VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY ROSTLINY GOTU KOLA
BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF THE GOTU KOLA PLANT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR
Michaela Šumberová

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR
Ing. Jana Zemanová, Ph.D.

BRNO 2021

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání bakalářské práce

Číslo práce:	FCH-BAK1700/2020	Akademický rok:	2020/21
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií		
Studentka:	**Michaela Šumberová**		
Studijní program:	Chemie a technologie potravin		
Studijní obor:	Potravinářská chemie		
Vedoucí práce:	**Ing. Jana Zemanová, Ph.D.**		

Název bakalářské práce:

Biologicky aktivní látky rostliny Gotu kola

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární rešerši na zadané téma:
– gotu kola a její hlavní biologicky aktivní látky, jejich diverzita s ohledem na různé části rostliny
– možnosti jejich využití s důrazem na potravinářské aplikace
– přehled metod pro stanovení hlavních účinných látek
2. Připravte alkoholové extrakty rostlinného materiálu a vhodnými metodami proveďte jejich charakterizaci.
3. Aplikované postupy vyhodnoťte.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Michaela Šumberová student(ka)	Ing. Jana Zemanová, Ph.D. vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá přípravou a charakterizací extraktu z rostliny pupečníku asijského neboli Gotu koly (*Centella asiatica).* Teoretická část pojednává o často analyzovaných skupinách biologicky aktivních látek v bylinách a také uvádí možné aplikace extraktu z pupečníku asijského v potravinářství. Rovněž podává přehled možných způsobů extrakce a analytických metod pro zhodnocení biologicky aktivních látek, které extrakt obsahuje.

V experimentální části byl připraven extrakt z čerstvé byliny pupečníku asijského macerací v ethanolu a následně analyzován třemi vybranými metodami. Celkový obsah fenolických látek extraktu byl stanoven Folin-Ciocalteuovým testem na 0,74 ± 0,08 $mg_{GAE} \cdot g^{-1}$. Pro zhodnocení antioxidační aktivity byl proveden test TEAC a antioxidační aktivita vzorku byla 289 ± 81 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Aromatické látky v extraktu byly idenfitikovány pomocí plynové chromatografie ve spojení s mikroextrakcí tuhou fází a hmotnostní spektrometrií. Hlavní obsaženou skupinou byly seskviterpenoidní uhlovodíky s nejvyšším obsahem β-farnesenu (33,28 %), β-karyofylenu (25,01 %) a α-humulenu (20,91 %).

ABSTRACT

The Bachelor thesis focuses on the preparation and characterization of the extract of Gotu kola (*Centella asiatica*). The theoretical part summarizes commonly analyzed groups of biologically active compounds of herbs and introduces potential applications of the extract in food industry. Moreover, an overview of possibly used extraction methods and analytical methods for the evaluation of biologically active compounds of the extract are presented.

As for the experiment, the extract of the fresh *Centella asiatica* herb was prepared by maceration in ethanol and then analyzed by three chosen methods. The total phenolic content of the extract analyzed by the Folin-Ciocalteu test was 0.74 ± 0.08 $mg_{GAE} \cdot g^{-1}$. As for the quantification of antioxidant activity, the TEAC test was performed and the antioxidant activity of the extract was 289 ± 81 $\mu g \cdot ml^{-1}$. The volatiles present in the extract were identified by gas-chromatography mass-spectrometry in combination with solid-phase micro-extraction. Sesquiterpenoid hydrocarbons were the most dominant group of the extract, in which β-farnesene (33.28 %), β-caryophyllene (25.01 %), and α-humulene (20.91 %) were the major compounds.

KLÍČOVÁ SLOVA

Centella asiatica, pupečník asijský, Gotu kola, macerace, fenolické látky, antioxidační aktivita, TPC, GAE, TEAC, HS-SPME-GC-MS

KEY WORDS

Centella asiatica, Gotu kola, maceration, phenolic compounds, antioxidant activity, TPC, GAE, TEAC, HS-SPME-GC-MS

ŠUMBEROVÁ, Michaela. *Biologicky aktivní látky rostliny Gotu kola.* Brno, 2021. Dostupné také z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131341. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jana Zemanová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat paní doc. Ing. Vítové, Ph.D. a paní Ing. Zemanové, Ph.D. za pomoc a komentáře k mé bakalářské práci. Rovněž děkuji své rodině za veškerou podporu během studia.

OBSAH

1 ÚVOD 7

2 TEORETICKÁ ČÁST 8

2.1 Gotu kola neboli pupečník asijský 8

2.2 Farmakologické účinky pupečníku asijského 8

2.3 Léčivé rostliny a biologicky aktivní látky 9

2.4 Biologicky aktivní látky pupečníku asijského 10

2.4.1 Terpeny a terpenoidy 10

2.4.1.1 Triterpenoidy 10

2.4.2 Esenciální oleje 12

2.4.2.1 Seskviterpeny 12

2.4.2.2 Monoterpeny 12

2.4.3 Fenolické látky 13

2.4.3.1 Vlastnosti fenolických látek a antioxidační aktivita 14

2.4.3.2 Fenolické látky v pupečníku asijském 15

2.5 Gotu kola v potravinářství 16

2.5.1 Gotu kola jako potravinový doplněk 16

2.5.2 Džus z Gotu koly a jeho senzorická kvalita 16

2.5.3 Extrakt Gotu koly v obalovém potravinářství 17

2.6 Přehled metod pro stanovení hlavních účinných látek 17

2.6.1 Metody izolace biologicky aktivních látek 18

2.6.1.1 Soxhletova extrakce 18

2.6.1.2 Macerace 19

2.6.1.3 Hydrodestilace v Clevengerově aparatuře 20

2.6.2 Metody měření antimikrobiální aktivity 21

2.6.2.1 Difuzní a diluční metoda 21

2.6.2.2 Antimikrobiální aktivita pupečníku asijského 22

2.6.3 Metody měření antioxidační aktivity 22

2.6.3.1 Antioxidační aktivita pupečníku asijského 23

2.6.4 Metody stanovení aromaticky aktivních látek 23

2.6.4.1 Mikroextrakce tuhou fází 23

2.6.4.2 Plynová chromatografie 24

2.6.4.3 Kapalinová chromatografie 24

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 25

3.1 Použité přístroje 25
3.2 Použité chemikálie 25
3.3 Analyzované vzorky 25
3.4 Použité metody 26
3.4.1 Folin-Ciocalteuova metoda – stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin 26
3.4.2 Metoda TEAC – stanovení antioxidační aktivity 26
3.4.3 Plynová chromatografie – stanovení aromatických látek 27
3.5 Statistické zpracování výsledků 28
4 VÝSLEDKY A DISKUZE 29
4.1 Celkový obsah fenolických látek v extraktu 29
4.2 Antioxidační aktivita extraktu 30
4.3 Aromatické látky v extraktu 32
5 ZÁVĚR 36
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ 37
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ 41
8 SEZNAM PŘÍLOH 43
9 PŘÍLOHY 44

1 ÚVOD

Bylinné materiály ve stravě člověka i v potravinářství hrají odjakživa významnou roli z hlediska nutričního i léčebného, a to i bez vědeckého přístupu nebo analýzy konkrétních materiálů. V poslední době se však zájem veřejnosti o vyváženou stravu, zdravý životní styl a senzorickou pestrost při konzumaci dostává i pod drobnohled vědeckého výzkumu v oblasti potravinářství a výrobě potravin.

Rostlina Gotu kola neboli pupečník asijský (*Centella asiatica*) patří mezi byliny, které jsou v lidovém lékařství používány od nepaměti. Přestože mnohé potravinářské produkty mluví o všestrannosti jejích účinků na lidský organismus, vědecké poznatky ohledně extraktů z této byliny jsou často neúplné a nepřehledné. Před samotnou aplikací biologického materiálu do potravinářského průmyslu je proto nutné provést jeho analýzu z hlediska jeho potenciálu pro praktické využití. Většina výzkumu rostliny pupečník asijský pochází z asijských zemí, kde se také rostlina vyskytuje v přírodě, méně studií se tomuto tématu věnuje v Evropě, přestože je rostlina často součástí domácností používajících byliny pro samoléčbu i u nás.

Teoretická část této práce se zaměřuje na vybrané významné skupiny biologicky aktivních látek pupečníku asijského a přehledně shrnuje důležité poznatky ve vědě o této rostlině, biologicky aktivních látkách a jejich blahodárných účincích na lidský organismus. Krátce se zmiňuje o možných aplikacích rostlinného extraktu do potravinářských produktů v průmyslu a potenciálu rostlinných materiálů v potravinářství i v nutričně vyvážené stravě člověka. Práce shrnuje možné metody extrakce bylinného materiálu a vhodný výběr rozpouštědla s ohledem na biologicky aktivní látky. Z hlediska analýzy práce uvádí přehled vhodných metod pro charakterizaci extraktu s ohledem na antioxidační a antimikrobiální aktivitu a také se zaměřením na objasnění jeho složení.

Praktická část se věnuje extrakci čerstvého rostlinného materiálu a jeho následné charakterizaci vybranými metodami, a to konkrétně stanovením celkových fenolických látek Folin-Ciocalteuovou metodou, stanovením antioxidační aktivity metodou TEAC a stanovením obsahu těkavých látek plynovou chromatografií ve spojení s headspace mikroextrakcí tuhou fází a hmotnostní spektrometrií (HS-SPME-GC-MS).

Práce má za cíl charakterizovat biologicky aktivní látky pupečníku asijského (*Centella asiatica*) vypěstovaného v domácích podmínkách z hlediska antioxidační aktivity a aromatického profilu se zaměřením na extrakt z této rostliny. Cílem je také posoudit jeho potenciál pro praktické využití.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Gotu kola neboli pupečník asijský

Pupečník asijský *(Centella asiatica*), nazývaný také Gotu kola, je popínavá rostlina patřící do čeledi miříkovité *(Apiaceae)*. Vyskytuje se převážně na vlhkých místech subtropických a tropických oblastí celého světa [1], především v jihovýchodní Asii, v Číně, na jihovýchodě severní Ameriky, v Mexiku, v jižní Americe, na jihu Afriky, na Madagaskaru, na Indickém poloostrově a Srí Lance [2].

S rostlinou se také můžeme setkat pod názvem brahmi. Jedná se buď o rostlinu samotnou, nebo o její směs s bakopou drobnolistou *(Bacopa monnieri*), která se používá k léčbě poruch paměti, únavy, deprese či úzkosti [1].

Pupečník asijský je hojně využívanou rostlinou v tradičním lidovém léčitelství ve východní Asii, a to hlavně kvůli svým blahodárným účinkům na lidský organismus – od léčby zánětů, žaludečních vředů, průjmů, astmatu a kožních onemocnění až po její antibakteriální, protinádorové a anxiolytické účinky, což znamená, že působí proti úzkostným stavům a depresím [1]. Rostlina má tradiční místo v ajurvédě, lidovém léčitelství v Indii, na Srí Lance, v africkém a čínském lidovém léčitelství a také v léčitelství domorodých Aboridžinců v Austrálii. V jižní Asii je také konzumována jako listová zelenina [3].

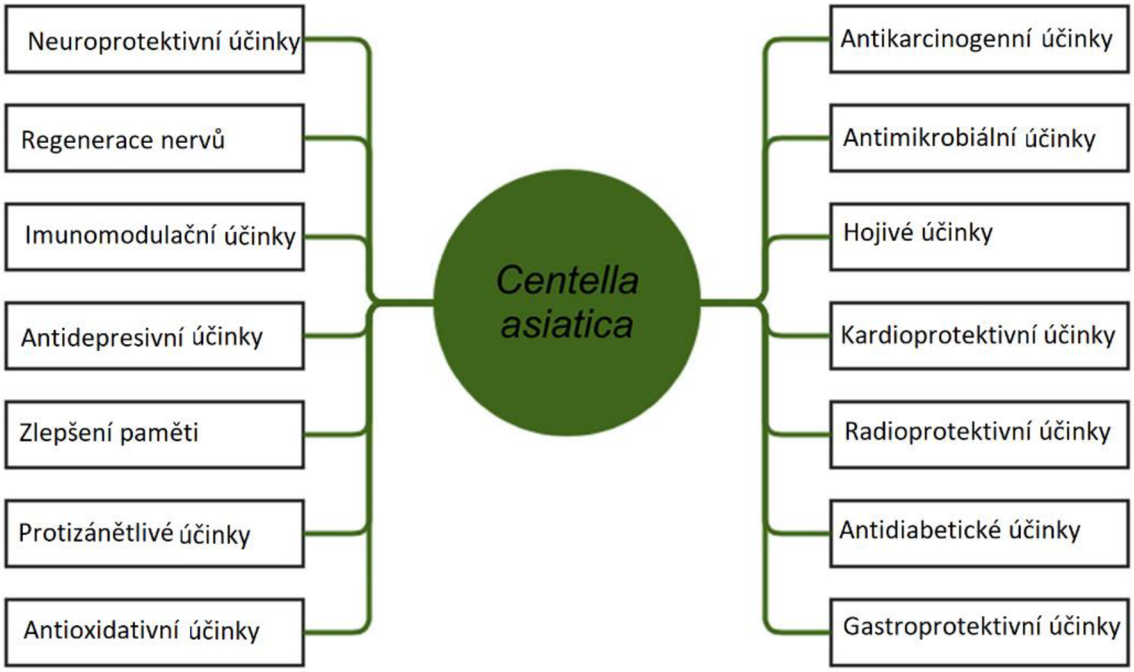
Rostlina disponuje také mnoha příznivými dermatologickými účinky. Díky přítomnosti mnoha bioaktivních látek může sloužit k léčbě kožních onemocnění, jako je například ekzém, a také k ošetření ran, odřenin, popálenin a jizev. Pro své mnohočetné blahodárné účinky je její extrakt často využíván v kosmetice. Často zmiňována je zde typická biologicky aktivní složka pupečníku asijského – triterpenoidy, které napomáhají vyšší tvorbě kolagenu v kůži [4].

