -tokoferolem. Díky těmto výsledkům autoři zmiňují možné využití glykosidových extraktů v potravinách jako přirozených antioxidantů.

Esenciální oleje, jakožto ochranné látky rostlin, vykazují rozličné biologické účinky. Známé jsou účinky antibakteriální, fungicidní, insekticidní a antioxidační. Zhodnotit

antibakteriální aktivitu a chemické složení esenciálních olejů vybraných rostlin rodu *Origanum* bylo cílem práce Stefanakis et al. (2013). Esenciální oleje byly získány parní destilací a složení bylo analyzováno metodou GC/MS. Hlavními složkami silice řeckého oregana byly karvakrol, thymol, γ -terpinen a p-cymen. Silná antibakteriální aktivita esenciálního oleje řeckého oregana byla prokázána proti bakteriím *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Listonella anguillarum* a bakteriím rodu *Vibrio*.

Dle Zheng et al. (2009) je esenciální olej řeckého oregana ze 78,28 % tvořen fenolickými látkami karvakrolem a thymolem, dále je obsažen γ -terpinen (5,54 %) a p-cymen (7,35 %). V této studii byl zkoumán antioxidační účinek karvakrolu a thymolu a vliv těchto látek na růst sumců. Sumcům bylo po osm týdnů podáváno krmivo: bez obohacení, s přídavkem karvakrolu, s přídavkem thymolu, s kombinací přídavků thymolu a karvakrolu. Poté byli sumci infikováni gramnegativní bakterií *Aeromonas hydrophila* a následovalo sledování úhynu. Výsledky práce ukázaly, že karvakrol a thymol významně zvýšily růst sumců a výrazně zvýšily antioxidační aktivitu.

Karvakrol a thymol jsou považovány za významné antioxidanty, nacházející se hojně v rostlinách rodu *Thymus* a také v řeckém oreganu. Antioxidační účinek a syntézu těchto látek studovali Beena et al. (2013). Také Ramos et al. (2014) sledovali antioxidační účinek karvakrolu a thymolu. V této práci se zaměřili na přechod zmíněných látek z polypropylenových obalů do potravinových simulantů a následně zkoumali antioxidační aktivitu prostřednictvím metody DPPH. Bylo zjištěno, že karvakrol i thymol přecházejí do potravinových simulantů, přičemž thymol vykazoval vyšší antioxidační aktivitu. Autoři poukazují na možné prodloužení trvanlivosti potravinářských výrobků balených do polypropylenových obalů a zmiňují, že by tyto obaly, mohly vést k náhradě potravinových aditiv přidávaných do potravinových výrobků.

Antioxidační aktivitou esenciálního oleje řeckého oregana se také zabývali Kulisic et al. (2004). V této studii bylo k zhodnocení využito tří metod: metoda DPPH, BCB test a TBARS metoda. Významná antioxidační aktivita byla zjištěna u všech použitých metod a tyto výsledky naznačují možné použití esenciálního oleje řeckého oregana v potravinářském průmyslu jako přirozeného antioxidantu.

Studie Conforti et al. (2011) sledovala antioxidační aktivitu etanolového extraktu řeckého oregana. Hodnocen byl obsah celkových fenolů, obsah celkových flavonoidů, antioxidační aktivita pomocí metody DPPH, BCB testu a cytotoxický účinek. Pro stanovení obsahu celkových fenolů byla použita metoda Folin-Ciocalteu, kterou byla naměřeno 38,7 mg chlorogenové kyseliny/g extraktu. Metodou DPPH byla určena IC_{50} na 12,8 μ g/ml.

Výsledky této práce dokazují významnou antioxidační aktivitu etanolového extraktu řeckého oregana.

Celkový obsah fenolů, antioxidační aktivitu a toxicitu vodního extraktu u vybraných řeckých aromatických bylin zkoumala studie Skotti et al. (2014). Od každé byliny byly připraveny tři typy extraktů, které se lišily podmínkami přípravy. Extrakt A byl připraven zalitím vzorku demineralizovanou vodou o teplotě 85 °C, u extraktu B byla použita demineralizovaná voda pokojové teploty a u extraktu C bylo také využito demineralizované vody pokojové teploty, avšak zde byl ještě účinek ultrazvukové vodní lázně. Měření celkového obsahu fenolů bylo provedeno prostřednictvím Folin-Ciocalteovy metody. Řecké oregano vykazovalo tyto hodnoty: 0,643 mg CA/ml (extrakt A), 0,318 mg CA/ml (extrakt B), 0,342 mg CA/ml (extrakt C). Pro vyhodnocení antioxidační aktivity byly použity metody DPPH a ABTS. Metodou DPPH byly nalezeny tyto výsledky: 3,16 μmol Trolox/ml (extrakt A), 1,45 μmol Trolox/ml (extrakt B), 1,62 μmol Trolox/ml (extrakt C). Antioxidační aktivita naměřena metodou ABTS byla u extraktu A 3,35 μmol Trolox/ml, u extraktu B 1,55 μmol Trolox/ml a u extraktu C 1,73 μmol Trolox/ml. Výsledky studie ukazují, že z pěti vybraných bylin (meduňka lékařská, yzop lékařský, řecké oregano, krétské oregano, šalvěj lékařská) má nejvyšší antioxidační aktivitu a nejvyšší obsah celkových fenolů meduňka lékařská následovaná řeckým oreganem. Bylo zjištěno, že podmínky přípravy extraktů významně ovlivňují obsah celkových fenolů a antioxidační aktivitu.

Chrpová et al. (2010) se ve své práci zabývali antioxidační aktivitou vybraných bylin. Sledován byl celkový obsah fenolů, který byl stanoven metodou Folin-Ciocalteu. U řeckého oregana bylo touto metodou naměřeno 27 mg GAE/g sušené rostliny. Metoda DPPH byla využita pro stanovení antioxidační aktivity, kdy byla u řeckého oregana zjištěna hodnota 56,2 mg AAE/g sušené rostliny.

Obsah vitamínu C v průběhu vegetačního růstu bylin byl jedním ze sledovaných parametrů studie Baranauskienė et al. (2013). Nejvyšší hladina vitamínu C u řeckého oregana (11,4 mg/100 g čerstvé byliny) byla zjištěna u bylin sklizených v plném květenství. Množství 3,8 mg vitamínu C /100 g čerstvé byliny bylo naměřeno v počátečním stádiu vegetace.

3.3 Faktory ovlivňující antioxidační aktivitu bylin

Antioxidační aktivita bylin se odvíjí od mnoha různých faktorů. Dle Škrovánkové et al. (2012) závisí antioxidační aktivita na konkrétní bylině (jejím druhu, způsobu a podmínkách pěstování, způsobu sklizně, posklizňových úpravách a zpracování), kvantitativnímu a kvalitativnímu obsahu antioxidantů. Katalinic et al. (2006) uvádí mezi látkami

přispívajícími k celkové antioxidační aktivitě mnoha léčivých a kořeninových rostlin třísloviny, látky fenolické povahy a složky silice. Vliv na úroveň antioxidační aktivity má také způsob extrakce, jeho podmínky a typ použitého rozpouštědla (Škrovánková et al., 2012).

3.3.1 Podmínky pěstování

Z hlediska podmínek pěstování byl v publikovaných studiích sledován především vliv na obsah a složení esenciálního oleje bylin. Účinek délky denního světla na složení esenciálního oleje majoránky obecné byl identifikován ve studii Circella et al. (1995). Tento výsledek se shoduje s tvrzením Tibaldi et al. (2011), že světlo může mít významný vliv na syntézu esenciálního oleje bylin čeledi *Lamiaceae*. V této práci bylo zjištěno, že množství monoterpenů v řeckém oreganu je ovlivněno podmínkami pěstování a slunečním zářením. Podmínky pěstování měly vliv na množství esenciálního oleje a díky této znalosti lze dle autorů tímto způsobem obsah oleje zvýšit.

Vlivem rozdílných podmínek pěstování na chemické složení a biologickou aktivitu esenciálního oleje dobromysli obecné se zabývali De Falco et al. (2013). Byliny byly pěstovány v jednotlivých či ve dvojitých řádcích. Byliny jednotlivých řádků byly vysázeny ve vzdálenosti 0,5 m mezi bylinami s 0,4 m vzdálenými řádky. U dvojitých řádků byla vzdálenost mezi bylinami v řádku také 0,5 m, avšak dvouřádky dělilo 0,2 m se vzdáleností 1,2 m od ostatních řádků. Ukázalo se, že tento faktor ovlivnil růst, množství čerstvé biomasy, množství a složení esenciálního oleje. Množství esenciálního oleje bylo vyšší u bylin v plném květu pěstovaných ve dvojitých řadách. Olej získaný z bylin pěstovaných v jednotlivých řadách obsahoval větší množství sabinenu, zatímco u bylin z dvojitých řad byl vyšší obsah ocimenu. Také byla u esenciálního oleje prokázána významná antimikrobiální aktivita proti gramnegativním bakteriím, především proti *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*.

Kouřimská et al. (2014) zkoumali antioxidační aktivitu bylin čeledi *Lamiaceae* pěstovaných ekologickým a konvenčním způsobem. Testovanými bylinami byly dobromysl obecná, řecké oregano a máta peprná. Sledována byla aktivita vodního extraktu stanovena metodou DPPH, obsah celkových fenolů měřený metodou Folin-Ciocalteu a antioxidační aktivita určena Schaalovým testem. U bylin z ekologického zemědělství nebyla zjištěna významně vyšší antioxidační aktivita oproti bylinám z konvenčního zemědělství. Statisticky významný rozdíl byl nalezen u antioxidační aktivity vodního extraktu sušených bylin a extraktu čerstvých bylin, kdy vyšší aktivita byla naměřena u extraktu ze sušených bylin.

Antioxidační aktivita dobromysli obecné a řeckého oregana měřená metodou DPPH je zaznamenána v Tabulce 1.

Tabulka 1 Antioxidační aktivita měřená metodou DPPH (Kouřimská et al., 2014)

Bylina	Sklizeň	Stav byliny	DPPH (mg AA/100 g)			
			ekologické zemědělství		konvenční zemědělství	
				na sušinu		na sušinu
Dobromysl obecná	1.	čerstvá	1190	4310	810	2860
		sušená	5140	6500	3690	4580
	2.	čerstvá	1980	8330	1160	4830
		sušená	3760	4320	15560	17840
Řecké oregano	1.	čerstvá	510	1970	540	2190
		sušená	13160	16660	10420	13240
	2.	čerstvá	1240	5560	1550	7740
		sušená	11560	13470	4920	5720

AA = askorbová kyselina

3.3.2 Doba sklizně

Tento faktor sledovali Ozkan et al. (2010). Ve své práci se zaměřili na vliv doby sklizně na složení esenciálního oleje, obsah fenolických složek a antioxidační aktivitu tureckého oregana. Maximální výtěžek esenciálního oleje z listů byl zaznamenán u rostlin sklizených v polovině července. V silici byly nejvíce zastoupeny karvakrol, thymol, γ -terpinen, p-cymen, α -terpinen a α -pinen. Nejvyšší obsah karvakrolu byl pozorován u sklizně z července. Esenciální olej z listů vykazoval nejvyšší antioxidační aktivitu u bylin sklizených v červnu. V extraktu tureckého oregana bylo identifikováno dvanáct fenolických sloučenin, z nichž hlavními byly rozmarýnová kyselina a acecetin. Celkový obsah fenolů a antioxidační aktivita byly nejvyšší u sklizně bylin z července.

Působení doby sklizně na výnos a složení esenciálního oleje dobromysli obecné a řeckého oregana byl zkoumán Baranauskienė et al. (2013). Bylo zjištěno, že v různých fázích sklizně byl výnos esenciálního oleje vždy vyšší u řeckého oregana oproti dobromysli obecné. Z hlediska získávání esenciálního oleje byla za nejproduktivnější období určena doba květu bylin.

3.3.3 Způsob posklizňové úpravy

Obsah vody v čerstvých bylinách čeledi *Lamiaceae* se obvykle pohybuje v rozmezí 75-80 %. Pro konzervaci těchto bylin je nutné snížit množství obsažené vody na méně než 15 % (Díaz-Maroto et al., 2002). Snížením aktivity vody dochází k inaktivaci enzymů, které ve své aktivní formě mohou být dle Hossain et al. (2010) příčinou degradace antioxidantních složek u čerstvých bylin. Aktivita vody může být snížena prostřednictvím různých metod.

3.3.3.1 Sušení

Nejčastěji používanou metodou konzervace bylin je sušení. Tato metoda konzervace inhibuje mikrobiální růst a předchází určitým biochemickým změnám. Sušení však vede ke zvýšení obsahu některých látek. Při porušení buněk pletiv v průběhu sušení dochází k uvolnění fenolických látek, které mohou působit vyšší antioxidantní aktivitu. Změny vzhledu a aroma jsou způsobeny ztrátou či tvorbou nových těkavých látek v důsledku oxidace či esterifikačních reakcí. (Hossain et al., 2010).

Sušení na vzduchu je nejjednodušší a nejméně nákladnou metodou sušení. Při průběhu tohoto typu konzervace působí nízké teploty, které brání degradaci aktivních složek bylin, avšak sušení je poměrně pomalé a metabolické procesy tak mohou dále pokračovat a způsobit kvalitativní změny bylin (Keinänen a Julkunen-Tiitto, 1996). Pomalá ztráta vody může působit jako stresor, čímž se aktivuje stresová reakce. Obranným mechanismem většiny rostlin je produkce fenolických látek (Hossain et al., 2010). Dle Dixon a Paiva (1995) je tvorba několika fenylypropanoidů (flavonoidů, isoflavonoidů, kumarinů, psoralenu, fenolických kyselin, ligninu a suberinu) v rostlině vyvolána biotickými a abiotickými stresory, kterými jsou nízká teplota, poranění rostliny a napadení patogeny. Tyto faktory mohou prostřednictvím zvýšení zmíněných antioxidantních látek přispívat k vyšší antioxidantní aktivitě bylin sušených touto metodou. Tento jev potvrdili Hossain et al. (2010), když u extraktu bylin sušených při pokojové teplotě našli významně vyšší množství rozmarýnové kyseliny než u jiných metod sušení či čerstvého vzorku. Novák et al. (2011) uvádí, že teplota sušení může výrazně ovlivnit kvalitu esenciálního oleje, kdy při nižších teplotách sušení (pod 40 °C) lze získat vyšší množství karvakrolu.

Další hojně využívanou metodou je sušení konvektivní. Tato metoda má však určité nevýhody, jako je nutnost použití vysokých teplot a poměrně dlouhá doba sušení. Při kontaktu horkého vzduchu se sušeným materiálem dochází dle Figiel et al. (2010) k degradaci chuťových složek, nutričních látek a změně barvy. Zvyšování teploty sušení obvykle vede ke

snížení kvality sušených bylin. Díaz-Maroto et al. (2002) ve své práci sledovali účinky různých typů sušení na obsah těkavých látek v petrželi. Bylo zjištěno, že metoda konvektivního sušení a lyofilizace zapříčinily snížení obsahu většiny těkavých látek. Nejmenší změny obsahu těkavých látek byly nalezeny u metody sušení při pokojové teplotě.

Stále populárnější metodou se díky svým výhodám stává vakuové mikrovlnné sušení. Energie mikrovln je absorbována vodou obsaženou v bylině, tím se vytváří tlak ve středu materiálu a je umožněn rychlý transport vody do okolního vakua, který zabraňuje poničení tkáně byliny (Figiel et al., 2010). Dle Chan et al. (2012) může mikrovlnné sušení bylin způsobit inaktivaci polyfenoloxidázy a to je možnou příčinou zachování antioxidační aktivity během sušení.

Lyofilizace je metoda sušení založena na sublimaci zmrzlé vody za nízké teploty a tlaku. Výhodou lyofilizace je zachování strukturální integrity, textury, aroma a chuti (Chakraborty et al., 2011). Dle Hossain et al. (2010) působí neporušená tkáňová struktura jako překážka pro uvolnění fenolických látek do extraktu. Prostřednictvím tohoto efektu vykazuje extrakt nižší antioxidační aktivitu.

Vliv tří různých metod sušení na antioxidační aktivitu dobromysli obecné studovali Jałoszynski et al. (2008). Zkoumanými metodami dehydratace byly lyofilizace, konvektivní sušení a vakuové mikrovlnné sušení. Lyofilizace probíhala při teplotě $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ za působení tlaku o 65 Pa. U konvektivního sušení byly použity tři různé teploty: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vakuové mikrovlnné sušení bylo zkoumáno při různé síle výkonu: 240 W, 360 W, 480 W. V sušicí komoře se měnil tlak od 4 do 6 kPa. Sledovaným parametrem byl také celkový obsah fenolů určený metodou Folin-Ciocalteu. Bylo zjištěno, že při sušení dochází ke ztrátě fenolických složek v porovnání s bylinami čerstvými. Nejnižší obsah fenolů byl nalezen u bylin sušených metodou konvektivní při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dle autorů dochází při působení vysoké teploty k degradaci fenolických složek. Vyšší hodnoty celkových fenolů byly naměřeny u metody vakuového mikrovlnného sušení, kdy nižší množství bylo stanoveno u nižšího výkonu. Z hlediska obsahu fenolů se z použitých metod sušení jeví jako nejvýhodnější lyofilizace. Schopnost zhaset DPPH radikál byla nejvyšší u čerstvých bylin. Mezi pozorovanými metodami sušení byla nejvyšší antioxidační aktivita stanovena u lyofilizace, zatímco nejnižší hodnota u konvektivního sušení při teplotě $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Obsah celkových fenolů a antioxidační aktivita dobromysli obecné v závislosti na zkoumaných metodách jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2 Obsah celkových fenolů, antioxidační aktivita (DPPH) čerstvé a sušené dobromysli obecné na 100 g byliny (Jaloszynski et al., 2008)

Metoda sušení	Obsah celkových fenolů (mg GAE/100 g)	DPPH (μ M Trolox/100 g)
Čerstvý vzorek	394,06	362,49
Lyofilizace	168,87	286,00
Vakuové mikrovlnné (240 W)	85,14	100,34
Vakuové mikrovlnné (360 W)	100,48	129,82
Vakuové mikrovlnné (480 W)	112,11	148,15
Konvektivní (50 °C)	138,04	168,07
Konvektivní (60 °C)	63,96	75,64
Konvektivní (70 °C)	64,68	15,88

Rozdíly mezi antioxidační aktivitou čerstvých a sušených vybraných bylin z čeledi *Lamiaceae* zkoumali Capecka et al. (2004). Mezi sledovanými parametry byly také celkový obsah fenolů, L-askorbová kyselina a karotenoidy. Testovanými bylinami byly máta peprná, meduňka lékařská a dobromysl obecná. Antioxidační účinek byl určen metodou inhibice peroxidace linolové kyseliny. Nejvyšší antioxidační aktivita byla stanovena u extraktu sušené a čerstvé dobromysli obecné, kdy mezi hodnotami těchto extraktů nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. Proces sušení snížil antioxidační aktivitu máty peprné a meduňky lékařské. Schopnost zhášet volné radikály DPPH byla vysoká u téměř všech testovaných extraktů. Výjimkou byl extrakt sušené dobromysli obecné, u kterého byla tato schopnost nižší. Z výsledků vyplývá, že schopnost zhášet volné radikály DPPH je výrazně nižší u extraktu sušené dobromysli obecné oproti extraktu z byliny čerstvé. Obsah celkových fenolů určený metodou Folin-Ciocalteu byl vysoký u všech zkoumaných bylin, přičemž sušení zvýšilo obsah těchto látek v dobromysli obecné a mátě peprné. Množství L-askorbové kyseliny určené jodometrií bylo nejvyšší u čerstvé máty peprné (52,6 mg/100 g čerstvé byliny) a meduňky lékařské (53,2 mg/100 g čerstvé byliny). Čerstvá dobromysl obecná obsahovala 23,1 mg L-askorbové kyseliny/100 g čerstvé byliny. Proces sušení způsobil významné snížení této kyseliny. Z hlediska vlivu sušení na obsah karotenoidů byl zjištěn obdobný účinek. Množství karotenoidů se u všech zkoumaných čerstvých bylin pohybovalo na obdobné úrovni v rozmezí 46,3 – 58,1 mg/100 g čerstvé byliny.

Cílem práce Hossain et al. (2010) bylo zjistit změny v obsahu celkových fenolů, v množství rozmarýnové kyseliny a antioxidační kapacitě u šesti bylin čeledi *Lamiaceae*

v závislosti na třech různých metodách sušení. Rozmarýn, dobromysl, majoránka, šalvěj, bazalka a tymián byly sušeny za rozdílných podmínek: sušení ve tmě při pokojové teplotě, sušení ve vakuové troubě při 70 °C, vymrazování v mrazničce při -54 °C. Byliny byly poté uchovány při teplotě -20 °C po dobu 60 dní a porovnávány se vzorky čerstvých bylin. Antioxidační kapacita byla určena metodami FRAP a ORAC. Všechny metody sušení se osvědčily jako velmi užitečné techniky pro zvýšení obsahu fenolů a antioxidační kapacity extraktů. Jako možný důvod autoři udávají uvolnění fenolických sloučenin z buněk pletiv narušených v průběhu sušení. U bylin sušených při pokojové teplotě byl zjištěn nejvyšší obsah celkových fenolů, rozmarýnové kyseliny a nejvyšší antioxidační aktivita oproti ostatním testovaným metodám sušení. Nejnižší hodnoty sledovaných parametrů byly nalezeny u čerstvých bylin. Příčinou této skutečnosti může být dle autorů enzymatická degradace způsobená přítomností aktivních enzymů v čerstvých bylinách a také náchylnost k vnější degradaci zapříčiněné atmosférickým kyslíkem.

Další studií zabývající se účinkem sušení na antioxidační aktivitu bylin čeledi *Lamiaceae* byla studie Chan et al. (2012). Sledovanými metodami dehydratace byly sušení v troubě při 50 °C, sušení v troubě při 80 °C a sušení v troubě při 50 °C s předchozí úpravou v mikrovlnné troubě. U čerstvých a sušených bylin byl v rámci antioxidačních vlastností zkoumán obsah celkových fenolů, obsah celkových flavonoidů, obsah kafeoylchinové kyseliny a antioxidační aktivita metodou DPPH a FRAP. Z výsledků vyplývá, že největší pokles antioxidačních vlastností způsobuje metoda sušení v troubě při 80 °C. Dále bylo zjištěno, že pouze u dobromysli obecné došlo v průběhu dvou typů sušení (v troubě při 50 °C, v troubě při 50 °C s předchozí úpravou v mikrovlnné troubě) ke zvýšení fenolických látek i antioxidační aktivity oproti vzorku čerstvé byliny. Obsah celkových fenolů byl u čerstvého vzorku 857 mg GAE/100 g čerstvé byliny, zatímco u sušení při 50 °C došlo ke zvýšení o 4 % a u sušení s předchozí úpravou v mikrovlnné troubě se obsah zvýšil o 19 %. Autoři článku za nejvýhodnější metodu sušení z hlediska antioxidační aktivity uvádí sušení v troubě při 50 °C s předchozí úpravou v mikrovlnné troubě. Tento výsledek autoři přičítají možné inaktivaci polyfenoloxidázy během mikrovlnného sušení.

Práce Kadlecové (2014) porovnávala antioxidační aktivitu čerstvých a sušených bylin čeledi *Lamiaceae*. Testovanými bylinami byly tymián obecný, dobromysl obecná, saturejka zahradní, majoránka zahradní a řecké oregano. Hodnocenými parametry byly celkový obsah fenolů měřený metodou Folin-Ciocalteu, antioxidační aktivita stanovená metodou DPPH a pomocí Schaalova testu, množství a složení esenciálního oleje. Byl zjištěn statistický významný rozdíl v antioxidační aktivitě čerstvých a sušených bylin, kdy vyšší aktivitu

vykazovaly byliny sušené. V obsahu celkových fenolů u první sklizně nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi čerstvými a sušenými bylinami, zatímco u druhé sklizně bylo množství celkových fenolů významně vyšší u bylin sušených. Prokázána byla silná korelace mezi schopností zhášet radikál DPPH a obsahem celkových fenolů.

Tabulka 3 Antioxidační aktivita měřena metodou DPPH a celkový obsah fenolů (Kadlecová, 2014)

Bylina	Sklizeň	Stav byliny	DPPH (mg AA/100 g)		TPC (g GA/100 g)	
				na sušinu		na sušinu
Dobromysl obecná	1.	čerstvá	1,798	8,923	0,837	4,154
		sušená	11,529	11,696	4,664	4,732
	2.	čerstvá	1,837	6,563	0,610	2,179
		sušená	12,028	13,588	4,277	4,832
Řecké oregano	1.	čerstvá	1,353	7,471	0,636	3,511
		sušená	6,545	7,252	2,707	2,999
	2.	čerstvá	1,848	11,156	0,577	3,493
		sušená	12,464	14,183	4,255	4,842

TPC = Total phenolic compounds

Novák et al. (2011) ve své práci sledovali vliv různých metod sušení na množství a složení esenciálního oleje řeckého oregana. Zkoumanými metodami byly sušení při pokojové teplotě (průměrná teplota 22 °C), sušení v sušičce při teplotě 30 °C, 40 °C a 45 °C. Bylo zjištěno, že množství i složení esenciálního oleje bylo významně ovlivněno typem sušení. Obsah esenciálního oleje byl nejvyšší u sušení při 40 °C a 45 °C, přičemž mezi tímto obsahem a množstvím oleje získané sušením při pokojové teplotě nebyl statisticky významný rozdíl. V rámci změny složení esenciálního oleje byl sledován obsah majoritní látky karvakrolu. Největší množství karvakrolu (89,47 %) bylo naměřeno u vzorku bylin sušených při 30 °C. Byliny sušené při pokojové teplotě obsahovaly nejnižší množství karvakrolu (82,75 %), což bylo spojeno s větším množstvím jeho prekurzorů γ -terpinenu a p-cymenu.