V poslední době se její přirozený výskyt v přírodě výrazně snížil díky zvýšenému zájmu o tuto rostlinu a snaze využít ji jako bylinný materiál ve farmacii a v potravinářství. Z tohoto důvodu vznikla i studie, která se zajímá její produkcí *in vitro* pomocí mikropropagace a následnou charakterizací esenciálního oleje z těchto uměle pěstovaných rostlin [2].

2.2 Farmakologické účinky pupečníku asijského

Pupečník asijský obsahuje řadu biologicky aktivních látek antioxidačního, protizánětlivého a regeneračního charakteru. Některé sloučeniny pomáhají proti úzkostem a depresím, jiné jsou potenciálně zkoumány jako neuroprotektiva. Zkoumány jsou také pozitivní účinky pupečníku asijského na paměť v souvislosti s jeho možným využitím při léčbě Alzheimerovy choroby, stařecké demence a Parkinsonovy choroby [3].

V indické ajurvédě je pupečník asijský považován za všestranný lék proti různým mírným až chronickým onemocněním. Rozmanitost farmakologických účinků pupečníku asijského ilustruje následující schéma (viz. Obrázek 1) [3].



Obrázek 1 Farmakologické účinky pupečníku asijského – Centella asiatica (upraveno podle [3])

2.3 Léčivé rostliny a biologicky aktivní látky

Hlavními složkami léčivých rostlin jsou voda, organické a anorganické látky. Organické látky dělíme do skupin na primární metabolity, mezi které typicky patří sacharidy, aminokyseliny, bílkoviny, nukleové kyseliny, mastné kyseliny a lipidy, a sekundární metabolity (například alkaloidy, fytosteroly, saponiny, terpeny, vitaminy a éterické oleje) [5].

Jako biologicky aktivní látky se označují sekundární metabolity, které vykazují schopnost působit toxicky nebo příznivě na lidský nebo zvířecí organismus [6]. Léčivé rostliny jsou jejich důležitým zdrojem [7].

Sekundární metabolity samy o sobě nejsou důležité pro primární přežití rostliny (pro jejich syntézu je nutno mnohem více energie než pro syntézu primárních metabolitů), ale jejich tvorba je důležitá pro interakci rostliny s prostředím. Často jsou syntetizovány reakcí na stimulus prostředí, jako je například nutriční deficit nebo útok patogenů. Díky tvorbě těchto metabolitů dokáže rostlina interagovat se symbiotickými organismy a také s patogeny. Proto jsou tyto látky specifické pro každý druh rostliny. Sekundární metabolity jsou také vysoce závislé na podnebí. Mezi základní role sekundárních metabolitů patří ochranná funkce proti vnějším podmínkám (antioxidační působení proti volným radikálům a absorpce škodlivého ultrafialového záření) a proti škodlivým mikroorganismům (antimikrobiální funkce) [7].

Sekundární metabolity jsou také zodpovědné za aroma, barvu a chuť rostliny. Tento fakt je způsoben komunikací rostliny s ostatními organismy, například odrazení škůdce od krmení se na rostlině. Proto má většina fytochemikálií hořkou chuť, jejich látky často působí na nervový systém a mohou být až toxické. Na druhou stranu produkují rostliny také látky, kterými přitahují symbiotické organismy, což může být ve formě již zmíněné barvy a vůně [7].

Biologicky aktivní látky lze dělit na základě cesty jejich biosyntézy a strukturní podobnosti na tři hlavní kategorie: terpeny, alkaloidy a fenolické látky [7].

2.4 Biologicky aktivní látky pupečníku asijského

Existuje řada vědeckých studií, které se zabývají obsahem konkrétních biologicky aktivních látek pupečníku asijského. Podle souhrnné studie z roku 2018 Sabaragamuwa a kol. [3] četné výzkumy ukázaly, že tato rostlina obsahuje více než sedmdesát rozličných fytochemikálií. Hlavními skupinami jsou terpeny (nejvíce triterpeny a esenciální oleje), fenolické sloučeniny (flavonoidy a taniny), alkaloidy, sacharidy, vitaminy, minerály a aminokyseliny [3].

Chemické složení rostliny se může lišit podle původu a podmínek růstu, ale také podle extrakční a analytické metody, která byla použita v rámci zkoumání. Většina výzkumu této rostliny probíhá v asijských zemích (Čína, Indie, Indonésie, Malajsie, Srí Lanka), každá ze studií však ukazuje na odlišné složení biologicky aktivních látek na základě jejich původu. Tato skutečnost je definována pojmem chemotyp [3].

Následující kapitoly se budou zabývat jednotlivými kategoriemi biologicky aktivních látek obsažených v pupečníku asijském.

2.4.1 Terpeny a terpenoidy

Terpeny jsou obecně látky lipidové povahy s hlavní strukturní jednotkou isoprenu C_5H_8 (2-methylbuta-1,3-dien). Syntéza terpenů probíhá podle metabolické dráhy kyseliny mevalonové [7]. Terpeny jsou dále děleny podle počtu izoprenových pětiuhlíkatých jednotek na hemiterpeny (C_5), monoterpeny (C_{10}), seskviterpeny (C_{15}), diterpeny (C_{20}), sesterterpeny (C_{25}), triterpeny (C_{30}) a tetraterpeny (C_{40}), někdy nazývané jako skupina karotenoidů, a polyterpeny s větším počtem jednotek [3; 7].

Terpenoidy jsou deriváty terpenů. Tyto sloučeniny kromě typické terpenové struktury obsahují navíc další funkční skupiny, jedná se například o alkoholy, ketony nebo kyseliny [8].

2.4.1.1 Triterpenoidy

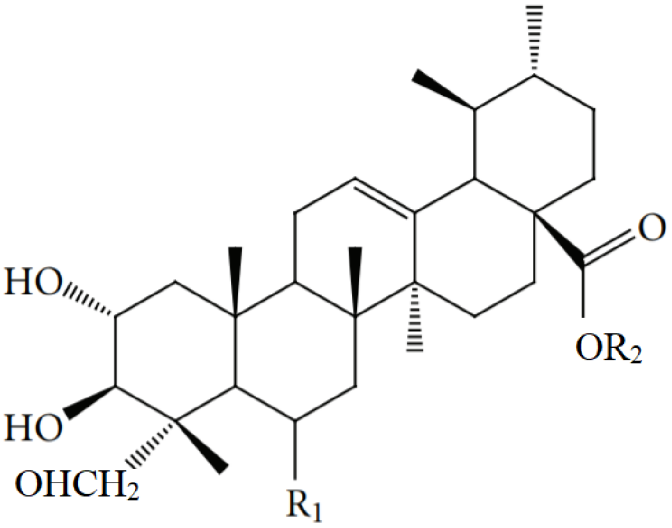
Mezi hlavní účinné látky izolované z pupečníku asijského patří triterpenoidy (s šesti izoprenovými jednotkami), které jsou i hlavním kritériem kvality rostlinné drogy. Přesněji se jedná o pentacyklické triterpeny a jejich saponiny oleanového a ursanového typu [2].

Saponiny jsou po chemické stránce glykosidy triterpenů nebo steroidů, kde jsou substituenty vázány k obvykle oligosacharidové jednotce cukru glykosidickou vazbou přes acetal. Jedná se o přírodní látky přítomné v rostlinách a jsou významné svou schopností inhibovat růst rakovinných buněk. Dělí se na jedenáct dalších tříd, mezi které patří mimo jiné i oleany a ursany [9].

Typickými triterpenoidy reprezentujícími hlavní farmakologické účinky rostliny jsou kyselina asiatová, kyselina madecassová a jejich glykosidy asiatikosid a madecassosid [3; 10].

Kyselina asiatová je nejvíce zodpovědná za syntézu kolagenu v lidských fibroblastech. Proto mohou extrakty z pupečníku asijského najít využití v kosmetických přípravcích, kde podporují elasticitu kůže stimulací tvorby kolagenu. Extrakty mohou také pozitivně ovlivňovat správný průběh mikrocirkulace krve u pacientů s žilní hypertenzí [10]. Asiatikosid je saponin této kyseliny, poprvé představen v roce 1949, a dodnes zůstává nejčastěji zkoumanou sloučeninou pocházející z pupečníku asijského [11].

Strukturu a hlavní fyzikální a chemické vlastnosti zmíněných sloučenin popisují následující obrázek a tabulka na další straně (viz. Obrázek 2 a Tabulka 1).



	R_1	R_2
Kyselina asiatová	H	H
Asiatikosid	H	glukóza-glukóza-rhamnóza
Kyselina madecassová	OH	H
Madecassosid	OH	glukóza-glukóza-rhamnóza

Obrázek 2 Základní triterpenoidy pupečníku asijského a jejich saponiny (upraveno podle [12]*)*

Tabulka 1 Hlavní triterpenoidní biologicky aktivní složky pupečníku asijského (CID – Compound ID knihovny PubChem, M – molární hmotnost)

sloučenina	**sumární vzorec**	**PubChem CID**	***M*** **(g·mol^{-1})**	**Zdroj**
kyselina asiatová	$C_{30}H_{48}O_5$	119034	488,7	[13]
asiatikosid	$C_{48}H_{78}O_{19}$	108062	959,1	[14]
kyselina madecassová (brahmová, 6-hydroxy-asiatová)	$C_{30}H_{48}O_6$	73412	504,7	[15]
madecassosid (asiatikosid A)	$C_{48}H_{78}O_{20}$	45356919	975,1	[16]

Kromě již zmíněných obsahuje pupečník další triterpenoidy jako například brahminosid, thankunisid, isothankunisid, centellosid, madasiatovou kyselinu, centovou kyselinu, cenellovou kyselinu, betulinovou kyselinu, indocentovou kyselinu a další [1].

Triterpenoidy vykazují antioxidační aktivitu, největší v extraktech v ethanolu. Triterpenoidy také stimulují lipolýzu, a tedy přispívají k hubnutí. Lipolytická aktivita byla zkoumána ve studii Hashima a kol. [10]. V porovnání s kofeinem pupečníkový extrakt vykazuje dokonce větší lipolytickou aktivitu už při nižší koncentraci. Ta samá studie také poprvé zaznamenala ochranný efekt extraktu proti ultrafialovému záření, což otevírá možnosti aplikace do přírodní kosmetiky jako součást opalovacích krémů. I absorpce UV (*ultraviolet, ultrafialového*) záření je nejpravděpodobněji připisována triterpenoidům [10].

Pupečník asijský lze také charakterizovat z hlediska těkavých látek jako extrakty esenciálního oleje, který je popisován v následující kapitole 2.4.2.

2.4.2 Esenciální oleje

Esenciální oleje obecně jsou aromatické směsi těkavých látek získaných ze sekrečních žláz rostlin, které najdeme v listech, květech, plodech, semenech, kořínkách nebo v kůře. Termín olej naznačuje, že jsou to látky nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v tucích a nepolárních rozpouštědlech. Esenciální oleje vykazují velmi charakteristické vlastnosti – na světle jsou schopny rychle oxidovat a izomerovat, hustotu mají obvykle menší než 1, jsou těkavé, mají charakteristickou vůni a obvykle slabě žlutou barvu nebo mohou být zcela bezbarvé [8]. Esenciální olej z pupečníku asijského je nažloutlé barvy a má slabou vůni podle obsahu aromatických látek [17].

Hlavním kritériem sloučenin obsažených v esenciálních olejích je nízká molekulová hmotnost. Nejvíce obsaženými složkami jsou monoterpenoidní a seskviterpenoidní uhlovodíky a fenolické látky, méně zastoupené jsou alifatické uhlíkaté sloučeniny [8].

Pokud se stanovuje přítomnost látek v extraktu, je vhodné uvést přesnou část rostliny, ze které byl extrakt proveden. Ne všechny studie však tuto informaci uvádějí, takže je složité identifikovat hlavní složky konkrétní části rostliny. Nadzemní části rostlin, zejména nejčastěji analyzované listy, obsahují hlavně triterpeny a fenolické látky, zatímco kořínky mohou obsahovat více monoterpenů, seskviterpenů, triterpenů a některé minerály [11].

2.4.2.1 Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou podtřídou terpenů a jsou složeny ze tří izoprenových jednotek [8]. Některé seskviterpeny obsažené v pupečníku asijském uvádí tabulka níže (viz. Tabulka 2).

Obsah konkrétních terpenů v pupečníku asijském se značně liší na základě různých chemotypů rostliny [3]. Například esenciální olej z pupečníku z íránu obsahoval nejvíce oxidovaných seskviterpenů, konkrétně E-karyofylen, karyofylen oxid a isospathulenol [2]. Esenciální olej z rostliny z Nepálu obsahoval převážně γ-karyofylen, β-karyofylen, β-farnesen, α-humulen a karyofylen oxid [18]. Esenciální olej z Indie obsahoval nejvíce β-karyofylenu, α-humulenu, *trans*-β-farnesenu, germakrenu D a karyofylen oxidu [17]. Rostlina z Malajsie vykazovala nejvyšší obsah γ-kadinenu, β-farnesenu, karyofylenu, α-humulenu a neofytadienu [19]. Ve většině esenciálních olejů se obsah seskviterpenů pohyboval okolo 70 % [2; 17; 18].