3.3.3.2 Mražení

Další metodou vedoucí ke snížení aktivity vody je mražení. V průběhu této metody dochází ke tvorbě krystalů, která způsobuje porušení buněk rostlin, čímž umožňuje lepší přístup rozpouštědla (Keinänen a Julkunen-Tiitto, 1966). Tomsone a Kruma (2014) uvádí

tento jev jako možnou příčinu vyššího obsahu fenolů v mražených bylinách. Chan et al. (2014) tvrdí, že účinek mražení a dalších metod zpracování bylin na antioxidační aktivitu se liší v závislosti na konkrétní bylině. Snížení antioxidační aktivity v důsledku mražení zaznamenali u listů olivovníku evropského Ahmad-Qasem et al. (2012). K rozdílnému výsledku došli autoři práce Tomsona a Kruma (2014), kteří zkoumali vliv sušení a mražení na obsah fenolů a antioxidační aktivitu libečku lékařského a křenu selského. Část bylin byla zmražena při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, část usušena při pokojové teplotě ve tmě a pro porovnání byla třetí část bylin analyzována v čerstvém stavu. Obsah fenolů byl stanoven metodou Folin-Ciocalteu a antioxidační aktivita byla měřena metodou DPPH a ABTS. Použité metody zpracování ovlivnily jak obsah fenolů, tak antioxidační aktivitu. Oba tyto parametry byly nejvyšší u bylin mražených, tudíž autoři posuzují tuto metodu zpracování jako nejvhodnější z hlediska uchování antioxidační aktivity a obsahu fenolů.

Najafian (2014) sledoval účinek skladovacích podmínek na složení esenciálního oleje meduňky lékařské. Tato bylina byla po čtyři měsíce skladována při třech rozdílných podmínkách: v lednici při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, při pokojové teplotě. Autor došel k závěru, že při nízkých teplotách ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) dochází k nejmenšímu snížení množství jednotlivých složek esenciálního oleje, což vede k zachování kvality oleje.

Součástí studie Chohan et al. (2008) bylo určení antioxidační aktivity vybraných kulinářských bylin v závislosti na různých podmínkách skladování. Účinek mražení byl pozorován na extraktu levandule lékařské skladované v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu jednoho týdne. Antioxidační aktivita této byliny stanovená metodou TEAC zůstala po týdenním skladování při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nezměněna.

3.3.4 Způsob extrakce

K izolaci antioxidantů se využívá různých extrakčních metod. Často používanými metodami jsou extrakce z pevné fáze do kapaliny a parní destilace. V posledních letech se zvyšuje zájem o metody extrakce poskytující vysokou kvalitu a aktivitu za použití netoxického rozpouštědla, jako jsou superkritická fluidní extrakce oxidem uhličitým a subkritická vodní extrakce (Rodríguez-Meizoso et al., 2006). Škrovánková et al. (2012) uvádí mezi nejčastěji používanými rozpouštědly polární (ethanol, methanol, voda, aj.) a nepolární (hexan, aj.).

Vlivem typu rozpouštědla na antioxidační aktivitu dobromysli obecné a bazalky pravé se zabývala studie Kaurinovic et al. (2011). Sledováno bylo pět různých extraktů, připravených pomocí rozpouštědel etheru, chloroformu, ethylacetátu, n-butanolu a vody.

Antioxidační aktivita byla měřena prostřednictvím zhášení DPPH, NO, O₂⁻, OH radikálů a neutralizací H₂O₂. U ethylacetátového, n-butanolového a vodného extraktu obou bylin byla nalezena silná antioxidační aktivita. Nižší aktivitu vykazovaly etherový a chloroformový extrakt.

Kawase et al. (2013) zkoumali změny v esenciálním oleji dobromysli obecné ovlivněné různými extrakčními metodami. Testovanými metodami byly hydrodestilace, extrakce dle Soxhleta a superkritická fluidní extrakce. Pro určení složek esenciálního oleje byla použita metoda GC/MS. Extrakty byly hodnoceny z hlediska antioxidační aktivity a prostřednictvím termální analýzy. Největší množství karvakrolu a thymolu bylo nalezeno u esenciálního oleje získaného hydrodestilací, avšak nejlepší výsledek z hlediska antioxidační aktivity vykazoval olej extrahovaný metodou dle Soxhleta probíhající šest hodin za použití ethanolu. Tento výsledek ukazuje, že antioxidační aktivita esenciálního oleje dobromysli obecné nesouvisí s výší obsahu těchto fenolických látek.

Rozdílných rozpouštědel bylo využito v práci Tsimogiannis et al. (2006) k izolaci a charakteristice antioxidačních složek řeckého oregana. K extrakci složek byliny byl použit Soxhletův přístroj za postupného využití rozpouštědel se zvyšující se polaritou (petrolether, diethylether, ethanol, diethylether a ethylacetát získaný frakcionací ethanolového extraktu). Méně polární složky, jako jsou složky esenciálního oleje, byly získány petroletherem. Diethyletherem byly extrahovány fenolické aglykony, zatímco fenolické kyseliny a glykosidy byly extrahovány ethanolem. Nejvyšší antioxidační aktivita určená metodou DPPH byla nalezena u diethyletheru z ethanolového extraktu, následována aktivitou ethanolového a poté diethyletherového extraktu. Nejnižší antioxidační aktivita byla naměřena u extraktu petroletheru.

4 Experimentální část

4.1 Materiál

4.1.1 Byliny a jejich pěstování

Pro účely experimentální části byly vypěstovány a analyzovány byliny rodu *Origanum* dobromysl obecná (*Origanum vulgare* L.) a řecké oregano (*Origanum heracleoticum* L.). Byliny byly vysety 20. 4. 2014 na slunném záhoně s nehnojenou zemínou v Jirnech okres Praha – východ. Pro setbu byla použita semena dobromysli obecné (*Origanum vulgare* L.) firmy Seva Seed a řeckého oregana (*Origanum heracleoticum* L.) firmy Kiepenkerl.

Skřízeň nadzemních částí rostlin byla provedena před květem bylin 30. 7. 2014. Část bylin byla dále sušena volně ložená při pokojové teplotě ve větrané místnosti. Další část bylin byla zamrazena v mikrotenových sáčcích v mrazáku při teplotě -18 °C. Zbývající část bylin byla analyzována v čerstvém stavu. Pro přípravu extraktů byly použity listy čerstvých, sušených a mražených bylin.

4.1.2 Chemikálie

Demineralizovaná voda

Methanol p. a., Lachner, ČR

Uhličitan sodný bezvodný p. a., Lachner, ČR

Folin – Ciocalteuovo fenolové činidlo, Merck, Německo

DPPH 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl, Sigma Aldrich, USA

Kyselina metafosforečná, Penta, ČR

n-Hexan, Lachner, ČR

Síran sodný bezvodný p. a., Lachema, ČR

4.1.3 Standardy antioxidantů

Kyselina askorbová p. a., Penta, ČR

Kyselina gallová p. a., Sigma Aldrich, USA

4.1.4 Přístroje

Analytická váha AND ER- 180A, A and D Company, Japonsko

Infračervená sušicí váha Precisa HA 300, Precisa Instruments, Švýcarsko

UV lázeň Tesla, ČR

Spektrofotometr UV- 2900 PC, Tsingtao Unicom-Optics Instruments Co., Ltd., Čína

Topné hnízdo LTHS 2000

Centrifuga EBA 21 Hettich zentrifugen

Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975C s kolonou HP-5MS Agilent

Kapalinový chromatograf Agilent Technologies 7890A s kolonou LiChroCart 125-4 Purospher Star RP-18e

4.2 Metody

4.2.1 Stanovení celkové sušiny

Stanovení celkové sušiny probíhalo na infračervených sušicích vahách s přednastaveným programem pro sušení zeleniny. Na hliněnou fólii byl navážen a rozprostřen nadrobno natrhaný vzorek byliny o hmotnosti 1 g. Teplota sušení byla 105 °C a proces sušení trval do té doby, než se hmotnost vzorku bylin nezměnila o více než 2 mg za 30 vteřin. U všech vzorků bylo provedeno měření celkové sušiny třikrát, případně čtyřikrát, pokud se vyskytla větší odchylka v naměřených hodnotách. Výsledná celková sušina je průměrem získaných hodnot.

4.2.2 Příprava extraktů

Na přípravu extraktů bylo použito 6 g čerstvých bylin, zatímco u sušených a mražených vzorků byla stanovena navážka ekvivalentní, která byla určena dle obsahu celkové sušiny bylin. Navážka sušených bylin byla u dobromysli obecné 2,307 g a u řeckého oregana 1,728 g. Mražené dobromysli obecné bylo naváženo 7,371 g a mraženého řeckého oregana 6,754 g.

Vzorky bylin byly naváženy do kádinek a byly zality 50 ml horké demineralizované vody. Následně byla extrakce podpořena UV lázní, kádinky v ní byly umístěny po dobu 10 minut. Obsah kádinek byl přefiltrován a opět zalit 50 ml horké demineralizované vody. Kádinky byly znovu na 10 minut vloženy do UV lázně. Poté byly extrakty zfiltrány do 100ml odměrných baněk a po zchlazení byly doplněny po rysku demineralizovanou vodou. Tento postup pro přípravu extraktů byl dodržen u čerstvých, sušených i mražených vzorků bylin. Připravené extrakty byly v tentýž den použity pro analýzu metodou DPPH a pro stanovení celkového obsahu fenolů.

4.2.3 Stanovení antioxidační aktivity

4.2.3.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Princip metody spočívá v odbarvování fialového roztoku radikálu DPPH působením antioxidantu. Pokles absorbance je měřen spektrofotometricky při vlnové délce 522 nm. Metoda je kalibrována na kyselinu askorbovou. Antioxidační aktivita je vyjádřena jako ekvivalenty kyseliny askorbové na jednotku hmotnosti vzorku. Metoda byla převzata z práce Kadlecová (2014) a upravena.

Roztok radikálu DPPH

Zásobní roztok radikálu DPPH byl připraven navážením 0,052 g DPPH do 100ml odměrné baňky a doplněním metanolu po rysku. Tento roztok byl uložen ve tmě v mrazáku pro další měření (při těchto podmínkách lze roztok skladovat po dobu 3 týdnů). Pro měření byl zásobní roztok naředěn metanolem v poměru 1:9. Do 50ml odměrné baňky bylo přidáno 5 ml zásobního roztoku a doplněno po rysku metanolem.

Roztok kyseliny askorbové

Pro kalibraci byl připraven roztok kyseliny askorbové. Z důvodu snadné degradovatelnosti byl vždy před měřením připraven čerstvý roztok. Do 100ml odměrné baňky se navážilo 0,0215 g kyseliny askorbové, ta byla zalita demineralizovanou vodou po rysku. Z toho roztoku byly připraveny čtyři koncentrace pro sestavení kalibrační křivky. Do 50 ml odměrných baněk bylo pipetováno 3, 2, 1 a 0,7 ml roztoku kyseliny askorbové a zalito demineralizovanou vodou po rysku.

Vodný extrakt vzorků bylin

Připravené extrakty bylin bylo nutno naředit. Ředění bylo určeno experimentálně tak, aby absorbance vzorků byla v rozsahu kalibrační křivky. Z extraktů čerstvých, sušených i mražených bylin bylo pipetováno 300 µl do 50ml odměrných baněk a doplněno po rysku demineralizovanou vodou.

Měření absorbance

Vzorky byly proměřovány proti metanolu. Slepý vzorek byl tvořen 2 ml naředěného roztoku radikálu DPPH a 1 ml demineralizované vody. Tento vzorek se odečítal od všech naměřených hodnot. Do čtyř květ bylo pipetováno po 2 ml ředěného roztoku radikálu DPPH a po 1 ml jednotlivých koncentrací kyseliny askorbové. Tři květy obsahovaly 2 ml

naředěného roztoku radikálu DPPH a 1 ml naředěných extraktů bylin. Všechny kyvety se vzorky byly uloženy ve tmě a byly proměřeny po 1, 2 a 3 hodinách při vlnové délce 522 nm.

4.2.3.2 Stanovení celkového obsahu fenolů

Stanovení celkového obsahu fenolů bylo provedeno pomocí spektrofotometrické metody využívající Folin-Ciocalteuova fenolového činidla. Absorbance byla měřena při vlnové délce 760 nm. Výsledky jsou vyjádřeny jako ekvivalenty kyseliny gallové na jednotku hmotnosti vzorku. Metoda byla převzata z práce Kadlecová (2014) a upravena.

Roztok uhličitanu sodného

Pro přípravu 20% roztoku uhličitanu sodného bylo do 100ml odměrné baňky odváženo 20 g uhličitanu sodného a doplněno po rysku demineralizovanou vodou. Rozpuštění bylo podpořeno ultrazvukovou lázní.

Slepý vzorek

Slepý vzorek byl připraven do 10ml odměrné baňky s použitím 0,5 ml Folin-Ciocalteuova fenolového činidla, 1,5 ml 20% roztoku uhličitanu sodného a doplněním po rysku demineralizovanou vodou.

Roztok kyseliny gallové

Do 100ml odměrné baňky bylo naváženo 0,01 g kyseliny gallové a přidáno 20 ml metanolu, ve kterých byla kyselina rozpuštěna. Roztok byl poté doplněn po rysku demineralizovanou vodou. Pro sestavení kalibrační křivky bylo nutno roztok dále ředit. Do 10ml odměrných baněk bylo pipetováno 100, 200, 400 a 600 μ l roztoku kyseliny gallové a přidáno 0,5 ml Folin-Ciocalteuova fenolového činidla a 1,5 ml 20% roztoku uhličitanu sodného. Roztoky byly po rysky doplněny demineralizovanou vodou.

Vodný extrakt vzorků

Z extraktů čerstvých, sušených i mražených vzorků bylin bylo pipetováno vždy 50 μ l do 10ml odměrných baněk a přidáno 0,5 ml Folin-Ciocalteuova fenolového činidla a 1,5 ml 20% roztoku uhličitanu sodného a doplněno po rysku demineralizovanou vodou. Obsah všech baněk byl důkladně promíchán a uložen ve tmě po dobu 1 hodiny. Poté byly vzorky přelity do kyvet a absorbance byla měřena při vlnové délce 760 nm proti slepému vzorku.

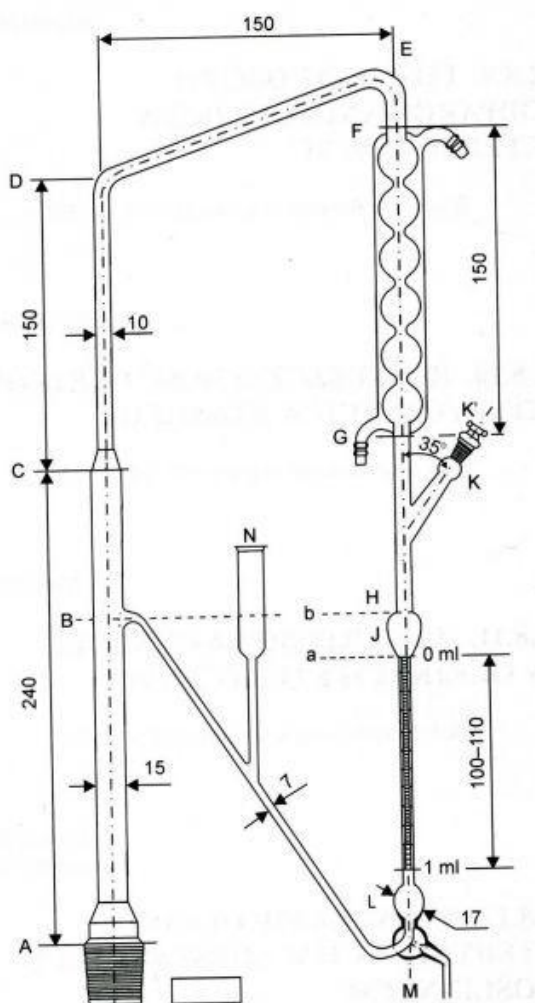
4.2.4 Získání a analýza silice

4.2.4.1 Hydrodestilace

K získání silice byla využita destilace vodní parou s použitím Clevengerova aparátu viz Obrázek 1. Principem této metody je uvolnění silice z rostlinného materiálu a následné unášení vodní parou, kdy v oblasti chladiče dochází ke kondenzaci a oddělení silice od vody.

Do 1000ml varné baňky se zábrusem byl navážen rostlinný materiál, dále bylo přilito 500 ml demineralizované vody a přidány varné kamínky. Baňka se vložila do topného hnízda a připojila k aparátu. Do aparátu byla nálevkou dolita demineralizovaná voda po rysku B, poté bylo zapnuto topné hnízdo na teplotu 150 °C do doby varu, následně byla teplota snížena na 130 °C. Při této teplotě probíhala destilace silice po dobu 4 hodin. K odečtení objemu silice bylo nutno odpustit demineralizovanou vodu trojcestným ventilem. Silice byly stočeny do vialek. Metoda byla převzatá z práce Kadlecová (2014) a upravena.

Obrázek 1 Clevengerův aparát (Český lékopis, 2009)



4.2.4.2 Plynová chromatografie

Ze stočených silic bylo pipetováno vždy 10 µl, přidalo se 500 µl n-hexanu a na špičku nože bezvodého síranu sodného. Vzorky byly analyzovány metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí s použitím plynového chromatografu Agilent 7890A s jednoduchým kvadrupólovým hmotnostním detektorem Agilent 5975C na koloně HP-5MS. Délka kolony byla 30 metrů s průměrem 0,25 mm a tloušťkou filmu 0,25 µm. Nastříkovány byly vzorky o objemu 1 µl v režimu split (1:12). Teplota pece byla na začátku analýzy 60 °C po dobu 3 minut a dále byla nastavená na dosažení 250 °C s rychlostí 3 °C/min. Teplota 250 °C byla poté udržována po dobu 10 minut. Teplota injektoru byla 250 °C. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1 ml/min a jako nosný plyn bylo použito helium. Identifikace složek silice probíhala na základě porovnání naměřených hmotnostních spekter a relativních retenčních časů se záznamy z knihovny NIST a s odbornou literaturou.

4.2.5 Stanovení vitamínu C

Ke stanovení vitamínu C byla použita metoda, jejímž principem je extrakce vitamínu C pomocí roztoku kyseliny metafosforečné. Celkový obsah byl měřen kapalinovým chromatografem Agilent 7890A. Z čerstvých a mražených vzorků bylin bylo naváženo 20 g do kádinek a zalito 80 g 3% kyseliny metafosforečné. U sušených vzorků bylo použito množství materiálu zbylého po předchozích analýzách tedy v rozmezí 5,75 – 7,68 g a také zalito 80 g 3% kyseliny metafosforečné. Vzorky zalité kyselinou metafosforečnou byly homogenizovány tyčovým mixérem, následně zfiltrovány a použity pro analýzu.

Analýza proběhla na HPLC Agilent 7890A s pumpou LCP 5020 a analytickou kolonou LiChroCart 125-4 Purospher Star RP-18e (5 µm). Teplota kolony byla 25 °C. Součástí HPLC byl spektrofotometrický detektor LCD 5000 (vlnová délka 254 nm). Mobilní fází byl 5% metanol a průtok mobilní fáze byl 1 ml/min.

4.2.6 Statistické zhodnocení

Statistické zhodnocení výsledků bylo provedeno prostřednictvím programu Statistica. K testování byla využita jednofaktorová ANOVA s hladinou pravděpodobnosti $p < 0,05$. Podrobnější analýza byla provedena pomocí Scheffého metody.

5 Výsledky

5.1 Sušina bylin

Výsledky stanovení sušiny čerstvých, sušených i mražených bylin dobromysli obecné (*Origanum vulgare* L.) a řeckého oregana (*Origanum heracleoticum* L.) jsou zaznamenány v Tabulce 4 a jsou vyjádřeny se směrodatnou odchylkou (\pm SD).

Tabulka 4 Obsah sušiny bylin (%)

Bylina	Stav bylin		
	čerstvé	sušené	mražené
Dobromysl obecná (<i>Origanum vulgare</i> L.)	32,73 \pm 0,97	85,27 \pm 0,34	26,73 \pm 1,12
Řecké oregano (<i>Origanum heracleoticum</i> L.)	24,04 \pm 1,41	83,62 \pm 0,12	21,35 \pm 0,96

5.2 Antioxidační aktivita DPPH

Od každého vzorku byly na spektrofotometru proměřeny tři roztoky (obsahovaly 2 ml naředěného roztoku radikálu DPPH a 1 ml naředěných extraktů bylin), které byly měřeny vždy po 1, 2 a 3 hodinách. Ze získaných hodnot absorbance vzorků i kyseliny askorbové byly vybrány nejnižší hodnoty, od kterých byla odečtena nejnižší absorbance slepého vzorku. Poté byla vytvořena kalibrační křivka a na jejím základě byla vypočtena antioxidační aktivita jednotlivých extraktů bylin, která byla dále přepočtena na 100 g byliny a 100 g sušiny. Výsledné hodnoty jsou vždy průměrem tří měřených vzorků a jsou uvedeny v Tabulce 5 i se směrodatnými odchylkami.

Z výsledků měření antioxidační aktivity je patrné, že obě byliny s různou posklizňovou úpravou vykazují značný potenciál zhaset volný radikál DPPH. Nejvyšší antioxidační aktivitu měly byliny sušené i po přepočtu na sušinu. Jak lze pozorovat v Tabulce 5, hodnoty čerstvých a mražených bylin na 100 g byliny se příliš nelišily. U výsledků dobromysli obecné přepočtených na sušinu lze sledovat pouze mírný rozdíl mezi čerstvými, sušenými a mraženými vzorky. Při porovnání bylin mezi sebou byla antioxidační aktivita vždy vyšší u vzorků dobromysli obecné.

Tabulka 5 Výsledky měření antioxidační aktivity bylin metodou DPPH

Bylina	Stav byliny	DPPH (mg AA/100 g)	
			na sušinu
Dobromysl obecná (<i>Origanum vulgare</i> L.)	čerstvá	1156 ± 160,3	3532 ± 489,8
	sušená	3572 ± 480,8	4189 ± 560,2
	mražená	1034 ± 162,2	3867 ± 606,7
Řecké oregano (<i>Origanum heracleoticum</i> L.)	čerstvá	463 ± 9,3	1926 ± 38,7
	sušená	2608 ± 563,3	3119 ± 673,7
	mražená	566 ± 62,8	2652 ± 294,1

5.3 Celkový obsah fenolů

Na základně sestrojené kalibrační křivky kyseliny gallové a hodnot absorbance vzorků, kdy od každého vzorku byla provedena vždy tři měření, byl vypočítán celkový obsah fenolů extraktů bylin. Tyto hodnoty byly dále přepočítány na 100 g byliny a 100 g sušiny bylin a byl z nich spočítán průměr. Výsledný obsah celkových fenolů se směrodatnými odchylkami je zaznamenán v Tabulce 6.

Z výsledků uvedených v Tabulce 6 je zřejmé, že čerstvé, sušené i mražené byliny dobromysli obecné i řeckého oregana obsahují významné množství celkových fenolů. Nejvyšší množství fenolů na 100 g rostliny bylo stanoveno u bylin sušených, což koreluje s nejvyšší antioxidační aktivitou. Avšak po přepočítání výsledků dobromysli obecné na sušinu pozorujeme nejvyšší obsah fenolů u čerstvých bylin. Nejnižší množství celkových fenolů vykazovaly byliny mražené a to i po přepočtu na sušinu.

Tabulka 6 Výsledky stanovení celkového obsahu fenolů bylin

Bylina	Stav byliny	TPC (mg GA/100 g)	
			na sušinu
Dobromysl obecná (<i>Origanum vulgare</i> L.)	čerstvá	1248 ± 14,5	3812 ± 44,2
	sušená	2166 ± 5,0	2540 ± 5,9
	mražená	425 ± 6,2	1588 ± 22,6
Řecké oregano (<i>Origanum heracleoticum</i> L.)	čerstvá	795 ± 6,5	3309 ± 27,1
	sušená	3067 ± 43,2	3668 ± 51,6
	mražená	390 ± 0,9	1825 ± 4,7

5.4 Silice

5.4.1 Výtěžnost silic

Výtěžnost silic jednotlivých vzorků je zaznamenána v Tabulce 7 a je uvedena v ml na 1 kg byliny. Z čerstvých bylin byla silice destilována v den sklizně (v Tabulkách 7, 8 a 9 uvedena jako čerstvá 1) a část bylin byla uchována v chladicím zařízení při 5 °C po dobu jednoho dne a až poté byla destilována silice (v Tabulkách 7, 8 a 9 uvedena jako čerstvá 2).

V Tabulce 7 pozorujeme nízký objem silice dobromysli obecné, zatímco výtěžnost silice řeckého oregana je výrazně vyšší. Nejvyšší objem silice byl u obou bylin u sušených vzorků. Nejnižší výtěžnost silice byla prokázána u vzorků bylin čerstvá 1. Mezi vzorky čerstvá 1 a čerstvá 2 byl nalezen značný rozdíl ve výtěžnosti s vyšší výtěžností u vzorků čerstvá 2.

Tabulka 7 Výtěžnost silic (ml/kg)

Bylina	Stav byliny	Objem silice (ml/kg)
Dobromysl obecná (<i>Origanum vulgare L.</i>)	čerstvá 1	0,2
	čerstvá 2	1,1
	sušená	3,2
	mražená	1,7
Řecké oregano (<i>Origanum heracleoticum L.</i>)	čerstvá 1	6,3
	čerstvá 2	9,5
	sušená	14,8
	mražená	8,2

5.4.2 Analýza silic

V Tabulkách 8 a 9 jsou zpracovány výsledky plynové chromatografie. Uvedeny jsou zde složky silic a jejich procentuelní zastoupení. Do Tabulky 8 bylo zaznamenáno složení silice dobromysli obecné, přičemž pro přehlednost byly vybrány pouze složky, které byly zastoupeny alespoň u dvou ze vzorků v množství nad 1 % či alespoň u jednoho vzorku v množství nad 2 %. V Tabulce 9 je zobrazeno složení silice řeckého oregana a zaznamenány jsou pouze látky, které byly alespoň u jednoho vzorku zastoupeny v množství nad 1 %. Kompletní výsledky složení silice bylin a retenční časy jsou uvedeny v Přílohách.