Tabulka 2 Příklady seskviterpenů pupečníku asijského (upraveno podle [11])

Rozdělení seskviterpenů	
acyklické	*trans*-β-farnesen, dekan-1-ol
monocyklické	germakren A, germakren B, germakren D, β-elemen, γ-kurkumen, bicyklogermakren, α-humulen, humulen epoxid, bicyklogermacen
bicyklické	epibicykloseskvifelandren, α-kadinen, δ-kadinen, karyofylen oxid, β-karyofylen, β-akoradien,
tricyklické	spatulenol, *allo*-aromadendren, viridiflorol, mintsulfid, α-kopen

2.4.2.2 Monoterpeny

Ve výrazně nižších koncentracích (okolo 1 %) se v oleji z pupečníku asijského nacházejí monoterpeny, látky zodpovědné mimo jiné i za vůni [17]. Nejvíce zastoupeným monoterpenem v extraktech pupečníku asijského je linalool [18]. V dalších studiích byl v esenciálním oleji zaznamenán vysoký obsah α-pinenu, β-myrcenu a ρ-cymenu [17]. Oxidované monoterpeny, mezi které patří například kamfor, kamfen nebo

borneol, disponují antimikrobiální aktivitou. Tyto sloučeniny byly rovněž identifikovány v esenciálním oleji z pupečníku asijského [2].

Z chemického hlediska dělíme monoterpeny obsahující dvě izoprenové jednotky, tedy deset uhlíkových atomů, na acyklické, monocyklické a bicyklické, jak lze vidět v následující tabulce (viz. Tabulka 3).

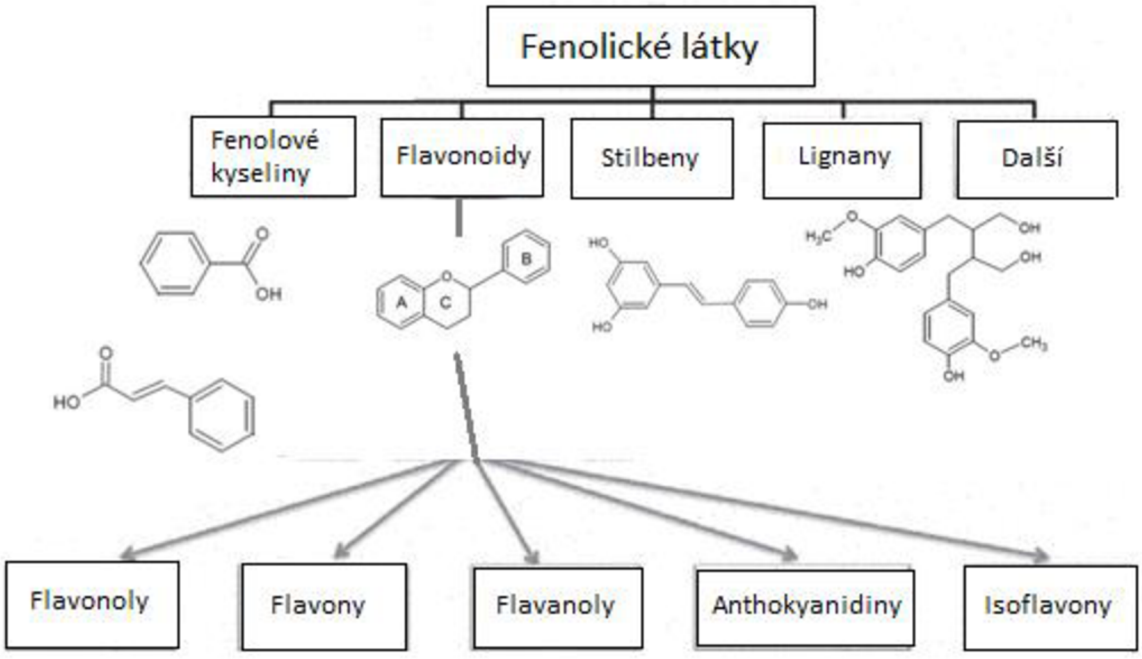
Tabulka 3 Příklady monoterpenů pupečníku asijského (upraveno podle [11])

Rozdělení monoterpenů	
acyklické	3-nonen-2-on
monocyklické	linalool, limonen, myrcen, γ-terpinen, terpinolen, A-terpinen, α-felandren, ρ-cymen, terpinen-4-ol, pulegon, menthon, methylkarvakrol, methylthymol
bicyklické	A-thujen, α-pinen, β-pinen, kamfen, bornylacetát, chrysantenylacetát

2.4.3 Fenolické látky

Fenolické látky tvoří charakteristickou skupinu přírodních látek s antioxidačním účinkem. Kromě antioxidačních účinků se fenolické látky podílí na barvě, chuti a vůni, a také absorbují UV záření. Všechny tyto vlastnosti vychází z jejich biologické funkce sekundárních metabolitů [7].

Hlavní strukturní jednotkou fenolických látek je fenol. Podle dalších chemických struktur vázaných na fenoly se tato skupina látek dělí na pět hlavních skupin podle následujícího schématu (viz. Obrázek 3) [20].



Obrázek 3 Dělení a struktura fenolických látek (upraveno podle [20])

Většina fenolických sloučenin je syntetizována pomocí dvou metabolických drah – dráhou kyseliny šikimové, kterou vznikají fenylpropanoidy, a dráhou kyseliny octové, kde vznikají jednoduché fenoly.

Kombinací těchto dvou drah poté vznikají flavonoidy se strukturou tří uhlíkových kruhů, které jsou nejpočetnější a nejvíce zkoumanou skupinou fenolických látek. Příkladem může být kvercetin, kaempfrol nebo epikatechin. Podle přítomnosti dvojné vazby mezi druhým a třetím uhlíkem heterocyklického jádra struktury, a také dle počtu hydroxylových skupin na uhlíkových kruzích, se dělí na dalších třináct skupin. Pět z nich je uvedeno ve schématu (viz. Obrázek 3) [20].

Fenolové kyseliny se dělí podle struktury na deriváty kyseliny benzoové (například kyselina gallová, kyselina hydroxybenzoová) a kyseliny skořicové (kyselina kávová, kyselina chlorgenová). Lignany vznikají ze dvou fenylpropanových jednotek a jsou obsaženy v cereáliích a obilninách. Stilbeny se vyskytují v lidské stravě pouze ve velmi malém množství. Z flavonoidů vznikají přes mnoho kondenzačních a polymeračních kroků polymery taniny a ligniny [20].

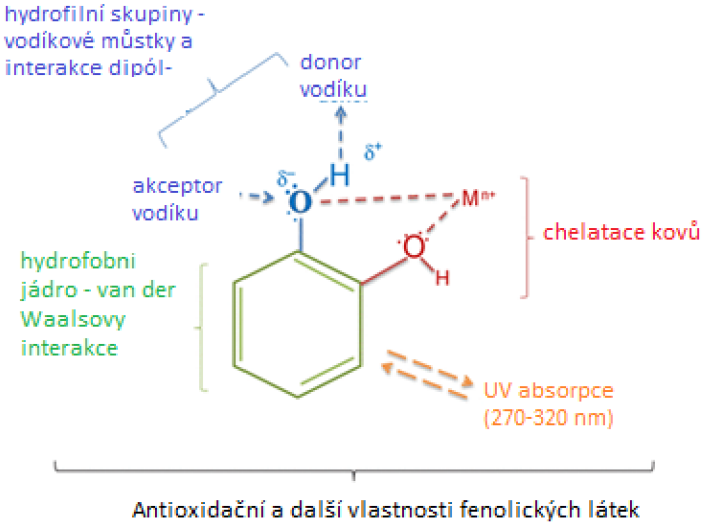
Polyfenoly se často vyskytují vázané na monosacharidy ve formě glykosidů nebo vázané na proteiny. Liší se molekulární hmotností; nejlehčí a strukturně nejjednodušší jsou fenylpropanoidy a fenolové kyseliny, vyšší molekulovou hmotnost mají flavonoidy, stilbeny a taniny [7].

2.4.3.1 Vlastnosti fenolických látek a antioxidační aktivita

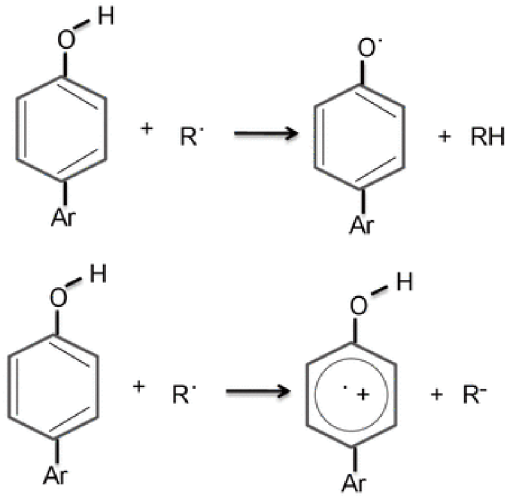
Z hlediska rozpustnosti jsou polyfenoly spíše polární (vzhledem k obsahu hydroxylových skupin), a pokud se nacházejí ve formě glykosidů, jsou rozpustné i ve vodě. Protože polyfenoly obsahují aromatické jádro, velmi intenzivně absorbují záření v UV oblasti, dokonce až po oblast viditelnou [20].

Již zmíněné antioxidační vlastnosti jsou nejvýznamnější charakteristikou polyfenolů, což se děje skrze více možných mechanismů. Buď jako přímé zhášení volných radikálů, nebo zároveň i chelatací kovových iontů, které se podílí na tvorbě volných radikálů, inhibicí enzymů oxidáz nebo regenerací již existujících antioxidantů vázaných v membránách (například tokoferolu). Mechanismy antioxidační aktivity jsou uvedeny ve schématu (viz. Obrázek 4) [20].

Zhášení škodlivých volných kyslíkatých radikálů může probíhat přenosem protonu (hydroxylová skupina fenolu je donor vodíku) na radikál, čímž se radikál zablokuje. Tento mechanismus je typický například pro antioxidaci peroxidových radikálů z lipidů. Druhou možností je přenos elektronu (z aromatického jádra) na radikál, který příjmem tohoto elektronu získá záporný náboj, a vzniká tedy aniont (viz. Obrázek 5) [20].



Obrázek 4 Mechanismy antioxidační aktivity fenolických látek (upraveno podle [20])



Obrázek 5 Dva mechanismy zhášení radikálů (převzato z [20])

2.4.3.2 Fenolické látky v pupečníku asijském

Lee a kol. [19] se ve své studii zabývali obsahem fenolických látek extraktů z pupečníku asijského. Použitou metodou charakterizace obsahu fenolických látek byla Folin-Ciocalteuova metoda a celkový obsah fenolických látek TPC (*total phenolic content)* v ethanolovém extraktu byl stanoven na 31,58 ± 3,08 mg_{GAE}/100 g (miligramů ekvivalentu kyseliny gallové na 100 g vzorku, GAE – *gallic acid equivalent*). Pro měření antioxidačních vlastností byla použita metoda FRAP (*ferric reducting/antioxidant power*) a DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl) [19]. Princip těchto metod je zmíněn v kapitole 2.6.3.

Celkový obsah fenolických látek v pupečníku byl měřen také skupinou Rattanakoma a kol. [21], kde ethanolový extrakt z pupečníku asijského obsahoval 23,8 ± 0,5 μg_{GAE}/mg. Nižší obsah fenolických látek vykazoval chloroformový extrakt a nejméně hexanový extrakt. Pro měření antioxidačních vlastností byla použita metoda FRAP [21]. Obsahem fenolických látek se také zabývala studie Mohammad Azmina a kol. z roku 2020 [22], která je zmíněna podrobněji v kapitole 2.6.1.2 Macerace.

Mezi flavonoidy obsažené v pupečníku asijském patří kvercetin, kaempferol, rutin nebo naringin [1]. Následující tabulka prezentuje další fenolové látky v extraktech pupečníku asijského (viz. Tabulka 4).

Tabulka 4 Příklady fenolických látek v pupečníku asijském (převzato z [11])

Rozdělení fenolických látek	
Flavonoidy	kaempferol, castilliferol, kvercetin, castillicetin
Fenylpropanoidy	rosmarinová kyselina, chlorogenová kyselina, di-kaffeoylchinové kyseliny, isochlorogenová kyselina
Taniny	tanin, flobatanin

2.5 Gotu kola v potravinářství

V současné době roste zájem o aplikaci léčivých rostlin do potravinářství, a to hlavně kvůli snaze spotřebitele zařadit do jídelníčku výživově bohaté a pestré potraviny, které obsahují co nejvíce biologicky aktivních látek. V potravinářství je tedy řadíme mezi funkční potraviny, fytopotraviny a nutraceutika. Rostliny se využívají také pro jejich senzorickou aktivitu, a to nejen pro zlepšení vzhledu, chuti a vůně, ale také ke zmenšení nutnosti přídavku soli. Nejčastějšími produkty obsahujícími byliny jsou čaje, džusy, sirupy, želé a dražé bonbony nebo potravinové doplňky [5].

V jihovýchodní Asii, především v Malajsii a Thajsku, je pupečník asijský neboli Gotu kola konzumována čerstvá (salát z pupečníkových listů se v Malajsii nazývá ulam), vařená v polévce nebo jako složka čajů, džusů nebo smoothie. Konzumují se prakticky všechny části rostliny, hlavně listy, stonky a kořínky. Díky své trpké chuti se zelenina podává s kokosovým mlékem. Na Srí Lance se z listů pupečníku vaří kari směs nebo kaše zvaná kola kenda [23].

Z nutričního hlediska jsou nejdůležitějšími složkami biologicky aktivní látky, hlavně triterpenoidní saponiny, ale rostlina také obsahuje vyšší množství draslíku, vápníku, vitaminu C a v menším množství také fosfor, železo, sodík, vitaminy B1, B2, niacin a vitamin A [23].

Využití Gotu koly jako ingredience v běžných potravinářských produktech je zatím velmi limitované, obzvláště v Evropě. Většina potravinářských aplikací se zabývá džusy z pupečníku, ale existují i méně obvyklé alternativní produkty. Hashim a kol. [23] ve své rešerši zmiňuje formulaci bylinkových nudlí s přídavkem 10% extraktu pupečníku asijského, aby byla udržena co nejlepší senzorická kvalita a zároveň vysoký podíl antioxidantů (konkrétně flavonoidů). Konzumace podobných alternativních výrobků není běžná, ale má vysoký potenciál uplatnění v budoucnosti. Extrakty z pupečníku by mohly být využity také jako přídavek do zmrzliny a jiných dezertů [23].