Tabulka 8 Složení silic dobromysli obecné

Sloučenina	Obsah (%)			
	čerstvé 1	čerstvé 2	sušené	mražené
Sabinen	-	-	4,30	3,49
β -Felandren	1,51	3,13	-	-
1-Okten-3-ol	0,23	2,67	3,09	3,32
β -Myrcen	0,95	1,57	-	1,92
Bicyclo[4.1.0]hept-2-ene, 3,7,7-trimethyl-	-	2,31	-	-
α -Terpinen	-	-	2,38	2,36
(E)- β -Ocimen	5,77	4,69	5,44	-
(Z)- β -Ocimen	6,86	-	-	5,41
α -Pinen	-	6,96	8,38	8,77
3-Karen	2,54	2,55	3,03	0,07
γ -Terpinen	12,20	14,77	16,40	15,47
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	0,33	1,23	1,71	0,80
Benzene, 1-methoxy-4-methyl-2-(1-methylethyl)-	5,38	5,63	3,36	3,59
Germacren D	10,16	25,47	24,44	29,18
Karyofylen	14,39	5,53	5,07	3,86
α -Karyofylen	2,10	-	0,77	-
Kubebol	-	-	6,60	5,14
β -Kubeben	16,82	7,45	-	-
Cyclohexene, 1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4-hexenyl)-, (S)-	-	3,63	-	-
β -Bisabolen	8,34	0,07	2,92	2,12

Rozdílné složení silic dobromysli obecné s různou posklizňovou úpravou lze pozorovat v Tabulce 8. Značné rozdíly nacházíme u vzorků čerstvá 1 a čerstvá 2. Zatímco u čerstvá 1 je nejvíce zastoupenou složkou β -kubeben, u čerstvá 2 je majoritní složkou germacren D. Germacren D je také hlavní složkou vzorku sušená a mražená. Další výrazné rozdíly v zastoupení složek u vzorku čerstvá 1 a čerstvá 2 lze sledovat u (Z)- β -ocimenu, α -pinenu, karyofylenu a β -bisabolenu. Nejmenší rozdíly ve složení silice byly zaznamenány mezi sušenými a mraženými vzorky.

Tabulka 9 Složení silic řeckého oregana

Sloučenina	Obsah (%)			
	čerstvé 1	čerstvé 2	sušené	mražené
Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	1,27	-	-	1,76
Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, didehydro deriv.	-	1,35	1,42	-
Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	-	-	-	1,23
β -Felandren	-	1,05	-	-
β -Myrcen	1,47	1,55	1,73	1,92
Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	1,20	1,50	0,09	0,08
1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	-	-	1,70	-
Bicyclo[4.1.0]hept-2-ene, 3,7,7-trimethyl-	-	-	-	1,93
(E)- β -Ocimen	4,61	-	4,21	4,36
(Z)- β -Ocimen	-	5,28	-	-
1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)-	0,97	0,95	1,41	1,70
γ -Terpinen	6,21	7,91	9,33	9,73
Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-	0,97	0,97	-	1,03
Fenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-	-	1,48	-	7,19
Karvakrol	73,09	68,26	67,92	59,66
Karyofylen	1,00	1,48	1,46	1,24

V Tabulce 9 lze u většiny složek sledovat pouze mírné procentuelní změny mezi jednotlivými vzorky. Hlavní složkou všech silic je karvakrol, který je nejvíce obsažen ve vzorku čerstvá 1. Již po jednom dni uchování byliny v chladicím zařízení (vzorek čerstvá 2) lze sledovat pokles karvakrolu. Nejnižší obsah této složky byl zjištěn u byliny mražené. Druhou majoritní složkou silic všech vzorků je γ -terpinen. Tato složka je na rozdíl od karvakrolu nejvíce obsažena v mraženém vzorku a nejméně je zastoupena ve vzorku čerstvá 1. (E)- β -ocimen je součástí silice čerstvá 1, sušená a mražená, zatímco u čerstvá 2 je v obdobném množství zastoupen (Z)- β -ocimen.

5.5 Vitamin C

Prostřednictvím analýzy kapalinovým chromatografem nebylo u žádného ze vzorků zjištěno významné množství vitamínu C. U všech vzorků byl obsah vitamínu C do 8 mg/100 g byliny.

5.6 Statistické zhodnocení

Hodnocen byl celkový obsah fenolů a antioxidační aktivita čerstvých, sušených a mražených bylin stanovena metodou DPPH. Vypovídající jsou především hodnoty vzorků přepočtené na sušinu, avšak pro porovnání s výsledky dalších studií byly statisticky posouzeny i hodnoty na 100 g byliny.

Výsledky statistického testování jsou uvedeny v Tabulce 10. U hodnot přepočtených na sušinu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v antioxidační aktivitě stanovených metodou DPPH ani v obsahu celkových fenolů čerstvých, sušených a mražených bylin. Statistický významný rozdíl byl nalezen u hodnot na 100 g bylin a to jak v antioxidační aktivitě, tak v obsahu celkových fenolů. Z toho důvodu byla provedena podrobnější analýza pomocí Scheffého metody a výsledky jsou zaznamenány v Tabulce 11.

Tabulka 10 Statistické porovnání DPPH a TPC čerstvých, sušených a mražených bylin

Proměnné	Hodnota p	
	DPPH	TPC
hodnoty na sušinu	0,6509	0,0731
hodnoty na bylinu	0,0339	0,0266

Z podrobnějšího statistického hodnocení vyplývá, že existuje statisticky významný rozdíl v antioxidační aktivitě stanovených metodou DPPH mezi čerstvými a sušenými bylinami a mezi sušenými a mraženými bylinami. U celkového obsahu fenolů byl zjištěn statistický významný rozdíl pouze mezi sušenými a mraženými bylinami.

Tabulka 11 Podrobné statistické porovnání čerstvých, sušených a mražených bylin (na 100 g byliny)

Proměnné	Hodnota p	
	DPPH	TPC
čerstvé x sušené	0,0498	0,0681
čerstvé x mražené	0,9998	0,4355
sušené x mražené	0,0493	0,0290

Zkoumána byla také korelační závislost mezi antioxidační aktivitou stanovenou metodou DPPH a celkovým obsahem fenolů. Při testování hodnot přepočtených na 100 g bylin byl zjištěn korelační koeficient $r = 0,83$ a existuje tedy silná korelační závislost mezi hodnotami DPPH a TPC. U hodnot přepočtených na sušinu byla určena slabá nepřímá závislost vzhledem ke korelačnímu koeficientu $r = -0,23$.

6 Diskuze

Všechny vzorky dobromysli obecné i řeckého oregana vykazovaly značnou antioxidační aktivitu měřenou metodou DPPH. Významná antioxidační aktivita těchto bylin byla zaznamenána v několika studiích (Chrprová et al., 2010; Ličina et al., 2013; Skotti et al., 2014).

Nejvyšší antioxidační aktivita byla stanovena u sušených vzorků, což může být ovlivněno několika faktory, přičemž podstatné je, že antioxidační aktivita je často přisuzována obsahu fenolů. Sušení může působit jako stresor, kdy je ochranným mechanismem bylin tvorba fenolických látek. Také rozrušení pletiv, ke kterému v průběhu sušení dochází, vede k uvolnění fenolických látek a tedy vyššímu obsahu těchto látek v extraktu, viz kapitola 3.3.3. Toto částečně potvrzují výsledky obsahu celkových fenolů, kdy byla zjištěna silná korelace mezi hodnotami TPC a DPPH, avšak pouze u výsledků přepočítaných na 100 g bylin. Významná korelace mezi celkovým obsahem fenolů a antioxidační aktivitou bylin byla prokázána v řadě studií (Ivanova et al., 2005; Wojdylo et al., 2007; Chrprová et al., 2010).

U mražených bylin (hodnoty na sušinu) byla zjištěna vyšší antioxidační aktivita oproti bylinám čerstvým. Důvodem by mohlo být poškození pletiv byliny následkem tvorby krystalů v průběhu mražení a následné uvolnění sekundárních metabolitů s lepším přístupem pro rozpouštědlo, jak zmiňují ve své práci Keinänen a Julkunen-Tiitto (1966). Nebyl však zjištěn statisticky významný rozdíl v antioxidační aktivitě mražených a čerstvých bylin. Výsledky studií zkoumajících vliv mražení na antioxidační aktivitu rostlin se výrazně liší. Například Tomsone a Kruma (2014) našli vyšší antioxidační aktivitu u mraženého libečku lékařského a křenu selského v porovnání se vzorky čerstvými, zatímco Ahmad-Qasem et al. (2012) zaznamenali pokles antioxidační aktivity olivovníku evropského vlivem mražení. Závěry těchto studií odpovídají tvrzení Chan et al. (2014), že účinek mražení na antioxidační aktivitu se u různých rostlin liší.

Při statistickém zhodnocení byl zjištěn statisticky významný rozdíl v antioxidační aktivitě stanovené metodou DPPH pouze u hodnot přepočtených na 100 g rostliny. Statisticky významně vyšší antioxidační aktivita byla prokázána u bylin sušených v porovnání s čerstvými a u sušených bylin ve srovnání s mraženými. Nalezený rozdíl mezi antioxidační aktivitou sušených a čerstvých bylin koresponduje s výsledky mnoha prací, které však uvádí statisticky významný rozdíl i po přepočtu na sušinu (Hossain et al., 2010; Kadlecová, 2014; Kouřimská et al., 2014). Hossain et al. ve své práci uvádí jako možnou příčinu nižší

antioxidační aktivity čerstvých bylin přítomnost aktivních enzymů, které mohou způsobit degradaci antioxidantů.

Antioxidační aktivita stanovená metodou DPPH byla ve všech případech vyšší u dobromysli obecné oproti řeckému oreganu. Jedni z autorů, kteří také zjistili vyšší antioxidační aktivitu u dobromysli obecné, jsou Chrpová et al. (2010). Ti ve své studii zaznamenali u dobromysli obecné antioxidační aktivitu metodou DPPH s hodnotou 209,1 mg AAE/g sušené byliny oproti řeckému oreganu, u kterého byla zjištěna hodnota 56,2 mg AAE/g sušené byliny.

Značný obsah celkových fenolů stanovený pomocí Folin-Ciocalteuova činidla byl stanoven u všech zkoumaných vzorků obou bylin. Významný obsah celkových fenolů byl u dobromysli obecné a řeckého oregana také zaznamenán v mnoha studiích (Ivanova et al., 2005; Skotti et al., 2014). Nejnižší množství fenolů obsahovaly byliny mražené a to i po přepočtu na sušinu. Statistický významný rozdíl v obsahu fenolů byl však zjištěn pouze mezi sušenými a mraženými bylinami u hodnot přepočtených na 100 g byliny, kdy byl významně vyšší obsah fenolů stanoven u sušených bylin. Tento výsledek koresponduje se závěry studie Ahmad-Qasem el al. (2012), kdy byl nalezen nižší obsah fenolů mraženého vzorku olivovníku evropského oproti sušenému vzorku. Autoři této studie uvádí jako možný důvod nižšího obsahu fenolů u mraženého vzorku dočasnou inaktivaci enzymů v průběhu mražení, kdy při rozmrazování a extrakci může docházet k degradaci fenolů v důsledku opětovné aktivace enzymů.

Nejvyšší obsah celkových fenolů byl kromě dobromysli obecné přepočtené na sušinu stanoven u vzorků sušených. Tento fakt odpovídá již zmíněným vlivům, ke kterým v průběhu sušení dochází, viz kapitola 3.3.3 a také řada autorů prokázala u sušených bylin vyšší obsah fenolů oproti bylinám čerstvým (Hossain et al., 2010; Kouřimská et al., 2014).

Při porovnání celkového obsahu fenolů čerstvých a sušených bylin nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. Ke stejnému výsledku došla i Kadlecová (2014) u první sklizně bylin, která dobou sklizně odpovídá sklizni bylin zkoumaných v této práci.

V rámci výtěžnosti esenciálního oleje byl výrazně vyšší obsah esenciálního oleje stanoven u řeckého oregana. Také Baranauskiene et al. (2013) našli vyšší výtěžnost u řeckého oregana ve srovnání s dobromyslí obecnou a to u všech vzorků s různou dobou sklizně.

Hlavními složkami silic dobromysli obecné byly germacren D, γ -terpinen, karyofylen, α -pinen. Také Mockutė et al. (2004) a Şahin et al. (2004) určili majoritními složkami silice dobromysli obecné germacren D a karyofylen. V souladu se zastoupením γ -terpinenu jako

majoritní složky jsou výsedky analýzy Ličina et al. (2013). Další studie zabývající se tímto tématem stanovily odlišné hlavní složky, např. Kouřimská et al. (2014) identifikovali nejvyšší procentuelní zastoupení β -felandrenu a (E)- β -ocimenu. Rozdílné složení silic a jejich obsah v bylinách je ovlivněn mnoha faktory, ke kterým patří podmínky pěstování, přírodní podmínky, doba sklizně, způsob extrakce, aj. Vliv těchto faktorů byl potvrzen v řadě studií (De Falco et al., 2013; Tibaldi et al., 2011; Ozkazan et al., 2010; Kawase et al., 2013).

Složky kubebol, sabinen, α -terpinen byly obsaženy pouze v silici sušené a mražené dobromysli obecné, zatímco u vzorku čerstvá 1 a čerstvá 2 se vyskytovaly β -kubeben, β -felandren. Kvantitativní i kvalitativní rozdíly ve složení silic byly zaznamenány také mezi vzorky čerstvá 1 a čerstvá 2. Z těchto výsledků je patrné, že v rámci různých posklizňových úprav dochází ke změnám složení a množství určitých složek silice. To koresponduje se studií Novák et al. (2011), ve které byla zaznamenána změna složení silice řeckého oregana působením různých typů sušení. Najafian (2014) pozoroval rozdílné zastoupení složek silice meduňky lékařské důsledkem skladování byliny v mrazáku, lednici a při pokojové teplotě. Nejmenší změny ve složení silice byly nalezeny při uchování byliny v mrazáku a lednici oproti skladování při pokojové teplotě.

U silic řeckého oregana byl hlavní složkou identifikován karvakrol (59,66-73,09 %), následovaný γ -terpinenem (6,21-9,73 %). Také Zheng et al. (2009) a Stefanakis et al. (2013) uvedli tyto látky mezi majoritními. Obdobně jako u dobromysli obecné byly zjištěny rozdíly ve složení silic s různou posklizňovou úpravou. Nejvyšší množství karvakrolu bylo obsaženo v silici vzorku čerstvá 1, naopak nejnižší množství bylo zaznamenáno u vzorku mraženého. Snížení zastoupení karvakrolu bylo vždy spojeno se zvýšením obsahu prekurzoru karvakrolu γ -terpinenu. Tento jev potvrdili ve své práci Novák et al. (2013). Lze předpokládat, že v průběhu rozmrazování by mohlo docházet k degradaci karvakrolu důsledkem opětovného aktivování enzymů. Značné zastoupení karvakrolu v silici řeckého oregana se podílí na jeho antioxidační aktivitě.

Obsah vitamínu C byl u všech vzorků nízký a to do 8 mg/100 g byliny. Nízký obsah vitamínu C také zaznamenali Baranauskienė et al. (2013) u bylin v počátečním stádiu vegetace. U dobromysli obecné bylo stanoveno množství vitamínu C na 4,6 mg/100 g čerstvé byliny a u řeckého oregano bylo toto množství 3,8 mg/100 g čerstvé byliny. Capecka et al. (2004) pozorovali snížení vitamínu C u dobromysli obecné působením sušení, kdy došlo k poklesu z 23,1 mg/100 g čerstvé byliny na 4,2 mg/100 g čerstvé byliny.

7 Závěr

U vybraných bylin rodu *Origanum* dobromysli obecné (*Origanum vulgare* L.) a řeckého oregana (*Origanum heracleoticum* L.) byla hodnocena antioxidační aktivita stanovená metodou DPPH, celkový obsah fenolů, výtěžnost a složení silic a obsah vitamínu C. Bylo dosaženo těchto výsledků:

1. Metodou DPPH byl u čerstvých, sušených i mražených bylin zjištěn značný potenciál zhaset volný radikál DPPH. Statisticky významně vyšší antioxidační aktivita byla nalezena u bylin sušených oproti bylinám čerstvým a mraženým, avšak pouze u hodnot přepočtených na 100 g bylin. Po přepočtení na sušinu není rozdíl statisticky významný. Mezi čerstvými a mraženými bylinami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl.
2. Obsah celkových fenolů byl významně vyšší u sušených bylin oproti mraženým u hodnot odpovídající 100 g byliny. Silná korelační závislost mezi výsledky DPPH a TPC byla určena pouze u hodnot přepočtených 100 g byliny.
3. Působením posklizňových úprav dochází ke změnám ve složení silic. Již po jednom dni uchování bylin v lednici se projeví rozdíly v zastoupení složek silic. Antioxidační aktivita řeckého oregana je dána také složením silice, která obsahuje významné množství karvakrolu.
4. Obsahu vitamínu C byl u čerstvých, sušených i mražených bylin do 8 mg/100 g byliny.

Stanovená hypotéza, že antioxidační aktivita a složení silic vybraných bylin rodu *Origanum* a jejich extraktů jsou ovlivněny způsobem posklizňové úpravy bylin, byla částečně potvrzena. Dílčí hypotéza, že antioxidační aktivita sušených bylin je vyšší než antioxidační aktivita bylin čerstvých a mražených byla potvrzena u hodnot přepočtených na 100 g byliny.

8 Seznam literatury

- Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M. 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46 (5). 1739-1745.
- Ahmad-Qasem, M. H., Barrajon-Catalan, E., Micol, V., Mulet, A., Garcia-Perez, J. V. 2013. Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. *Food Research International*. 50 (1). 189-196.
- Asensio, C. M., Grosso, N. R., Juliani, H. R. 2015. Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum* spp.) Essential oils from Central and Southern Argentina. *Industrial Crops and Products*. 63. 203-213.
- Baranauskienė, R., Venskutonis, P. R., Dambrauskienė, E., Viškelis, P. 2013. Harvesting time influences the yield and oil composition of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* and ssp. *hirtum*. *Industrial Crops and Products*. 49. 43-51.
- Benna, Kumar, D., Rawat, D. S. 2013. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorganic*. 23 (3). 641-645.
- Capecka, E., Mareczek, A., Leja, M. 2004. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. *Food Chemistry*. 93 (2). 223-226.
- Carmo, E. S., Lima, E. D. O., Souza, E. L. D. 2008. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39 (2). 362-367.
- Circella, G., Franz, C., Novak, J., Resch, H. 1995. Influence of day length and leaf insertion on the composition of marjoram essential oil. *Flavour and fragrance journal*. 10 (6). 371-374.
- Conforti, F., Marrelli, M., Menichini, F., Tundis, R., Statti, G. A., Solimene, U., Menichini, F. 2011. Chemical composition and protective effect of oregano (*Origanum heracleoticum* L.) ethanolic extract on oxidative damage and on inhibition of NO in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 26 (3). 404-411.

- Crocoll, C., Asbach, J., Novak, J., Gershenzon, J., Degenhardt, J. 2010. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant molecular biology*. 73 (6). 587-603.
- De Falco, E., Mancini, E., Roscigno, G., Mignola, E., Tagliatela-Scafati, O., Senatore, F. 2013. Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* L. under Different Growth Conditions. *Molecules*. 18 (12). 14948-14960.
- De Martino, L., De Feo, V., Formisano, C., Mignola, E., Senatore, F. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart growing wild in Campania (Southern Italy). *Molecules*. 14 (8). 2735-2746.
- Derwich, E., Benziane, Z., Manar, A., Boukir, A., Taouil, R. 2010. Phytochemical analysis and *in vitro* antibacterial activity of essential oil of *Origanum vulgare* from Morocco. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*. 5 (2). 120-129.
- Díaz-Maroto, M., Pérez-Coello, M., Cabezudo, M. 2002. Effect of different drying methods on the volatile components of parsley (*Petroselinum crispum* L.). *European Food Research and Technology*. 215 (3). 227-230.
- Dixon, R. A., Paiva, N. L. (1995). Stress induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*. 7 (7). 1085–1097.
- Figiel, A., Szumny, A., Gutiérrez-Ortíz, A., Carbonell-Barrachina, Á. A. 2010. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. *Journal of Food Engineering*. 98 (2). 240-247.
- Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., Chatzopoulou, P. S. 2010. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *International journal of food microbiology*, 137 (2). 175-180.
- Graßmann, J. 2005. Terpenoids as plant antioxidants. *Vitamins & Hormones* 72. 505-535.
- Hossain, M. B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., Brunton, N. P. 2010. Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*. 123 (1). 85-91.

- Chakraborty, R., Bera, M., Mukhopadhyay, P., Bhattacharya, P. 2011. Prediction of optimal conditions of infrared assisted freeze-drying of aloe vera (*Aloe barbadensis*) using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*. 80 (2). 375-384.
- Chan, E. W. C., Kong, L. Q., Yee, K. Y., Chua, W. Y., Loo, T. Y. 2012. Antioxidant and antibacterial properties of some fresh and dried Labiatae herbs. *Free Radicals and Antioxidants*. 2 (3). 20-27.
- Chan, E. W. C., Tan, Y. P., Chin, S. J., Gan, L. Y., Kang, K. X., Fong, C. H., Chang, H. Q., How, Y. C. 2014. Antioxidant properties of selected fresh and processed herbs and vegetables. *Free Radicals and Antioxidants*. 4 (1). 39-46.
- Charles, D. J. 2013. *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*. Springer. New York. ISBN: 978-146-1443-094.
- Chen, J. H., Ho, C. T. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45 (7). 2374-2378.
- Chohan, M., Forster-Wilkins, G., Opara, E. I. 2008. Determination of the antioxidant capacity of culinary herbs subjected to various cooking and storage processes using the ABTS* radical cation assay. *Plant foods for human nutrition*. 63 (2). 47-52.
- Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G. J., Haroutounian, S. A. 2004. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (26). 8261-8267.
- Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G. 2007. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 C. *Food Microbiology*. 24 (6). 607-617.
- Chrprová, D., Kouřimská, L., Gordon M. H., Heřmánková, V., Roubíčková, O., Pánek, J. 2010. Antioxidant Activity of Selected Phenol and Herbs Used in Diets for Medical Condition. *Czech Journal of Food science*. 28 (4). 317 – 325.

- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., Yankova, T. 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 96 (1). 145-150.
- Jałoszynski, K., Figiel, A., Wojdyło, A. 2008. Drying kinetics and antioxidant activity of oregano. *Acta Agroph.* 11 (1). 81–90.
- Kadlecová, B. 2014. Porovnávání antioxidační aktivity čerstvých a sušených bylin. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. 80.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food chemistry*. 94 (4). 550-557.
- Kaurinovic, B., Popovic, M., Vlasisavljevic, S., Trivic, S. 2011. Antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. extracts. *Molecules*. 16 (9). 7401-7414.
- Kawase, K. Y. F., Mothé, C. G., Furtado, F. A., Vieira, G. L. 2013. Changes in essential oil of *Origanum vulgare* L. affected by different extraction methods. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*. 14 (2). 238-247.
- Keinänen, M., Julkunen-Tiitto, R. 1996. Effect of sample preparation method on birch (*Betula pendula* Roth) leaf phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 (9). 2724–2727.
- Kikuzaki, H., Nakatani, N. 1989. Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Origanum vulgare* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*. 53 (2). 519-524.
- Kintzios, S. E. 2002. *Oregano the Genera Origanum and Lippia*. CRC Press. London. ISBN: 02-032-2209-1.
- Koukoulitsa, C., Karioti, A., Bergonzi, M. C., Pescitelli, G., Di Bari, L., Skaltsa, H. 2006. Polar constituents from the aerial parts of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* growing wild in Greece. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54 (15). 5388-5392.
- Kouřimská, L., Sabolová, M., Dvořáková, B., Roubíčková, I., Pánek, J., Nový, P. 2014. Antioxidant activity of Lamiaceae herbs grown under organic and conventional farming. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 45 (1). 19-25.

- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food chemistry*. 85 (4). 633-640.
- Ličina, B. Z., Stefanovic, O. D., Vasic, S. M., Radojevic, I. D., Dekic, M. S., Čomić, L. R. 2013. Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L.. *Food kontrol*. 33 (2). 498-504.
- Milos, M., Mastelic, J., & Jerkovic, I. 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Food Chemistry*. 71 (1). 79-83.
- Ministerstvo zdravotnictví ČR (2009). Český lékopis, Grada, Praha, 3968 s. ISBN: 9788024729947.
- Mockutė, D., Bernotienė, G., & Judžentienė, A. 2004. Chemical composition of essential oils of *Origanum vulgare* L. growing in Lithuania. *Biologija*. 4. 44-49.
- Najafian, S. 2014. Storage conditions affect the essential oil composition of cultivated Balm Mint Herb (*Lamiaceae*) in Iran. *Industrial Crops and Products*. 52. 575-581.
- Novák, I., Sipos, L., Kókai, Z., Szabó, K., Pluhár, Z., Sárosi, S. 2011. Effect of the drying method on the composition of *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* essential oil analysed by GC-MS and sensory profile method. *Acta Alimentaria*. 40. 130-138.
- Ozkan, G., Baydar, H., Erbas, S. 2010. The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90 (2). 205-209.
- Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A. J. M., Garrigós, M. D. C. 2014. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT – Food Science and Technology*. 58 (2). 470-477.
- Rao, G. V., Mukhopadhyay, T., Annamalai, T., Radhakrishnan, N., Sahoo, M. R. 2011. Chemical constituents and biological studies of *Origanum vulgare* Linn. *Pharmacognosy research*. 3 (2). 143.
- Rodríguez-Meizoso, I., Marin, F. R., Herrero, M., Señorans, F. J., Reglero, G., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. 2006. Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity

from oregano. Chemical and functional characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41 (5). 1560-1565.

Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Özer, H. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*. 15 (7). 549-557.

Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., Tarantilis, P. A. 2014. Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*. 53. 46-54.

Stamenic, M., Vulic, J., Djilas, S., Mistic, D., Tadic, V., Petrovic, S., Zizovic, I. 2014. Free-radical scavenging activity and antibacterial impact of Greek oregano isolates obtained by SFE. *Food chemistry*. 165. 307-315.

Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. E., Makridis, P. 2013. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control*. 34 (2). 539-546.

Škrovánková, S., Mišurcová, L., Machů, L. 2011. Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. *Advances in food and nutrition research*. 67. 75-139.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Maros, O. Neng, N. R., Nogueira, J. M. F, Saraiva, J. A., Nunes, M. L. 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93 (11). 2707-2714.

Tibaldi, G., Fontana, E., Nicola, S. 2011. Growing conditions and postharvest management can affect the essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. *Industrial Crops and Products*. 34 (3). 1516-1522.

Tomsone, L., Kruma, Z. Influence of freezing and drying on the phenol content and antioxidant activity of horseradish and lovage [online]. [cit. 2015-01-07]. FoodBalt conference papers. Dostupné z:

http://lufb.llu.lv/conference/foodbalt/2014/FoodBalt_Proceedings_2014-192-197.pdf

Tsimogiannis, D., Stavrakaki, M., Oreopoulou, V. 2006. Isolation and characterisation of antioxidant components from oregano (*Origanum heracleoticum*). International journal of food science & technology. 41 (s1). 39-48.

Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food chemistry. 105 (3). 940-949.

Zheng, Z. L., Tan, J. Y. W., Liu, H. Y., Zhou, X. H., Xiang, X. 2009. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture. 292 (3-4). 214-218.

9 Seznam použitých zkratek

AA	ascorbic acid (kyselina askorbová)
AAE	ascorbic acid equivalent (ekvivalent kyseliny askorbové)
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
BCB	β -Carotene Bleaching Test
CA	caffeic acid (kyselina kávová)
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
EQ	quercetin equivalent
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GA	gallic acid (kyselina gallová)
GAE	gallic acid equivalent (ekvivalent kyseliny gallové)
GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry (plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
IC ₅₀	inhibiční koncentrace, která způsobí inhibici u 50 %
NIST	The National Institute of Standards and Technology
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
SD	směrodatná odchylka
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances (reaktivní sloučeniny kyseliny thiobarbiturové)
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant capacity
TPC	Total Phenolic Compounds (celkový obsah fenolů)
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8,-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina

10 Přílohy

Příloha 1 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice dobromysli obecné - čerstvá 1

Retenční čas	Obsah (%)	Složka
6,3956	0,28	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-
6,6155	0,15	1S-.alpha.-Pinene
7,9475	1,51	.beta.-Phellandrene
8,0533	0,11	.beta.-Pinene
8,1505	0,23	1-Octen-3-ol
8,3958	0,23	3-Octanone
8,5776	0,95	.beta.-Myrcene
8,7425	0,08	3-Octanol
9,0724	0,09	.alpha.-Phellandrene
9,5502	0,81	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
9,8843	5,77	(E)-β-Ocimene
10,0365	0,52	Cyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
10,1168	0,23	Eucalyptol
10,4594	6,86	(Z)-β-Ocimene
10,8611	2,54	3-Carene
11,3305	12,20	γ-Terpinen
12,5145	0,13	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
13,0515	0,33	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
13,2206	0,04	Nonanal
14,3159	0,47	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-
16,4302	0,19	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
17,0476	0,11	3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.4-trimethyl-
19,1408	0,05	Bicyclo[2.2.1]hept-2-ene, 1,7,7-trimethyl-
19,4579	5,38	Benzene, 1-methoxy-4-methyl-2-(1-methylethyl)-
19,682	0,06	Benzene, 1-methoxy-4-methyl-2-(1-methylethyl)-
19,9484	0,05	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, formate
21,3312	0,42	Benzoic acid, 4-nitroso-, ethyl ester
21,8428	0,06	3-Methyl-4-isopropylphenol
22,1219	0,05	7-(1,3-Dimethylbuta-1,3-dienyl)-1,6,6-trimethyl-3,8-dioxatricyclo[5.1.0.0(2,4)]octane
22,308	10,16	Germacrene D
23,4793	0,13	1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cyclohexene
25,1327	0,10	Copaene
25,5175	0,46	Cyclobuta[1,2:3,4]dicyclopentene, decahydro-3a-methyl-6-methylene-1-(1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha.,3a.alpha.,3b.beta.,6a.beta.,6b.alpha.)]-
25,8601	0,62	Naphthalene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,8a-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,7.alpha.,8a.alpha.)]-
27,0399	14,39	Caryophyllene
27,3781	0,55	1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropano[1,2]benzene, octahydro-7-methyl-3-methylene-4-(1-methylethyl)-, [3aS-(3a.alpha.,3b.beta.,4.beta.,7.alpha.,7aS*)]-
27,6868	0,14	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)-

Pokračování Přílohy 1

Retenční čas	Obsah (%)	Složka
28,0082	0,09	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)-
28,393	2,10	α -Caryophyllene
28,6721	0,11	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]-
29,632	16,82	β -Cubebene
30,1902	1,63	Bicyclgermacrene
30,3551	0,34	Isoledene
30,7906	8,34	β -Bisabolene
31,3277	1,12	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-
32,1354	0,09	cis-.alpha.-Bisabolene
33,4674	0,27	1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.alpha.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]-
33,6281	0,48	Caryophyllene oxide
36,1272	0,71	.tau.-Cadinol
36,6685	1,15	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-
37,937	0,28	1R,3Z,9s-4,11,11-Trimethyl-8-methylenebicyclo[7.2.0]undec-3-ene

Příloha 2 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice dobromysli obecné - čerstvá 2

Retenční čas	Obsah (%)	Složka
4,2263	0,02	2-Butenoic acid, 3-methyl-, methyl ester
4,4124	0,03	2-Hexenal, (E)-
4,4758	0,09	3-Hexen-1-ol
4,7549	0,02	1-Hexanol
5,2031	0,02	3-Heptanone
6,2772	0,01	2-Butenoic acid, 3-methyl-, ethyl ester
6,4041	0,86	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-
6,6197	0,42	1R-.alpha.-Pinene
7,1018	0,05	Camphene
7,9771	3,13	β -Phellandrene
8,0744	0,23	Cyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
8,2477	2,67	1-Octen-3-ol
8,4423	0,76	3-Octanone
8,6156	1,57	.beta.-Myrcene
8,7763	0,48	3-Octanol
9,0892	0,23	.alpha.-Phellandrene
9,1992	0,05	3-Hexen-1-ol, acetate, (Z)-
9,3091	0,06	Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl-, (1S)-
9,584	2,31	Bicyclo[4.1.0]hept-2-ene, 3,7,7-trimethyl-
9,9392	4,69	(E)- β -Ocimene
10,0703	0,73	Cyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
10,1464	0,70	Eucalyptol
10,5481	6,96	α -Pinen
10,6834	0,04	Benzeneacetaldehyde
10,9202	2,55	3-Carene
11,4869	14,77	γ -Terpinen
11,6687	0,15	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-
11,8802	0,06	2-Furanmethanol, 5-ethenyltetrahydro-.alpha.,.alpha.,5-trimethyl-, trans-
12,2227	0,13	1-Nonen-3-ol
12,5356	0,15	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
12,9627	0,10	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-
13,1107	1,23	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
13,2418	0,12	Nonanal
13,9733	0,04	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-
14,3328	0,56	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-
15,9354	0,10	Borneol
16,0031	0,05	Cycloheptane, 1,3-dichloro-, trans-
16,2483	0,03	1-Nonanol
16,4513	0,52	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
16,6585	0,03	1-Nonen-3-ol
16,9207	0,02	Butanoic acid, 3-hexenyl ester, (E)-
17,0687	0,44	3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.4-trimethyl-

Pokračování Přílohy 2

Retenční čas	Obsah (%)	Složka
17,3182	0,07	Cyclohexanone, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, trans-
17,6396	0,05	Cyclohexanone, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, trans-
17,7368	0,09	Cyclopentylcyclohexane
17,9313	0,01	2,6-Dimethyl-3,5,7-octatriene-2-ol, ,E,E-
19,0392	0,01	Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-
19,534	5,63	Benzene, 1-methoxy-4-methyl-2-(1-methylethyl)-
19,72	0,19	1,4-Dimethoxy-2,3-dimethylbenzene
19,8088	0,16	4-Isopropylbenzenethiol, S-methyl-
21,0478	0,03	Cyclodecane
21,3438	0,10	Benzoic acid, 4-nitroso-, ethyl ester
21,8724	0,12	3-Methyl-4-isopropylphenol
22,6124	25,47	Germacrene D
23,5089	0,21	Carvacrol
25,1496	0,08	Benzenemethanol, 4-(1-methylethyl)-
25,5429	0,14	Cyclobuta[1,2:3,4]dicyclopentene, decahydro-3a-methyl-6-methylene-1-(1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha.,3a.alpha.,3b.beta.,6a.beta.,6b.alpha.)]-
25,8854	0,22	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-
27,0779	5,53	Caryophyllene
27,395	0,22	1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropa[1,2]benzene, octahydro-7-methyl-3-methylene-4-(1-methylethyl)-, [3aS-(3a.alpha.,3b.beta.,4.beta.,7.alpha.,7aS*)]-
27,7037	0,08	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)-
28,0208	0,05	1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [s-(E,E)]-
28,4099	0,87	1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z-
28,6848	0,05	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]-
29,6785	7,45	β -Cubebene
30,2071	0,84	Bicyclogermacrene
30,8202	3,63	Cyclohexene, 1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4-hexenyl)-, (S)-
31,3446	0,41	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-
32,148	0,07	β -Bisabolene
33,4377	0,32	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)-
33,6322	0,27	Caryophyllene oxide
36,1441	0,09	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-
36,6726	0,26	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-
37,9751	0,10	3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,4-dimethyl-.alpha.-(4-methyl-3-pentenyl)-, [R-(R*,R*)]-

Příloha 3 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice dobromysli obecné - sušená

Retenční čas	Obsah (%)	Složka
4,2263	0,03	2-Butenoic acid, 3-methyl-, methyl ester
4,4082	0,26	2-Hexenal, (E)-
5,1989	0,02	3-Heptanone
5,8417	0,02	3-Pentanol, 2,2-dimethyl-
6,3956	1,10	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-
6,6155	0,56	1R-.alpha.-Pinene
7,0934	0,08	Bicyclo[2.2.1]heptane, 2,2-dimethyl-3-methylene-, (1S)-
7,9645	4,30	Sabinene
8,0617	0,28	.beta.-Pinene
8,2055	3,09	1-Octen-3-ol
8,4127	0,54	3-Octanone
8,5903	1,80	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
8,7552	0,49	3-Octanol
9,0766	0,26	.alpha.-Phellandrene
9,3049	0,09	3-Carene
9,5629	2,38	α -Terpinen
9,9012	5,44	(E)- β -Ocimene
10,0492	0,79	Cyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
10,1253	0,69	Eucalyptol
10,4974	8,38	α -Pinen
10,6581	0,04	Benzeneacetaldehyde
10,8822	3,03	3-Carene
11,3939	16,40	γ -Terpinen
11,6349	0,11	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.alpha.,5.alpha.)-
11,8548	0,05	cis-Linaloloxide
12,21	0,11	1-Nonen-3-ol
12,5187	0,16	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
12,9458	0,10	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-
13,0853	1,71	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
13,2291	0,10	Nonanal
13,9564	0,04	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-
14,3201	0,61	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-
15,927	0,12	Borneol
16,4386	0,49	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
17,056	0,39	3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.,4-trimethyl-, (S)-
17,3098	0,07	Cyclohexanone, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, trans-
17,6269	0,05	Cyclohexanone, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, trans-
17,7284	0,03	Decanal
19,4621	3,36	Benzene, 1-methoxy-4-methyl-2-(1-methylethyl)-
19,6905	0,06	Phenol, 4-methoxy-2,3,6-trimethyl-

Pokračování Přílohy 3

Retenční čas	Obsah (%)	Složka
21,3354	0,11	2,4-Dimethoxyphenyl isocyanate
21,8513	0,09	3-Methyl-4-isopropylphenol
22,4433	24,44	Germacrene D
23,4878	0,09	Carvacrol
25,0862	0,10	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-
25,526	0,14	Cyclobuta[1,2:3,4]dicyclopentene, decahydro-3a-methyl-6-methylene-1-(1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha.,3a.alpha.,3b.beta.,6a.beta.,6b.alpha.)]-
25,8643	0,19	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,2.beta.,4.beta.)]-
27,0145	5,07	Caryophyllene
27,3824	0,14	1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropana[1,2]benzene, octahydro-7-methyl-3-methylene-4-(1-methylethyl)-, [3aS-(3a.alpha.,3b.beta.,4.beta.,7.alpha.,7aS*)]-
28,3888	0,77	.alpha.-Caryophyllene
28,6679	0,03	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]-
29,4206	0,05	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)-
29,6024	6,60	Cubebol
30,1859	0,44	Bicyclogermacrene
30,3593	0,06	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)-
30,7737	2,92	β -Bisabolene
31,3277	0,44	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-
33,4293	0,18	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)-
33,6281	0,41	Caryophyllene oxide
36,66	0,12	.tau.-Muurolol