Hashim a kol. také zmiňuje potenciální aplikaci esenciálního oleje z pupečníku jako náhradu syntetického antioxidantu BHA (butylhydroxyanisol) obzvláště v potravinách s vyšším obsahem tuků [23].

2.5.1 Gotu kola jako potravinový doplněk

Pupečník asijský se na trhu vyskytuje ve formě potravinových doplňků. Taktéž se používá v kosmetice, a to obvykle ve formě extraktu v prášku, krému, toniku nebo v tabletách [3].

Literatura často bylinné přípravky a alkoholické nebo vodné extrakty z rostliny *Centella asiatica*, které jsou součástí komerčních produktů v evropských zemích, rozděluje podle různého procentuálního obsahu asiatikosidu, kyseliny asiatové a madecassové kyseliny [3]. Podle prohlášení Evropské lékové agentury z roku 2010 se ale v případě extraktů TECA *(titrated extract of Centella asiatica),* TTFCA *(total triterpenoid fraction of Centella asiatica)*, TTF *(total triterpenic fraction)*, ETCA *(Estratto Titolato di Centella asiatica)* a CATTF *(Centella asiatica total triterpenic fraction)* jedná o různá akronyma pro stejný extrakt, který obsahuje 40 % asiatikosidu a 60 % kyseliny asiatové a madecassové. Tento extrakt se komerčně vyskytuje pod názvy také jako Centellase®, Blastoestimulina® a Madecassol®. Existující data ohledně těchto extraktů jsou nedostatečná [24].

2.5.2 Džus z Gotu koly a jeho senzorická kvalita

Senzorická aktivita rostlinných extraktů je způsobena hlavně obsahem těkavých látek, konkrétně monoterpenů a seskviterpenů. Na výslednou chuť však má vliv i tepelné a tlakové ošetření potraviny [25]. Touto problematikou v souvislosti s obsahem aromaticky aktivních látek v džusu z Gotu koly se zabývala skupina z Univerzity Chiangmai v Thajsku, Wongfhuna a kol. [25]. Studie porovnávala

obsah těkavých látek v džusu podle jeho technologického ošetření, a to v čerstvém, sterilovaném, pasterizovaném džusu a džusu ošetřeném technologií HPP (*high pressure processing),* česky zvanou paskalizace [25]. Paskalizace je metoda, která ošetřuje předem zabalené potraviny vysokým tlakem ponořením do tlakovací kapaliny. Její hlavní výhodou je to, že dokáže zničit mikroorganismy, ale zachovává čerstvost, obsah nutričních látek a termolabilních komponent potraviny [26].

Pro analýzu těkavých látek obsažených v džusu z Gotu koly byl v této studii použit vodný extrakt rostliny a obsah látek byl stanoven pomocí plynové chromatografie ve spojení s mikroextrakcí tuhou fází a hmotnostní spektrometrií (SPME-GC-MS – *solid-phase micro-extraction gas-chromatography mass-spectrometry)* [25].

Na základě obsahu těkavých látek bylo potvrzeno, že paskalizace se jeví jako nejvhodnější metoda pro zachování senzorické kvality džusu, protože při ní dochází k nejmenší ztrátě těkavých látek. Tepelným nebo tlakovým ošetřením dochází k chemickým reakcím (izomeraci a dehydrataci), čímž vznikají látky nové. Při vysokých teplotách se tvoří některé ketony, proto byla jejich zvýšená koncentrace identifikována u sterilačního ošetření [25].

2.5.3 Extrakt Gotu koly v obalovém potravinářství

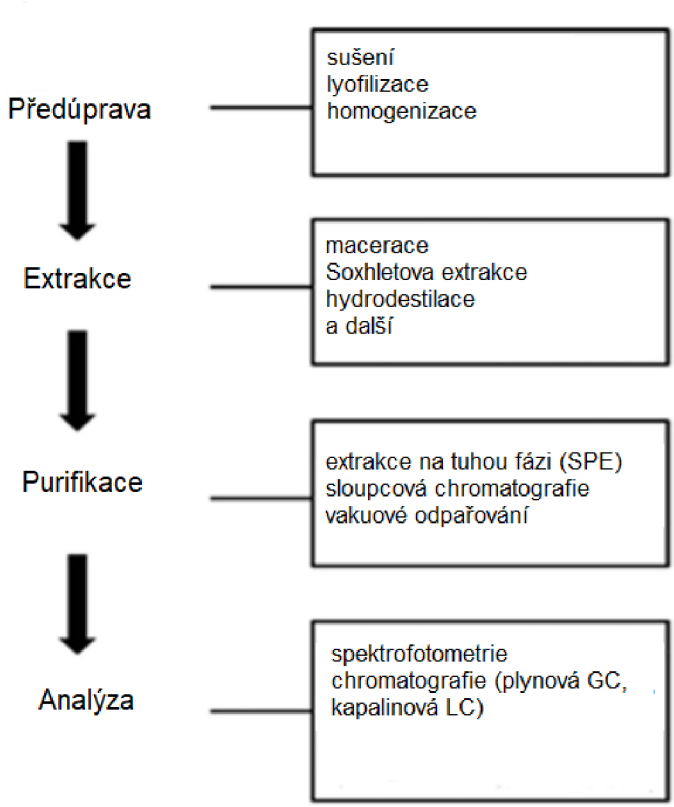
Studie Rasida a kol. [27] z Malajsie se zabývala hodnocením vlastností bio-obalového želatinového materiálu pro potraviny s přídavkem 5 až 25% extraktu z pupečníku asijského. Biopolymerové balení potravin poskytuje potravinám lepší kyslíkovou bariéru. Velkou výhodou je skutečnost, že se jedná o obal biodegradovatelný, což je v dnešní době při snaze posunout společnost k co nejmenší produkci plastového odpadu velkým trendem. Vylepšování těchto obalových materiálů se nyní zaměřuje i na inkorporaci biologicky aktivních látek, hlavně kvůli prodloužení doby trvanlivosti a zlepšení organoleptických vlastností potraviny. Rostlinné extrakty v obalovém potravinářství mohou vylepšit vlastnosti obalového filmu hlavně díky svým antioxidačním a antimikrobiálním vlastnostem [27].

Ve zmíněné studii byl použit methanolový extrakt z pupečníku asijského získaný macerací a vysušený mrazem, který díky obsahu fenolických látek disponoval výraznou antioxidační aktivitou. Nejlepší výsledky vykazoval 25% extrakt. Použitou metodou pro stanovení celkových fenolických látek a antioxidační aktivity želatinového filmu byla Folin-Ciocalteuova spektrofotometrická metoda a DPPH metoda měření zhášení kyslíkových radikálů [27].

Potenciálně by tento extrakt v potravinářských obalech bylo možné použít jako ochranu proti oxidaci, enzymatickému hnědnutí a ztrátě vitaminů. Studie také dokázala, že extrakt zlepšoval reologické vlastnosti filmu, jako je flexibilita, pravděpodobně díky interakcím fenolických látek s želatinovými peptidy [27].

2.6 Přehled metod pro stanovení hlavních účinných látek

Před samotnou analýzou je třeba rostlinný vzorek patřičně připravit. Postup celé analýzy popisuje následující schéma (viz. Obrázek 6) [5]. Teoretická část této práce dále konkrétněji popisuje extrakční procesy a samotnou analýzu pomocí spektrofotometrických testů a chromatografie.



Obrázek 6 Postup přípravy rostlinného vzorku pro analýzu (upraveno podle [5])

2.6.1 Metody izolace biologicky aktivních látek

Analýza biologicky aktivních látek z rostlinného materiálu je významně ovlivněna výběrem vhodné extrakční metody. Typickou preparační metodou pro rostlinný vzorek je extrakce, neexistuje však standardní extrakční metoda. Úspěch celkové analýzy vzorku také závisí na určitých parametrech extrakce: rozpouštědlo, teplota, tlak a doba, a také na části rostliny, která může obsahovat různé sekundární metabolity (listy, stonky, květy, plody) [6].

Všechny extrakční techniky však mají stejný cíl, a tím je zisk extraktu s co nejvyšším obsahem biologicky aktivních látek, zvýšení selektivity analytických metod a případně konverze biologicky aktivních látek na formu, která je ideální pro detekci a separaci [6].

V posledních padesáti letech se vyskytuje snaha o využití tzv. nekonvenčních metod extrakce, které jsou více environmentálně přijatelné. Obvykle se tyto metody snaží snížit spotřebu syntetických chemikálií a celkový čas extrakce. Mezi tyto metody patří ultrazvuková extrakce (UAE – *ultrasound assisted extraction*), extrakce využívající pulzní elektrické pole (PEF – *pulsed electric field assisted extraction*), enzymově asistovaná extrakce (EAE – *enzyme assisted extraction*), mikrovlnná extrakce (MAE – *microwave assisted extraction*), superkritická fluidní extrakce (SFE – *supercritical fluid extraction*) a vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PLE – *pressurized liquid extraction*) [6].

V následujících kapitolách budou diskutovány tzv. konvenční metody extrakce rostlinného materiálu, které kromě rozpouštědla využívají i teplo a míchání [6].

2.6.1.1 Soxhletova extrakce

Tato extrakce se používá jako porovnávací modelová metoda pro alternativní extrakce. Proces probíhá v Soxhletově aparatuře, kde ve spodní části je umístěna destilační baňka s rozpouštědlem, která

se zahřívá. Na ni navazuje patrona naplněná pevným vzorkem. Rozpouštědlo se postupně odpařuje a páry kondenzují v chladiči a plní patronu se vzorkem rozpouštědlem, čímž dochází k extrakci. Jakmile se patrona zcela naplní, rozpouštědlo i s extrahovanými látkami odtéká zpět do destilační baňky a roztok se postupně zakoncentrovává. Proces se takto několikrát opakuje [6].

Výhodou Soxhletovy extrakce je opakovaný kontakt čerstvého rozpouštědla s rostlinnou matricí. Vzhledem k aparatuře není třeba extrakt po skončení filtrovat. Extrakce v Soxhletově extraktoru je ale časově velmi náročná a je při ní značně vysoká spotřeba rozpouštědla. Extrakt navíc není možné během extrakce míchat a po skončení je nutné vzorek zakoncentrovat [5].

2.6.1.2 Macerace

Macerace je levná a jednoduchá technika extrakce. Materiál musí být nejdříve rozmělněn, aby byl získán větší povrch pro reakci [6]. Poté je smíchán s rozpouštědlem a látky z rostlinného materiálu difundují společně s rozpouštědlem pryč z matrice do roztoku podle polarity [22]. Extrakt se poté filtruje. Během macerace může být extrakt míchán za účelem zvýšení difuze. Tato metoda se konkrétně nazývá dynamická macerace [5].

Zisk konkrétní skupiny biologicky aktivních látek vždy závisí na interakci rozpouštědla s rozpuštěnou látkou, a tedy na polaritě rozpouštědla. Následující Tabulka 5 prezentuje často používaná extrakční rozpouštědla v závislosti na zisku požadované extrahované látky [6].

Tabulka 5 Vhodná extrakční rozpouštědla pro zisk konkrétních bioaktivních látek (upraveno podle [6]*)*

	terpenoidy	saponiny	alkaloidy	antokyany	flavonoly	flavony	polyfenoly	flavonoidy	taniny
voda	✓	✓		✓					✓
ethanol	✓		✓		✓		✓		✓
methanol	✓	✓		✓		✓	✓		✓
chloroform	✓							✓	
dichloro-methanol	✓								
ether	✓		✓						
aceton								✓	

Pro extrakci látek s antioxidačními účinky (například fenolických látek) je nejčastěji používaným rozpouštědlem ethanol, protože se jedná o levné a netoxické rozpouštědlo. Jedná o rozpouštědlo se statutem GRAS (*generally recognized as safe),* a proto je často používané v potravinářském průmyslu. V závislosti na koncentraci ethanolu lze získat různé frakce fenolických látek podle jejich polarity. Další používané rozpouštědlo pro extrakci polyfenolů je methanol, ten však musí být před využitím extraktu v potravinářství zcela odstraněn kvůli své toxicitě [28].

Procentuální výtěžek extraktu (% hm.) lze vypočítat podle následujícího vzorce [22]:

$$\% \text{ výtěžek} = \frac{\text{váha extraktu (g)} \cdot 100}{\text{váha matrice (g)}} \quad (1)$$

Studie z Malajsie z roku 2020, Mohammad Azmin a kol. [22], se zabývala extrakcí stanovením 6 biologicky aktivních fenolických látek (kaempferol, kvercetin, luteolin, kyselina gallová, rutin a katechin) v rozpouštědlech podle klesající polarity, a to ve vodě, v 50% ethanolu a v čistém ethanolu. Zisk jednotlivých sloučenin se zcela lišil podle použitého rozpouštědla v závislosti na afinitě dané látky k rozpouštědlu. Použitou metodou extrakce byla macerace a pro instrumentální analýzu byla použita

metoda HPLC (*high performance liquid chromatography*). Z vybraných fenolických látek byl nejvíce obsaženou bioaktivní látkou kaempferol (373,2 mg na gram suchého vzorku) v případě extrakce čistým ethanolem. Nejvyšší výtěžek biologicky aktivních látek vykazovala extrakce vodou (12,78 % hm.), ale oproti ethanolu se extrakt zcela lišil obsahem jednotlivých složek. Tento fakt je důkazem závislosti extrakce biologicky aktivních látek na polaritě rozpouštědla [22].

Rattanakom a kol. [21] se zabývali optimalizací extrakce macerací pupečníku asijského ve 3 rozpouštědlech (hexan, chloroform, ethanol) a testováním antimikrobiální a antioxidačních vlastností extraktů s případným využitím těchto informací v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Studie dokazuje, že každé rozpouštědlo poskytuje jiný chemický profil. Ethanolový extrakt vykazoval nejvyšší obsah fenolických látek. Ethanolový i chloroformový extrakt také vykazovaly vyšší antimikrobiální aktivitu než hexanový extrakt [21].

Hashim [23] zmiňuje podle předchozích provedených studií optimální extrakční podmínky pro extrakci pupečníku asijského. Tato extrakce je v poměru 1:15 pevné látky k rozpouštědlu, trvá 60 minut při 65 °C a rozpouštědlem je 40% ethanol [23].

2.6.1.3 Hydrodestilace v Clevengerově aparatuře

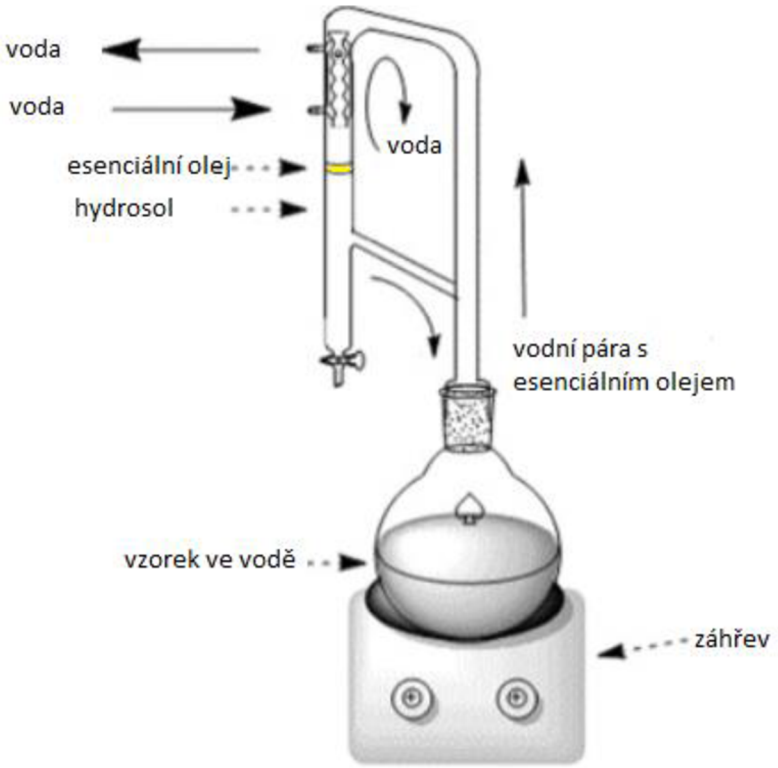
Extrakčním rozpouštědlem u hydrodestilace je pouze voda. Není tedy nutné po samotné destilaci provádět další kroky k odstranění organického rozpouštědla. Variací hydrodestilace je parní destilace, kdy vzorek není v kontaktu přímo s vodou, ale je umístěn do kontaktu s horkou vodní párou. Během kontaktu vzorku s vodou nebo vodní párou dochází ke třem fyzikálně-chemickým procesům – k hydrodifuzi, hydrolýze a rozkladu teplem. Z tohoto důvodu může docházet ke ztrátě některých těkavých sloučenin [6].

Pro izolaci esenciálních olejů je často využívaná Clevengerova aparatura (viz. Obrázek 7). Vzorek s vodou v nádobě je přiveden k varu a vzniká horká pára, která unáší izolované biologicky aktivní látky. Pára pokračuje přes chladič do sběrné nádoby, kde se oddělí lehčí esenciální olej, který zůstává na hladině, od těžší vodné fáze (hydrosolu), která sedne na dno [29].

Většina látek esenciálních olejů jsou hydrofobního charakteru, a proto je od sebe vodná a olejová fáze velmi dobře rozdělí (vliv na toto rozdělení má i rozdílná hustota fází). Některé biologicky aktivní látky však mohou zůstat v hydrosolu. Clevengerova aparatura tento nedostatek účinně odstraňuje tím, že vrací hydrosol zpět do zahřívané substance a znovu probíhá destilace. Hydrosol je nutné udržovat při nižší teplotě, jinak by mohlo dojít ke ztrátám výtěžku nebo vytvoření emulze oleje v hydrosolu [29]. Po separaci oleje od vody lze olej sušit přidáním síranu sodného, který na sebe naváže přebytečnou vodu [30].

Hlavní složky esenciálních olejů jsou velmi malých rozměrů (ne více než 300 daltonů), což zahrnuje nejvíce obsažené komponenty esenciálních olejů – monoterpeny a seskviterpeny. Abychom získali z oleje i látky větších rozměrů, jako jsou například diterpeny, musela by hydrodestilace probíhat dostatečně dlouho. Někdy se izolace těžších molekul nepodaří vůbec [29].

Hydrodestilace je jednou z nejčastěji využívaných extrakčních metod izolace esenciálních olejů z rostlin [8].



Obrázek 7 Clevengerova aparatura (upraveno podle [30])

Metoda hydrodestilace v Clevengerově aparatuře je vhodná pro přípravu oleje z rostliny v laboratorních podmínkách. Touto metodou byly získány esenciální oleje z pupečníku asijského například ve studii Sardrooda a kol. [2], Joshiho a kol. [17], Devkoty a kol. [18], Leeho a kol. [19], a Oyedejiho a kol. [31]. V těchto studiích se čas hydrodestilace pohyboval od 3 hodin až po 8 hodin a získaný olej byl obvykle vysušen síranem sodným [2; 17; 18; 19; 31].

2.6.2 Metody měření antimikrobiální aktivity

Esenciální oleje obsahují řadu biologicky aktivních látek, které vykazují aktivitu vůči mikroorganismům. Tato akce probíhá začleněním hydrofobních esenciálních olejů do bakteriální membrány, kde poté zvýšením její propustnosti dojde k její destrukci vypuštěním iontů a dalšího obsahu buňky do okolí [32].

2.6.2.1 Difuzní a diluční metoda

Testování antimikrobiální aktivity se nejčastěji provádí difuzní nebo diluční metodou. Pomocí diskové difuzní metody se provádí prvotní screening esenciálního oleje. Na inokulovanou agarovou plotnu se umístí papírový disk smočený esenciálním olejem a pozoruje se antimikrobiální aktivita oleje vůči inokulu. Druhou možností difuzní metody je agarová jamková metoda, kdy je esenciální olej umístěn přímo do jamky v agarové plotně. Diluční metoda už konkrétněji určuje sílu antimikrobiální aktivity. Může se provádět rozpouštěním esenciálního oleje v médiu – agaru nebo bujónu, který je poté naočkován inokulem [32].

Antimikrobiální aktivita se vyjadřuje pomocí minimální inhibiční koncentrace (MIC – *minimum inhibitory concentration*), což je nejnižší koncentrace vzorku v médiu, která inhibuje růst mikroorganismu. Určuje se také minimální baktericidní koncentrace (MBC – *minimum bactericidal concentration),* která definuje koncentraci, při které je zabito více než 99,9 % bakteriálního inokula [32].

Výsledek testu může být ovlivněn různými faktory, mezi které například patří metoda extrakce oleje, objem inokula, jeho růstová fáze, druh živného média a jeho pH, doba inkubace a teplota. Porovnávání výsledků se studiemi je tedy velmi obtížné [32].

2.6.2.2 Antimikrobiální aktivita pupečníku asijského

Antimikrobiální aktivita je mimo jiné ovlivněna i ziskem esenciálního oleje podle toho, jestli se jedná o extrakci rozpouštědlem nebo destilací [32]. Konkrétně u pupečníku asijského tuto skutečnost potvrdila studie Leeho a kol. [19], která testovala antimikrobiální aktivitu pomocí diskového difuzního testu. Esenciální olej získaný hydrodestilací vykazoval nižší aktivitu oproti ethanolovému extraktu. Extrakt vykazoval aktivitu vůči 8 z 10 testovaných patogenních bakterií napadajících potravinářské produkty, zatímco hydrodestilovaný olej byl aktivní jen vůči třem [19].

Aktivita vůči mikroorganismům je ovlivněna volbou konkrétního rozpouštědla [32]. Například ve studii Rattanakoma a kol. [21] extrakty z pupečníku asijského získané extrakcí ethanolem nebo chloroformem vykazovaly vyšší antimikrobiální aktivitu než hexanové extrakty. Pro inhibici rodu *Salmonella* bylo zvoleno jako nejvhodnější rozpouštědlo chloroform, zatímco pro *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis* ethanol [21].

Esenciální olej z pupečníku asijského z Afriky vykazoval inhibici 5 vybraných kmenů bakterií, vyšší inhibiční zóny vykazovaly gram pozitivní bakterie, což souhlasí s předchozími poznatky o rostlinných extraktech. Tento účinek byl přičítán vysokému obsahu germakrenu v oleji [31].

V roce 2019 byla také provedena studie zaměřená na esenciální olej z pupečníku pěstovaného uměle metodou mikropropagace, který také indikoval vysokou antimikrobiální aktivitu proti bakteriím *Bacillus megaterium, Staphylococcus aureus* a *Klebsiella aerogenes,* která byla dokonce větší než u antibiotika chloramfenikol. Mikropropagované rostliny vykazovaly vyšší inhibiční zóny než rostliny přírodního původu, což bylo způsobeno vyšším obsahem některých terpenů. Kultivace pupečníku *in vitro* má potenciální komerční využití pro vyšší produkci sekundárních metabolitů a použití v přírodních produktech [2].

Pupečníkový olej z indické Kerály studovaný Minijem a kol. [33] prokázal také významnou antimikrobiální aktivitu i vůči kvasinkám a plísním. Nejvyšší inhibiční zóna byla prokázána u bakterie *Escherichia coli*. V případě plísní a kvasinek se nejvíce projevují účinky vůči *Aspergillus niger, Rhizopus oryzae, Fusarium solani, Candida albicans* a *Colletotrichum musae*. Díky těmto vlastnostem lze olej považovat za potenciální mikrobiocid [33].

Západní společnost a konzument se zaměřuje na využívání méně syntetických aditiv v potravinářství. Náhražkou těchto aditiv používaných k prodloužení doby trvanlivosti potravin by mohly být právě antimikrobiálně aktivní esenciální oleje [32].

2.6.3 Metody měření antioxidační aktivity

Inkorporací rostlinných antioxidantů do stravy moderní společnosti lze omezit škodlivé účinky volných radikálů na organismus, které mohou vyvolat řadu civilizačních onemocnění. Pro hodnocení antioxidačních vlastností lze využít několika metodik, v této kapitole budou prezentovány metody *in vitro* [34].

Pro testování celkové antioxidační aktivity *in vitro* se často používají metody DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl), TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*), FRAP (*ferric reducting/antioxidant power*), ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) a HRSCA (*hydroxyl radical-scavenging capacity assay*) [28].

Metoda používající DPPH využívá syntetický stabilní radikál difenylprikrylhydrazyl, který je redukován (zhášen antioxidantem) na difenylpikrylhydrazin (DPPH-H). Pokles absorbance se sleduje při 517 nm na spektrofotometru [34]. Tuto metodu pro hodnocení antioxidační aktivity extraktu pupečníku asijského použili ve svých studijích Hashim a kol. [10], Lee a kol. [19] a Rasid a kol. [27].

FRAP metoda využívá redukci železitého komplexu antioxidantem na železnatý komplex, čímž dochází k nárůstu absorbance, kterou lze měřit spektrofotometricky při 593 nm [34]. Pro extrakty z pupečníku asijského tuto metodu použili Lee a kol. [19] a Rattanakom a kol. [21].

Metoda TEAC využívá antioxidační zhášení syntetického kation-radikálu ABTS·+, který je generován oxidací ABTS (2,2'-azinobis(3-etylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)), a sleduje se změna absorbance. Celková antioxidační aktivita TAA (*total antioxidant capacity*) se zde vyjadřuje parametrem TEAC, který je určen antioxidační kapacitou ekvivalentního množství syntetické látky Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) [34].

Další metodou je Folin-Ciocalteuova metoda, pomocí které lze určit celkový obsah fenolických látek (TPC – *total phenolic content).* Tato metoda je jednoduchá, ale přesto dostatečně citlivá. Používá se k určení celkové antioxidační aktivity u vzorků, jako je například čaj nebo víno [35]. Metoda funguje na principu oxidace fenolických látek žlutým Folin-Ciocalteuovým reagentem, který obsahuje sloučeninu molybdenu a wolframu v zásaditém prostředí uhličitanu sodného. Změna barvy na modrou se měří spektrofotometricky při 700–760 nm. Absorbance modrého pigmentu závisí na obsahu fenolických látek, a proto lze díky ní určit jejich obsah ve vzorku [36].

2.6.3.1 Antioxidační aktivita pupečníku asijského

Antioxidační aktivita extraktů z pupečníku asijského je přisuzována hlavně kombinaci fenolických látek a triterpenoidů, konkrétně asiatikosidu [10]. Ve studii Hashima a kol. [10] byla antioxidační aktivita testována pomocí metody DPPH a porovnávána s extrakty z hroznových semen, zeleného čaje a vitaminu C. Největší antioxidační aktivitu obecně vykazuje ethanolový extrakt. Aktivita toho extraktu byla podobná aktivitě extraktu z hroznových semen [10].

Lee a kol. [19] porovnávali ethanolové extrakty získané Soxhletovou extrakcí a esenciální oleje získané Clevengerovou hydrodestilací. Celkový obsah fenolických látek (TPC) byl měřen pomocí Folin-Ciocalteuovy metody, antioxidační aktivita pomocí metod DPPH a FRAP. Zatímco esenciální olej nevykazoval žádnou aktivitu, ethanolový extrakt ano. Data TPC a FRAP mezi sebou korelovala, což potvrzuje antioxidační účinky polyfenolů [19].