Příloha 4 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice dobromysli obecné - mražená

Retenční čas	Obsah (%)	Složka
4,2432	0,06	Pentanol, 4-methyl-4-nitro-
4,4081	0,85	2-Hexenal, (E)-
4,7549	0,05	1-Hexanol
5,1989	0,03	3-Heptanone
5,8458	0,02	3-Pentanol, 2,2-dimethyl-
6,3998	1,25	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, didehydro deriv.
6,6155	0,60	1R-.alpha.-Pinene
7,0975	0,08	Camphene
7,9602	3,49	Sabinene
8,0617	0,26	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)-
8,2139	3,32	1-Octen-3-ol
8,4169	0,60	3-Octanone
8,5945	1,92	.beta.-Myrcene
8,7594	0,58	3-Octanol
9,0765	0,27	.alpha.-Phellandrene
9,3006	0,07	3-Carene
9,5671	2,36	α -Terpinen
9,9053	5,41	(Z)- β -Ocimene
10,0491	0,77	Cyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
10,1252	0,60	Eucalyptol
10,5016	8,77	α -Pinen
10,6623	0,06	Benzeneacetaldehyde
10,8821	2,85	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-
11,3981	15,47	γ -Terpinen
11,6349	0,12	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.alpha.,5.alpha.)-
11,8547	0,05	cis-Linaloloxide
12,2099	0,11	1-Nonen-3-ol
12,5186	0,15	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
12,9457	0,14	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-
13,0684	0,80	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
13,2248	0,09	Nonanal
13,9648	0,05	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-
14,32	0,65	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-
15,9312	0,09	Borneol
16,0072	0,04	1,3-Hexadiene, 2,5-dimethyl-
16,4428	0,61	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
17,0602	0,37	3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.,4-trimethyl-, (S)-
17,3139	0,06	Cyclohexanone, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, trans-
17,631	0,06	Cyclohexanone, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, trans-
17,7283	0,04	Decanal
19,4663	3,59	Benzene, 1-methoxy-4-methyl-2-(1-methylethyl)-

Pokračování Přílohy 4

Retenční čas	Obsah (%)	Složka
19,6946	0,17	Phenol, 4-methoxy-2,3,6-trimethyl-
21,3353	0,12	2H-1-Benzopyran, 3,4,4a,5,6,8a-hexahydro-2,5,5,8a-tetramethyl-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)-
21,8555	0,12	3-Methyl-4-isopropylphenol
22,4855	29,18	Germacrene D
23,4962	0,08	Phenol, 2,3,5,6-tetramethyl-
25,0862	0,10	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-
25,5301	0,11	Cyclobuta[1,2:3,4]dicyclopentene, decahydro-3a-methyl-6-methylene-1-(1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha.,3a.alpha.,3b.beta.,6a.beta.,6b.alpha.)]-
25,8684	0,16	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,2.beta.,4.beta.)]-
27,0059	3,86	Caryophyllene
27,3823	0,10	1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropana[1,2]benzene, octahydro-7-methyl-3-methylene-4-(1-methylethyl)-, [3aS-(3a.alpha.,3b.beta.,4.beta.,7.alpha.,7aS*)]-
28,3887	0,57	1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z-
29,5939	5,14	Cubebol
30,1859	0,35	Bicyclogermacrene
30,355	0,03	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)-
30,7694	2,12	β -Bisabolene
31,1458	0,05	.alpha.-Farnesene
31,3234	0,25	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-
33,4293	0,14	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)-
33,6238	0,18	Caryophyllene oxide
36,1229	0,03	.tau.-Cadinol
36,6472	0,19	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)-
38,0046	0,17	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-

Příloha 5 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice řeckého oregana - čerstvá 1

Retenční čas	Obsah (%)	Složka
4,4083	0,20	2-Hexenal, (E)-
4,4759	0,29	3-Hexen-1-ol, (Z)-
4,7508	0,05	1-Hexanol
5,8502	0,04	2,4-Hexadienal, (E,E)-
6,3957	1,27	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-
6,6114	0,53	1R-.alpha.-Pinene
7,0934	0,13	Camphene
7,9434	0,99	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
8,0534	0,15	.beta.-Pinene
8,1633	0,64	1-Octen-3-ol
8,4001	0,10	3-Octanone
8,5819	1,47	β -Myrcene
8,7511	0,04	3-Octanol
9,0724	0,18	.alpha.-Phellandrene
9,2924	0,07	Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl-, (1S)-
9,5503	1,20	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
9,8928	4,61	(E)- β -Ocimene
10,0366	0,36	Cyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
10,1212	0,06	Eucalyptol
10,4256	0,97	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)-
10,8485	0,35	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-
11,3179	6,21	γ -Terpinen
11,6266	0,48	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.alpha.,5.alpha.)-
12,5146	0,07	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
12,9544	0,63	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-
13,0516	0,31	3-Carene
14,316	0,05	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-
15,9355	0,42	Borneol
16,443	0,49	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
17,0604	0,09	3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.4-trimethyl-
17,3014	0,08	Cyclohexanone, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, trans-
19,4411	0,97	Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-
19,9147	0,10	2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, (S)-
21,8937	0,78	3-Methyl-4-isopropylphenol
22,7352	73,09	Carvacrol
24,3463	0,02	3-Methyl-4-isopropylphenol
26,9977	1,00	Caryophyllene
28,3973	0,11	1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z-
29,5517	0,39	1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [s-(E,E)]-
30,1861	0,19	1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cyclohexene
30,7569	0,52	Cyclohexene, 1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4-hexenyl)-, (S)-

Příloha 6 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice řeckého oregana - čerstvá 2

Retenční čas	Obsah (%)	Složka
4,4083	0,17	2-Hexenal, (E)-
4,4759	0,21	3-Hexen-1-ol, (Z)-
4,7508	0,04	Cyclopentane, methyl-
5,846	0,03	4-Octene-2,7-diol, 2,7-dimethyl-, Z-
6,3957	1,35	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, didehydro deriv.
6,6156	0,57	1R-.alpha.-Pinene
7,0935	0,14	Camphene
7,9477	1,05	.beta.-Phellandrene
8,0576	0,15	.beta.-Pinene
8,1633	0,78	1-Octen-3-ol
8,4001	0,13	3-Octanone
8,5819	1,55	β -Myrcene
8,7469	0,04	3-Octanol
9,0725	0,21	.alpha.-Phellandrene
9,2966	0,08	Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl-, (1S)-
9,5545	1,50	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
9,8928	5,28	(Z)- β -Ocimene
10,0408	0,39	Cyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
10,1212	0,07	Eucalyptol
10,4299	0,95	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)-
10,8485	0,33	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-
11,3263	7,91	γ -Terpinen
11,6223	0,61	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-
12,5146	0,08	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
13,0558	0,27	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
14,316	0,05	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-
15,9355	0,40	Borneol
16,443	0,45	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
17,0604	0,08	3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.4-trimethyl-
19,4411	0,97	Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-
19,8047	0,12	2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, (S)-
21,8852	1,48	Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-
22,6675	68,26	Carvacrol
23,5133	0,43	3-Methyl-4-isopropylphenol
26,9977	1,48	Caryophyllene
28,3973	0,17	1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z-
29,5517	0,74	1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [s-(E,E)]-
30,1818	0,30	Bicyclogermacrene
30,7569	0,93	Cyclohexene, 1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4-hexenyl)-, (S)-
31,3193	0,18	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-
32,1481	0,05	cis-.alpha.-Bisabolene

Příloha 7 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice řeckého oregana - sušená

Retenční čas	Obsah (%)	Složka
4,4082	0,08	2-Hexenal, (E)-
6,3956	1,42	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, didehydro deriv.
6,6155	0,66	1R-.alpha.-Pinene
7,0934	0,18	Camphene
7,9433	0,85	.beta.-Phellandrene
8,0575	0,16	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7,7-trimethyl-
8,1632	0,83	1-Octen-3-ol
8,4	0,14	3-Octanone
8,5861	1,73	β -Myrcene
8,7468	0,05	3-Octanol
9,0724	0,25	.alpha.-Phellandrene
9,2965	0,10	3-Carene
9,5544	1,70	1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-
9,8843	4,21	(E)- β -Ocimene
10,0365	0,41	Cyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
10,1168	0,07	Eucalyptol
10,4298	1,41	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)-
10,8484	0,64	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-
11,3347	9,33	γ -Terpinen
11,6265	0,71	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-
12,5145	0,09	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
13,0515	0,16	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
14,3159	0,08	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-
15,9312	0,45	Borneol
16,4429	0,38	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
17,0603	0,09	3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.4-trimethyl-
19,441	0,99	Benzene, 1-methoxy-4-methyl-2-(1-methylethyl)-
19,7962	0,09	2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, (S)-
21,8851	1,05	3-Methyl-4-isopropylphenol
22,6674	67,92	Carvacrol
24,4773	0,01	3-Methyl-4-isopropylphenol
25,1116	0,09	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-
26,9934	1,46	Caryophyllene
28,3973	0,19	1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z-
29,5517	0,44	1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [s-(E,E)]-
30,1775	0,17	Bicyclogermacrene
30,7568	0,93	Cyclohexene, 1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4-hexenyl)-, (S)-
31,3235	0,12	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-
32,1438	0,11	cis-.alpha.-Bisabolene
33,442	0,12	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)-
33,6238	0,13	Caryophyllene oxide

Příloha 8 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice řeckého oregana - mražená

Retenční čas	Obsah (%)	Složka
4,4083	0,19	2-Hexenal, (E)-
5,8376	0,02	3-Heptanol
6,4	1,76	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-
6,6156	0,77	1R-.alpha.-Pinene
7,0935	0,25	Camphene
7,9477	1,23	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
8,0576	0,19	Cyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
8,1633	0,86	1-Octen-3-ol
8,4044	0,13	3-Octanone
8,5862	1,92	β -Myrcene
8,7469	0,05	3-Octanol
9,0725	0,28	.alpha.-Phellandrene
9,2966	0,09	Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl-, (1S)-
9,5588	1,93	Bicyclo[4.1.0]hept-2-ene, 3,7,7-trimethyl-
9,8886	4,36	(E)- β -Ocimene
10,0366	0,47	Cyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
10,1212	0,07	Eucalyptol
10,4341	1,70	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)-
10,8527	0,84	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-
11,3432	9,73	γ -Terpinen
11,6266	0,62	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-
12,5146	0,08	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
13,0559	0,16	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
14,316	0,10	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-
15,9355	0,56	Borneol
16,443	0,32	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
17,0604	0,10	3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.4-trimethyl-
19,4411	1,08	Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-
19,7794	0,08	2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, (S)-
21,9149	7,19	Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-
22,6506	59,66	Carvacrol
23,4921	0,34	3-Methyl-4-isopropylphenol
25,1117	0,04	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-
26,9934	1,24	Caryophyllene
28,3973	0,15	1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z-
29,5475	0,37	1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [s-(E,E)]-
30,1818	0,19	1,5-Cyclodecadiene, 1,5-dimethyl-8-(1-methylethylidene)-, (E,E)-
30,7527	0,61	Cyclohexene, 1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4-hexenyl)-, (S)-
32,1439	0,06	cis-.alpha.-Bisabolene
33,4252	0,22	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)-

Seznam příloh

Příloha 1 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice dobromysli obecné - čerstvá 1	50
Příloha 2 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice dobromysli obecné - čerstvá 2	52
Příloha 3 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice dobromysli obecné - sušená.....	54
Příloha 4 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice dobromysli obecné - mražená.....	56
Příloha 5 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice řeckého oregana - čerstvá 1	58
Příloha 6 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice řeckého oregana - čerstvá 2	59
Příloha 7 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice řeckého oregana - sušená.....	60
Příloha 8 Kvantitativní a kvalitativní analýza silice řeckého oregana - mražená.....	61

Seznam tabulek

Tabulka 1 Antioxidační aktivita měřená metodou DPPH (Kouřimská et al., 2014)	17
Tabulka 2 Obsah celkových fenolů, antioxidační aktivita (DPPH) čerstvé a sušené dobromysli obecné na 100 g byliny (Jałoszynski et al., 2008)	20
Tabulka 3 Antioxidační aktivita měřena metodou DPPH a celkový obsah fenolů (Kadlecová, 2014)	22
Tabulka 4 Obsah sušiny bylin (%).....	31
Tabulka 5 Výsledky měření antioxidační aktivity bylin metodou DPPH	32
Tabulka 6 Výsledky stanovení celkového obsahu fenolů bylin	32
Tabulka 7 Výtěžnost silic (ml/kg)	33
Tabulka 8 Složení silic dobromysli obecné	34
Tabulka 9 Složení silic řeckého oregana	35
Tabulka 10 Statistické porovnání DPPH a TPC čerstvých, sušených a mražených bylin	36
Tabulka 11 Podrobné statistické porovnání čerstvých, sušených a mražených bylin (na 100 g byliny).....	37