2.6.4 Metody stanovení aromaticky aktivních látek

Po extrakci a přečištění extraktu lze přistoupit ke kvantifikaci aromaticky aktivních látek. Před samotnou chromatografickou analýzou se vzorek musí zakoncentrovat, k čemuž lze použít mikroextrakci tuhou fází, která je vhodná pro těkavé analyty [37].

2.6.4.1 Mikroextrakce tuhou fází

SPME (*solid-phase micro-extraction*) je preparační metoda, která využívá sorpce analytu na křemenné vlákno, stacionární fázi, která se liší polaritou a sorpčními vlastnostmi. Analyt se na vlákně zachytí absorpčně nebo adsorpčně v závislosti na materiálu použité sorpční vrstvy, než dojde k dosažení rovnováhy. Existují dvě možnosti, jak se analyt sorbuje na vlákno, buď z prostoru par (HS – *headspace*), nebo přímým ponořením vlákna do vzorku. Tato adsorpčně/desorpční technika se používá pro kvalitativní i kvantitativní analýzu [37].

Tuto metodu ve spojení s plynovou chromatografií použili Wongfhun a kol. [25] pro identifikaci aromatických látek obsažených v ošetřených džusech z pupečníku asijského.

2.6.4.2 Plynová chromatografie

Pro stanovení aromatických látek se často využívá plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS – *gas-chromatography mass-spectrometry*). Díky tomuto spojení lze zároveň chromatograficky separovat a identifikovat danou směs analytů. Výsledkem analýzy jsou chromatogramy a hmotnostní spektra sloučenin, které lze porovnávat s knihovnou spekter a tím identifikovat dané sloučeniny [38].

Plynová chromatografie je metoda, která separuje analyty podle jejich interakce se stacionární fází, kde mobilní fází je plyn. Hmotnostní spektrometrie slouží k identifikaci analytu podle poměru hmotnosti a náboje *m/z*. Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, analyzátoru a detektoru částic [38].

V případě spojení GC-MS jsou typickými iontovými zdroji EI (elektronová ionizace) nebo CI (chemická ionizace) a typické jsou také hmotnostní analyzátory kvadrupól (Q – *quadrupole*), iontová past (IT – *ion trap*) nebo analyzátor doby průletu (TOF – *time of flight*) [38].

V případě analýzy extraktů z pupečníku asijského byla v četných studiích použita GC-MS analýza pro charakterizaci těkavých látek. Některé studie také využily porovnání výsledků získaných GC-MS a GC-FID analýzou (GC-FID – plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem, *gas chromatography – flame ionization detector*) [2] [17] [18].

2.6.4.3 Kapalinová chromatografie

Pro kvantifikaci fenolických látek se často používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – *high performance liquid chromatography*), obvykle s reverzními fázemi. Jako detektor se používá UV-VIS detektor nebo PDA fotodiodový detektor (*photodiode array*) [28]. Pro stanovení fenolických látek v pupečníku asijském byla HPLC použita ve studii Mohammad Azmina a kol. [22].

Pro stanovení triterpenů byla HPLC použita také ve studii Hashima a kol. [10] s pulzním amperometrickým detektorem PAD (*pulsed amperometric detector)* a gradientovou elucí s mobilními fázemi vodou a acetonitrilem [10]. Jiná studie Kaura a kol. [39], zaměřená také na triterpeny, použila pro jejich identifikaci HPLC s UV detektorem [39].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje

- Analytické digitální váhy (GR-202-EC, HELAGO, Itálie)
- Předvážky (AND, EK-1200i, USA)
- Sušárna (Memmert, Německo)
- Filtrační papír pro kvalitativní analýzu KA1, průměr 110 mm (Papírna Pernštejn s.r.o., ČR)
- Vortex (Heidolph, Reax top)
- Spektrofotometr (Helios Gamma and Delta Spectronic Unicam, USA)
- Plynový chromatograf Trace™ 1310 se split/splitless injektorem (Thermo Fisher Scientific INc., Waltham, MA, USA)
- Hmotnostní detektor ISQ™ LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific INc., Waltham, MA, USA)
- Knihovna spekter NIST/EPA/NIH (Gaithesburg, Maryland, USA)
- Program pro vyhodnocování Xcalibur 2.2 (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 µm (Pennsylvania, USA)
- Laboratorní sklo a další vybavení laboratoře

3.2 Použité chemikálie

- Demineralizovaná voda
- Destilovaná voda
- Ethanol 96 % p.a. (PENTA s.r.o, ČR)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (VWR Chemicals, ČR)
- Uhličitan sodný bezvodý p.a. (Centralchem s.r.o., Slovensko)
- Kyselina gallová (Sigma-Aldrich, USA)
- Peroxodisíran draselný p.a. (Lach-Ner s.r.o, ČR)
- ABTS (Sigma-Aldrich, USA)
- Trolox (Sigma-Aldrich, USA)

3.3 Analyzované vzorky

Pro analýzu byly použity ethanolové extrakty listů a stonků čerstvé rostliny pupečníku asijského *(Centella asiatica)*, který byl vypěstován v domácích podmínkách (viz. Obrázek 8). Z dostupných extrakcí, jež byly zmíněny v teoretické části (kapitola 2.6.1) byla vybrána macerace vzhledem k dostupným přístrojům i snadnému a rychlému provedení.

Pro maceraci byly použity optimální podmínky převzaté z prací studentů VUT, Fakulty technické, spolupracujících na analýze rostlinných extraktů [40; 41]. Za optimální podmínky jsou považovány parametry, při kterých byl zjištěn nejvyšší obsah fenolických látek a aromaticky aktivních látek v extraktu. Při extrakci jsou důležité zejména parametry, jakou jsou navážka rostliny a rozpouštědla, jeho koncentrace, teplota a doba extrakce. Před samotnou macerací byl vzorek nakrájen na drobnější částice pro lepší přenos hmoty při extrakci. Macerace pupečníku asijského byla provedena dvakrát paralelně (tyto extrakty jsou dále označovány jako A a B) při stejných podmínkách (viz. Tabulka 6).

Tabulka 6 Optimální podmínky macerace rostlinného materiálu (převzato z [40])

Rozpouštědlo	40% ethanol
Poměr navážky k rozpouštědlu	1:5 (20 g/100 ml)
Teplota macerace	60 °C
Doba macerace	40 minut

Obrázek 8 Pupečník asijský (Centella asiatica)

3.4 Použité metody

3.4.1 Folin-Ciocalteuova metoda – stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin

Byla připravena činidla pro analýzu: nasycený roztok uhličitanu sodného (7,5 g uhličitanu sodného na 95 ml vody) a Folin-Ciocalteuovo činidlo, které bylo zředěno destilovanou vodou v poměru 1:9.

Do zkumavky bylo pipetováno 1 ml destilované vody, 1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla a 100 µl extraktu rostliny (standardu při kalibraci, destilované vody při přípravě blanku). Směs byla promíchána na vortexu a poté ponechána stát 5 minut. Po uplynutí této doby byl přidán 1 ml Na_2CO_3 a směs byla znovu promíchána. Zkumavky byly ponechány stát ve tmě po dobu 45 minut. Absorbance byla změřena na spektrofotometru při 750 nm.

Kalibrační křivka byla změřena pro roztoky standardu o koncentraci od 0,01 do 0,5 $mg \cdot l^{-1}$, kde standardem je kyselina gallová. Každý extrakt pupečníku asijského byl přeměřen třikrát. Kalibrační křivka i extrakty byly měřeny za stejných podmínek.

Celkový obsah fenolických látek ve vzorku (*TPC – total phenolic content*) byl vyjádřen jako ekvivalentní množství kyseliny gallové (*GAE – gallic acid equivalent*) v miligramech na gram suchého vzorku ($mg_{GAE} \cdot g^{-1}$).

3.4.2 Metoda TEAC – stanovení antioxidační aktivity

Byl připraven roztok ABTS rozpuštěním v demineralizované vodě na koncentraci 7 $mmol \cdot l^{-1}$. Poté byl připraven roztok peroxodisíranu draselného rozpuštěním příslušné navážky v demineralizované vodě

na koncentraci 2,45 mmol·l^{-1}. Smícháním takto připravených roztoků v poměru 1:1 byla spuštěna reakce pro generaci kation-radikálu ABTS·+. Před použitím byl roztok ponechán stát ve tmě 24 hodin.

V den měření byl roztok ABTS·+ zředěn 60% ethanolem na absorbanci 0,70 ± 0,02 při měření o vlnové délce 734 nm. Tato absorbance byla získána při zředění 1,2 ml roztoku ABTS·+ na 40 ml ethanolu (1:33,33). Tento zásobní roztok byl použit pro všechny následující analýzy.

Do kyvety bylo napipetováno 10 µl demineralizované vody, 1 ml zředěného radikálu ABTS·+ a ihned byla změřena první absorbance v čase nula, která byla použita jako referenční. Do následujících kyvet bylo pipetováno 10 µl vzorku, 1 ml zředěného radikálu ABTS·+, vzorek byl promíchán na vortexu a uchován ve tmě po dobu 10 minut. Poté byla ihned změřena absorbance v čase 10 minut.

Kalibrační křivka byla sestavena pro standard syntetické látky Trolox, který byl rozpuštěn v 60% ethanolu, při koncentracích od 50 do 400 mg·ml^{-1}. Kalibrační křivka i extrakty byly měřeny za stejných podmínek. Celková antioxidační aktivita byla vyjádřena jako ekvivalentní množství Troloxu.

3.4.3 Plynová chromatografie – stanovení aromatických látek

Extrakty pupečníku asijského (A a B) byly podrobeny analýze plynovou chromatografií ve spojení s headspace mikroextrakcí tuhou fází a hmotnostní spektrometrií (HS-SPME-GC-MS). Množství extraktu pipetovaného do vialky bylo 2 ml. Extrakty byly proměřeny programem Xcalibur 2.2 za podmínek nastavených na chromatografu (viz. Tabulka 7).

K identifikaci pomocí plochy jednotlivých píků byla použita knihovna hmotnostních spekter NIST/EPA/NIH. Z plochy píků bylo vypočteno procentuální zastoupení sloučenin. Ukázku změřeného chromatogramu je možné nalézt v přílohách (viz. Příloha 1).

Tabulka 7 Podmínky HS-SPME-GC-MS analýzy

Mikroextrakce tuhou fází	
Doba inkubace	10 minut
Teplota extrakce a inkubace (teplota agitátoru)	40 °C
Doba extrakce	20 minut
Zapnutý agitátor	5 sekund
Vypnutý agitátor	60 sekund
Dávkování splitless	
Uzavřený ventil	10 minut
Nosný plyn	hélium
Průtok nosného plynu	1 ml·min^{-1}
Teplotní program	40 °C s výdrží 1 minutu, vzestupný gradient 5 °C·min^{-1} do 220 °C s výdrží 12 minut
Čas celkové analýzy	55 minut
GC-MS analýza	
Kapilární kolona	TG-WaxMS
Rozměry kolony	30 m x 0,25 mm x 0,5 mm
Teplota injektoru (desorpce)	240 °C
Čas desorpce	20 minut

Hmotnostní detektor	
Mód	elektronová ionizace
Energie ionizačních elektronů	70 eV
Teplota iontového zdroje	200 °C
Skenovací rozsah *m/z*	30-370 amu
Rychlost skenování	0,2 s

3.5 Statistické zpracování výsledků

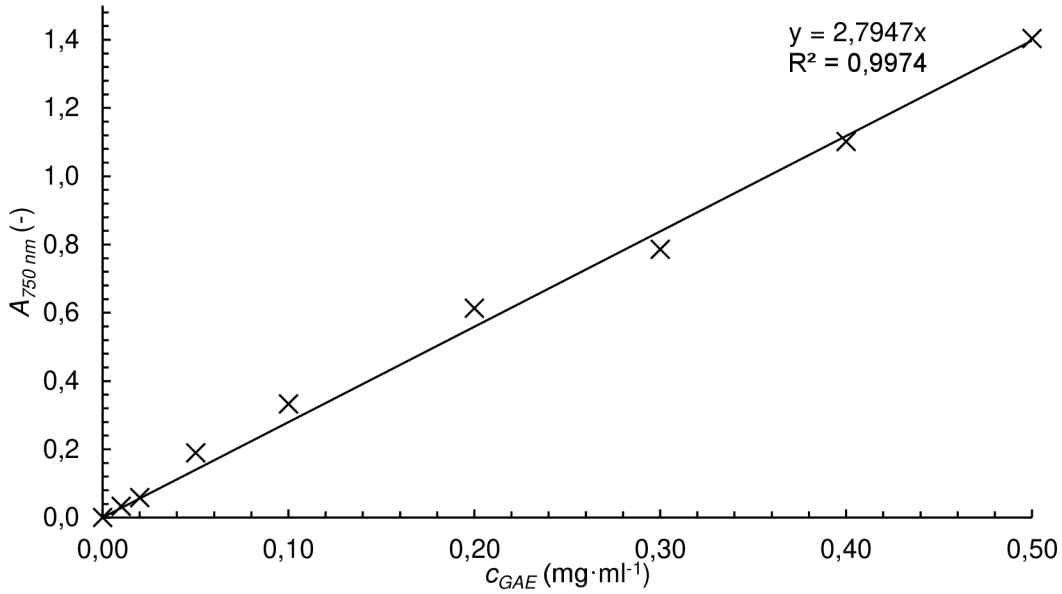
Data byla zpracovaná v programu MS Excel 2020. Výsledky jsou vyjádřeny ve tvaru průměr ± odchylka. Pro vyhodnocení odlehlých výsledků byl využit Dean-Dixonův test odlehlých hodnot.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Extrakt získaný macerací čerstvé rostliny pupečníku asijského (*Centella asiatica*) byl podroben analýze do tří dnů, aby nedošlo ke stárnutí vzorku, a tedy i k jeho degradaci. Získaný extrakt měl slabé zelenožluté zabarvení a výrazné zeleninové aroma podobné mrkvi.

4.1 Celkový obsah fenolických látek v extraktu

Celkový obsah fenolických látek byl určen Folin-Ciocalteuvou metodou spektrofotometricky. Kalibrační křivka (viz. Obrázek 9) byla naměřena pro koncentrace od 0,01 do 0,5 $mg \cdot ml^{-1}$:



Obrázek 9 Kalibrační křivka metody stanovení celkového obsahu fenolických látek

Tabulka dále v textu (viz. Tabulka 8) ukazuje naměřené hodnoty absorbancí dvou extraktů. Analýza proběhla paralelně třikrát ($n = 3$). Pro vyloučení odlehlých hodnot v souboru naměřených absorbancí byl použit statistický Dean-Dixonův test. Při tomto testování bylo zjištěno, že žádná hodnota v souboru nebyla odlehlá. Pro soubor hodnot obou extraktů měřených třikrát bylo při $n = 6$ vypočteno $Q_{min} = 0,05$ a $Q_{max} = 0,17$, $Q_{kritické}$ tabelované bylo 0,56 [42].

Výsledky absorbance byly pomocí kalibrační rovnice a funkce lineární regrese přepočteny na miligramy standardu kyseliny gallové na gram suchého vzorku. Průměrná hodnota celkového obsahu fenolických látek je 0,74 ± 0,08 $mg_{GAE} \cdot g^{-1}$ (74 ± 8 mg_{GAE}/100 g), což je hodnota vyšší než u předchozích studií [19; 21].

V porovnání s analýzou Folin-Ciocalteuovou metodou studie Leeho a kol. [19] se výsledky této práce liší. Lee a kol. udává celkový obsah fenolických látek v ethanolovém extraktu pupečníku asijského na 31,58 ± 3,08 mg_{GAE}/100 g, liší se však i podmínky extrakce, která ve studii byla provedena pomocí Soxhletovy aparatury po dobu 24 hodin, zatímco extrakce v této práci probíhala jednoduchou macerací po dobu 40 minut. Hodnoty prezentované touto studií jsou nižší než v experimentu této práce, což může poukazovat na možný vliv vysoké teploty při Soxhletově extrakci na fenolické látky, které mohly být degradovány.

Rattanakom a kol. [21] uvádí u ethanolového extraktu z pupečníku asijského celkový obsah fenolických látek 23,8 ± 0,5 $\mu g_{GAE} \cdot mg^{-1}$, přičemž extrahována byla sušená bylina v 95% ethanolu v poměru 1:10 materiálu a rozpouštědla a macerace probíhala po dobu 48 hodin. Kromě podmínek

extrakce se v této studii tedy liší i charakter použitého materiálu, což taktéž mohlo způsobit rozdíl ve výsledcích.

Z výsledků lze vidět, že obsah fenolických látek v bylině je závislý na metodě extrakce a jejích podmínkách (parametry: rozpouštědlo, doba extrakce, teplota a navážka) a také jestli se jedná o sušený nebo čerstvý materiál. Je také vhodné, aby analýza byla provedena bezprostředně po extrakci, aby nedocházelo ke znehodnocení extraktu.

Vyšší dosažená hodnota TPC oproti předešlým studiím dokazuje, že experimentálně získané extrakční podmínky pro maceraci rostlinného materiálu byly zvoleny správně a je možné je použít pro další zkoumání.

Tabulka 8 Výsledky stanovení TPC u měřených extraktů

Extrakt	$A_{750\ nm}$	$mg_{GAE} \cdot ml^{-1}$	$mg_{GAE} \cdot g^{-1}$	mg_{GAE}/100 g
A	0,374	0,13	0,67	66,91
	0,401	0,14	0,72	71,74
	0,466	0,17	0,83	83,37
B	0,485	0,17	0,87	86,77
	0,388	0,14	0,69	69,42
	0,380	0,14	0,68	67,98

4.2 Antioxidační aktivita extraktu

Antioxidační aktivita byla vyhodnocena pomocí metody TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*) zhášením kation-radikálu ABTS·+.

Absorbance v čase 0 minut (A_0) byla naměřena pro demineralizovanou vodu s radikálem (A_0 = 0,610). Od této hodnoty byla vždy odečtena hodnota naměřené absorbance vzorku nebo v případě kalibrace kalibračního roztoku Troloxu (A_{10}):

$$A = A_0 - A_{10} \tag{2}$$

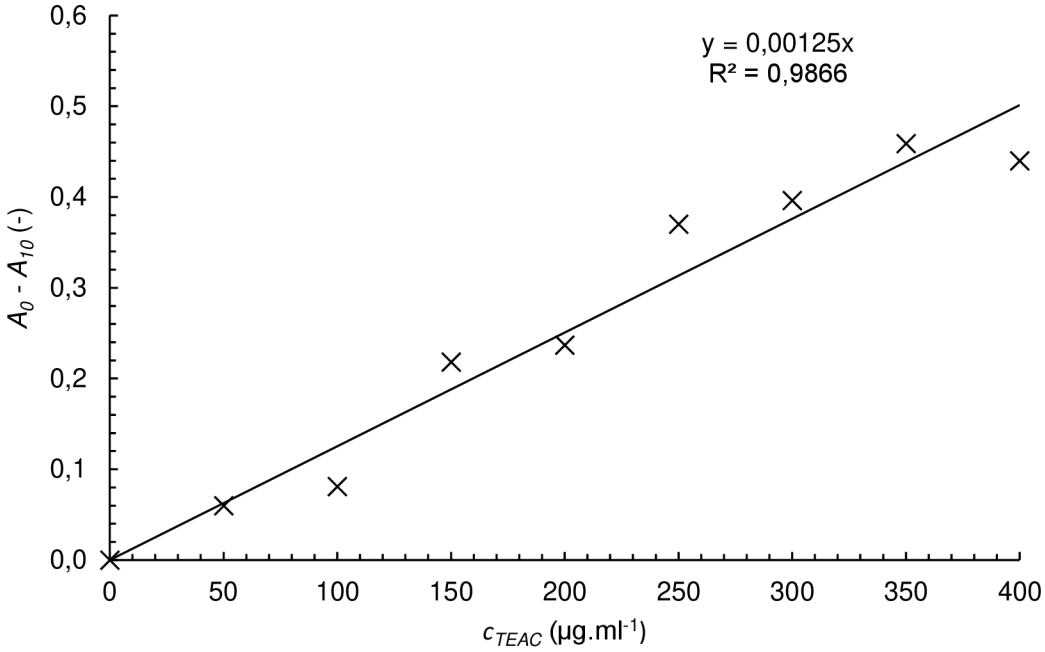
Schopnost zhášení radikálů (%) byla vypočtena podle vzorce:

$$zhášení\ radikálu = \frac{A_0 - A_{10}}{A_0} \cdot 100\ \% \tag{3}$$

Kalibrační křivka standardu Troloxu byla naměřena u následujících koncentrací (viz. Tabulka 9):

Tabulka 9 Naměřené hodnoty absorbance pro kalibraci metody TEAC

$c_{standardu}$ ($mg \cdot ml^{-1}$)	A_{10} (-)	$A_0 - A_{10}$ (-)
50	0,550	0,060
100	0,529	0,081
150	0,392	0,218
200	0,373	0,237
250	0,240	0,370
300	0,214	0,396
350	0,151	0,459
400	0,170	0,440



Obrázek 10 Kalibrační křivka metody TEAC

Výsledná antioxidační aktivita vzorku byla odečtena z kalibrační křivky a vyjádřena jako $\mu g \cdot ml^{-1}$ ekvivalentního množství Troloxu (viz. Tabulka 10). Průměrná antioxidační aktivita byla vypočtena na 289 ± 81 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Schopnost vzorku zhášet radikál byla průměrně 59,34 %.

Tabulka 10 Výsledky stanovení antioxidační aktivity extraktu pupečníku asijského

extrakt	A_{10}	$A_0 - A_{10}$	c_{TEAC} ($\mu g \cdot ml^{-1}$)	*zhášení radikálu* (%)
A	0,274	0,336	268,11	55,08
	0,140	0,470	375,03	77,05
B	0,176	0,434	346,30	71,15
	0,402	0,208	165,97	34,10

Studie zabývající se stanovením antioxidační aktivity pupečníku asijského používají většinou metodu DPPH, výsledky jsou tak s našimi obtížněji porovnatelné. Hashim a kol. [10] udává hodnotu zhášení radikálu (metoda DPPH) 83 % a přiřazuje antioxidační účinky extraktu triterpenické sloučenině asiatikosidu. Procentuální hodnoty dat z obou metod TEAC i DPPH by spolu měly korelovat, ale z důvodu rychlého přesunu elektronů často nejsou jednotné. Byakodi a kol. [43] uvádí hodnotu antioxidačního zhášení radikálu získanou metodou TEAC u methanolového extraktu z pupečníku 31,76 %. Z provedené analýzy vyplývá, že ethanol je lepším rozpouštědlem pro extrakci pupečníku asijského, protože dosahuje vyšší antioxidační aktivity.

Data získaná metodou TEAC v této práci nejsou zcela jednotná. Důvodem je pravděpodobně nestálost kation-radikálu ABTS·+, rychlý přesun elektronů při zhášení tohoto radikálu a snadná možnost nepřesnosti při manipulaci se vzorky.

Analýza extraktu z pupečníku asijského potvrdila jeho schopnost zhášet volné radikály (antioxidační aktivitu), a tedy i možnost jeho případného využití v potravinářství jako přírodní antioxidační potravinový doplněk.

Antioxidační aktivita pupečníku asijského je připisována fenolickým sloučeninám v kombinaci s triterpenoidními sloučeninami (kapitola 2.4.1.1), které v této práci nebyly stanovovány. Z důvodu jejich vyšší molekulové hmotnosti by bylo vhodné pro další studium pupečníku asijského zařadit mezi použité metody vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii.

4.3 Aromatické látky v extraktu

Pro stanovení obsahu aromatických látek v extraktu z pupečníku asijského, které určují jeho senzorickou kvalitu, byla použita metoda HS-SPME-GC-MS. Porovnány byly sloučeniny ve dvou paralelních extraktech (A a B), které byly extrahovány za optimálních podmínek. Procentuální zastoupení sloučenin identifikovaných v daném retenčním čase bylo vypočteno z celkové plochy všech naměřených píků v chromatogramu (viz. Tabulka 11). Sloučeniny byly roztříděny podle jejich příslušnosti ke skupinám biologicky aktivních látek nacházejících se v pupečníku asijském (kapitola 2.4).

Celkem bylo identifikováno 47 sloučenin, z toho 12 není ve stopovém množství. Za stopové množství je bráno méně než nebo rovno 0,5 % z celkové plochy píků, sloučeniny v těchto množstvích jsou v tabulce vyznačeny šedě. Z celkového množství analyzovaných píků bylo v extraktech A a B průměrně identifikováno (bez sloučenin ve stopovém množství) 93,47 % látek. Zbytek píků nebyl spolehlivě identifikován knihovnou.

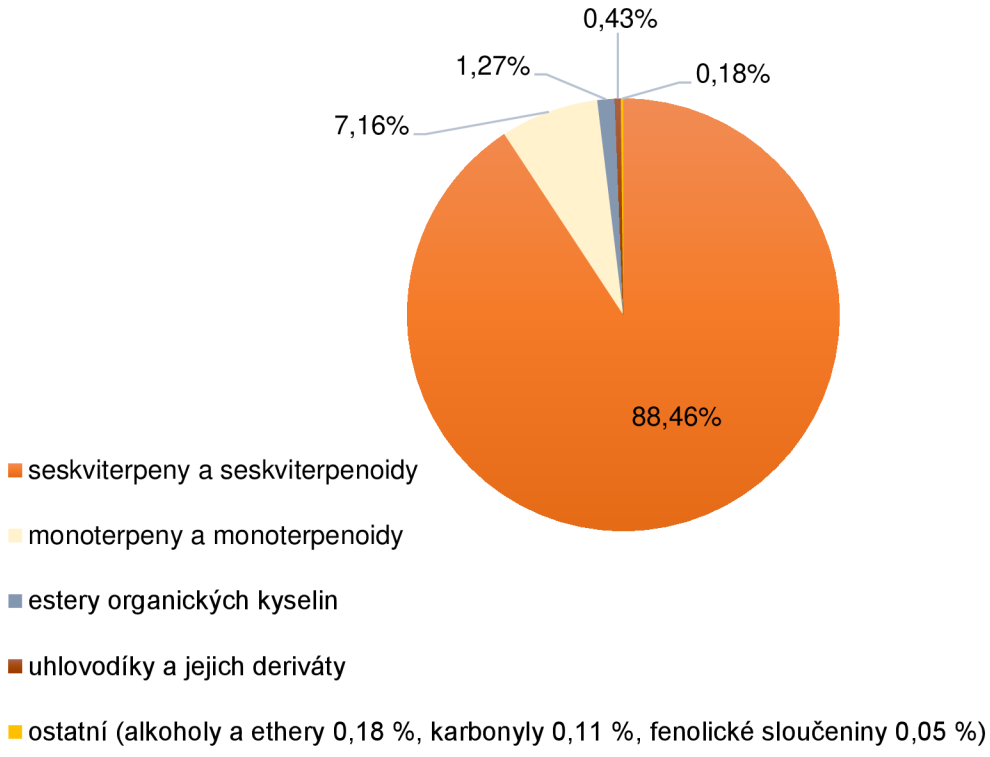
Tabulka 11 Obsah aromatických látek ve dvou paralelních extraktech z pupečníku asijského

Název sloučeniny	Retenční čas (min)	Průměrné zastoupení (%)	Zařazení
β-pinen	7,32	0,31	monoterpeny (bicyklické)
β-myrcen	8,84	2,64	monoterpeny (monocyklické)
terpinen-4-yl acetát	9,26	0,23	monoterpenoidy
D-limonen	9,80	0,27	monoterpeny (monocyklické)
β-terpinen	10,05	0,03	monoterpeny (monocyklické)
α-pinen	10,82	0,04	monoterpeny (bicyklické)
γ-terpinen	11,12	1,96	monoterpeny (monocyklické)
3-karen	11,32	0,23	monoterpeny (bicyklické)
o-cymen	11,89	0,50	monoterpeny (monocyklické)
4-karen	12,16	0,11	monoterpeny (bicyklické)
3-oktyl acetát	13,60	0,03	estery organických kyselin
cis-hex-3-enol	15,00	0,03	alkoholy
nonanal	15,24	0,06	aldehydy
ethyl-oktanoát	16,21	0,01	estery organických kyselin

Název sloučeniny	Retenční čas (min)	Průměrné zastoupení (%)	Zařazení
trans-seskvisabinen hydrát	17,66	0,05	monoterpenoidy
kafr (bornan-2-on)	18,53	0,43	monoterpeny (oxidované)
3-chlordekan	19,15	0,08	deriváty uhlovodíků
linalyl-acetát	19,33	0,08	monoterpeny (estery)
4-*terc*-butylcyclohexyl-acetát	19,55	0,60	monoterpeny (estery)
isokaryofylen	19,85	0,21	seskviterpeny (bicyklické)
7-methylen-2,4,4-trimethyl-2-vinylbicyklo[4.3.0.]nonan	19,95	0,39	seskviterpeny (bicyklické)
β-elemen	20,16	1,67	seskviterpeny (bicyklické)
β-karyofylen	20,39	25,01	seskviterpeny (bicyklické)
10,10-dimethyl-2,6-dimethylenbicyklo[7.2.0.]undekan	20,80	1,08	seskviterpeny (bicyklické)
β-farnesen	22,00	33,28	seskviterpeny (acyklické)
α-humulen	22,17	20,91	seskviterpeny (monocyklické)
4-methylen-1-methyl-2-(2-methyl-1-propen-1-yl)-1-vinyl-cykloheptan	22,82	0,06	seskviterpeny (monocyklické)
aristolochen	22,92	0,43	seskviterpeny (bicyklické)
aromandendren	23,08	0,11	seskviterpeny (tricyklické)
β-selinen	23,31	2,28	seskviterpeny (bicyklické)
α-selinen	23,42	2,39	seskviterpeny (bicyklické)
dioctylether	23,69	0,09	ethery
α-farnesen	23,83	0,22	seskviterpeny (acyklické)
7-epi-α-selinen	24,31	0,39	seskviterpeny (bicyklické)
methyl-dodekanoát	25,01	0,02	estery organických kyselin
α-isomethylionon	26,23	0,30	uhlovodíky
neofytadien	27,48	0,07	diterpeny
4-oktadecyl-morfolin	28,35	0,05	uhlovodíky (heterocykly)
1-dodekanol	28,49	0,07	alkoholy
karyofylenalkohol	30,38	0,02	seskviterpeny (bicyklické)
6,10,14-trimethylpentadekan-2-on	31,66	0,05	ketony
methyl-hexadekanoát	33,35	0,65	estery organických kyselin

Název sloučeniny	Retenční čas (min)	Průměrné zastoupení (%)	Zařazení
ethyl-hexadekanoát	34,04	0,03	estery organických kyselin
hexylcinnamaldehyd	36,15	0,05	fenolické sloučeniny
methyl-stearát	37,03	0,05	estery organických kyselin
13-methyl-oktadekanoát	37,50	0,04	estery organických kyselin
decyl-dekanoát	40,12	0,49	estery organických kyselin
Celkem		97,72	
Celkem (bez sloučenin se zastoupením < 0,5 %)		93,47	

Nejvíce obsaženými sloučeninami byly v průměru obou extraktů β-farnesen (33,28 %), β-karyofylen (25,01 %) a α-humulen (20,91 %). Všechny tyto tři sloučeniny patří mezi seskviterpeny, které dominovaly složení extraktu. Další sloučeniny již byly zastoupeny v mnohem nižším množství: β-myrcen (2,64 %), α-selinen (2,39 %), β-selinen (2,28 %) a γ-terpinen (1,96 %). Z hlediska biologicky aktivních látek jsou nejvýznamněji zastoupenou skupinou seskviterpenoidní uhlovodíky (88,46 %), méně poté monoterpenoidní uhlovodíky (7,16 %), estery organických kyselin (1,27 %). Grafické znázornění rozdělení látek na skupiny podává následující graf (viz. Obrázek 11):



Obrázek 11 Rozdělení aromatických sloučenin identifikovaných v extraktu z pupečníku asijského

Seskviterpenoidní uhlovodíky se vyskytují ve všech uvedených studiích, které prováděly plynovou chromatografii, jako hlavní složka extraktů nebo olejů z pupečníku asijského. Obvykle tvoří více než tři čtvrtiny celého extraktu. Tato práce rovněž potvrdila toto zjištění, stejně jako další fakt, že monoterpeny a monoterpenoidy bývají výrazně méně zastoupené, obvykle v rozmezí 0–20 % [2; 17; 18; 19; 31].

Procentuálně nejvíce obsažené složky v extraktu jsou podobném obsahům v předchozích studií. Jedná se o β-karyofylen (7,5–24,2 % Devkota a kol. [18], 23,2 % Joshi a kol. [17], 19,08 % Oyedeji a kol. [31]), a γ-karyofylen neboli isokaryofylen (9,24–32,3 % Devkota a kol. [18]), α-humulen (0,05–17,09 % Devkota a kol. [18], 23,1 % Joshi a kol. [17], 9,20 % Lee a kol. [19], 21,06 % Oyedeji a kol. [31]), β-farnesen (6,3 % Joshi a kol. [17], 1,7–18,89 % Devkota a kol. [18], 15,19 % Lee a kol. [19]) a neofytadien (5,15 % Lee a kol. [19]).

Dále byly v uvedených publikacích ve více procentech zastoupeny látky bicyklogermakren (11,22 % Oyedeji a kol. [31]), karyofylen oxid (26,8 % Sardrood a kol. [2], 3,3 % Joshi a kol. [17]), γ-kadinen (26,44 % Lee a kol. [19]), germakren B (6,29 % Oyedeji a kol. [31]) a germakren D (5,4 % Joshi a kol. [17]). V této práci však tyto sloučeniny nebyly identifikovány.

Konkrétní složení rostlinných extraktů se liší od rostliny k rostlině. V této práci bylo zjištěno neobvykle vysoké množství β-farnesenu (33,28 %), zatímco například esenciální olej Joshiho a kol. [17] jej obsahoval pouze 6,3 %. Množství α-humulenu (20,91 %) a β-karyofylenu (25,01 %) odpovídá předchozím studiím. Karyofylen oxid v pupečníkovém extraktu nebyl identifikován vůbec, přestože se jedná o často zastoupenou sloučeninu v jiných analýzách (26,8 % Sardrood a kol. [2], 3,3 % Joshi a kol. [17]). Stejně tak extrakt neobsahoval isospathulenol, který byl významně zastoupen v analýze Sardrooda a kol. (21,8 %) [2].

Různé složení aromatických látek v rostlinách je ovlivněno podmínkami růstu rostliny a jejím původem (chemotypem rostliny), mezi nimi může být faktor dostupnosti světla a mikrobiologické prostředí rostliny, které ovlivňuje produkci sekundárních metabolitů. Rostlina použitá pro experiment v této práci byla vypěstována v domácích izolovaných podmínkách, zatímco studie pocházející z Asie obvykle analyzují pupečník volně rostoucí v přírodě nebo dostupný na lokálních trzích. Data výše uvedených studií zkoumaly esenciální olej z pupečníku získaný hydrodestilací v Clevengerově aparatuře, zatímco v této práci byla použita macerace v rozpouštědle ethanolu, rovněž tedy bylo použito i jiné rozpouštědlo. Všechny tyto zmíněné odlišnosti mohly způsobit odchylky a změny ve výsledcích.

5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo vytvořit přehled a popsat účinky nejvýznamněji zastoupených skupin biologicky aktivních látek obsažených v pupečníku asijském (*Centella asiatica*), vybrat vhodné metody pro charakterizaci těchto významných sloučenin a aplikovat je na rostlinný materiál. Práce také popisuje navrhované extrakční metody pro rostlinné materiály a metody stanovení biologicky aktivních látek a shrnuje poznatky předchozích studií.

Pro extrakci byla vybrána metoda macerace s využitím 40% ethanolu jako rozpouštědlo při teplotě 60 °C po dobu 40 minut a v poměru navážky k rozpouštědlu 1:5. Ethanolové rozpouštědlo bylo vybráno na základě předchozích studií, které potvrdily vyšší naměřenou antioxidační aktivitu oproti ostatním rozpouštědlům, jeho komerční dostupnosti a bezpečnosti pro spotřebitele, pokud by byl extrakt aplikován do potravinářských výrobků.

Z analytických metod pro vhodnou charakterizaci extraktu byly vybrány tři metody: stanovení celkového obsahu fenolických látek Folin-Ciocalteuovou metodou, stanovení antioxidační aktivity metodou TEAC pomocí kation-radikálu ABTS·+ a plynová chromatografie ve spojení s headspace mikroextrakcí tuhou fází a hmotnostní spektrometrií (HS-SPME-GC-MS).

Celkový obsah fenolických látek v extraktu z pupečníku asijského byl stanoven na 0,74 ± 0,08 $mg_{GAE} \cdot g^{-1}$. Antioxidační aktivita vzorku byla 289 ± 81 $\mu g \cdot ml^{-1}$ a jeho schopnost zhášet radikál 59,34 %. Práce potvrzuje obecně uznávanou teorii, že polyfenolické látky, kterých bylo identifikováno vyšší než očekávané množství, přispívají k antioxidační aktivitě rostlinných extraktů. Tento fakt může hrát důležitou roli při konzumaci zeleniny a bylin v pestré stravě moderního člověka a také pro budoucnost nutričně vyvážené stravy, stejně tak jako pro vývoj bezpečných přírodních potravinářských aditiv a formulaci produktů.

Z celkem 47 identifikovaných aromatických látek dominovalo složení extraktu vysoké množství β-farnesenu (33,28 %), β-karyofylenu (25,01 %) a α-humulenu (20,91 %). Analýza potvrdila vysoký obsah seskviterpenoidních uhlovodíků v extraktech (88,46 %) a nižší množství monoterpenoidních uhlovodíků (7,16 %). Aromatické látky jsou důležité pro senzorickou kvalitu potraviny a provedená analýza otevírá dveře pro další aplikace tohoto aromatického extraktu do potravinářských produktů s netradiční vůní i chutí a senzoricky originálním profilem.

Pro doplnění charakteristiky extraktu by bylo vhodné provést další antioxidační testy, jako například DPPH test a FRAP test pro porovnání naměřených dat, které byly v této práci z důvodu vysoké nestálosti radikálů méně přesné. Rovněž by bylo vhodné provést vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii pro identifikaci triterpenoidních sloučenin, které jsou považovány za důležité antioxidační složky extraktu, a porovnání jejich obsahu s fenolickými látkami. Pro detailnější analýzu by bylo také vhodné provést i stanovení aromaticky aktivních látek v čerstvé krájené rostlině pro porovnání čerstvé rostliny s extraktem a účinnosti extrakčních podmínek.

Rostlina pupečník asijský (*Centella asiatica*) má široké působení na lidský organismus a budoucí analýzy by se měly věnovat přesné kvantifikaci konkrétních biologicky aktivních složek a jejich přesnému účinku na člověka, aby mohly být tyto rostlinné materiály využity jako přídavky v potravinářském průmyslu nebo i klinicky.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] NAVRÁTILOVÁ, Zdeňka. Anxiolytika přírodního původu II: Exotické rostliny. *KONTAKT* [online]. 2012, **14**(2), 200–217 [cit. 2020-04-11]. ISSN 1804-7122. Dostupné z: doi:10.32725/kont.2012.022

[2] SARDROOD, Saeedeh Ghadiri, Sara SAADATMAND, Mohammad Hassan ASSAREH a Taher Nejad SATARI. Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oils of Centella asiatica (L.). *Toxicology and Environmental Health Sciences* [online]. 2019, **11**(2), 125-131 [cit. 2020-10-25]. ISSN 2233-7784. Dostupné z: doi:10.1007/s13530-019-0397-1

[3] SABARAGAMUWA, Rasangani, Conrad O. PERERA a Bruno FEDRIZZI. Centella asiatica (Gotu kola) as a neuroprotectant and its potential role in healthy ageing. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2018, **79**, 88-97 [cit. 2020-10-26]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2018.07.024

[4] BYLKA, Wieslawa, Paulina ZNAJDEK-AWIZEN, Elzbieta STUDZINSKA-SROKA, Aleksandra DANCZAK-PAZDROWSKA a Malgorzata BRZEZINSKA. Centella asiatica in Dermatology: An Overview. *Phytotherapy Research* [online]. 2014, **28**(8), 1117-1124 [cit. 2020-06-16]. ISSN 1099-1573. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.5110

[5] BURDĚJOVÁ, Lenka. *Komplexní charakterizace léčivých rostlin a jejich potenciál při využití v potravinářském průmyslu* [online]. Brno, 2018 [cit. 2020-12-12]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=169542. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Martin Polovka.

[6] AZMIR, J., I.S.M. ZAIDUL, M.M. RAHMAN et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* [online]. 2013, **117**(4), 426-436 [cit. 2020-10-17]. ISSN 0260-8774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.0147

[7] KENNEDY, David O. a Emma L. WIGHTMAN. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. *Advances in Nutrition* [online]. 2011, **2**(1), 32-50 [cit. 2020-10-11]. ISSN 2156-5376. Dostupné z: doi:10.3945/an.110.000117

[8] BAYALA, Bagora, Imael HN BASSOLE, Riccardo SCIFO, Charlemagne GNOULA, Laurent MOREL, Jean-Marc A LOBACCARO a Jacques SIMPORE. Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. *American Journal of Cancer Research* [online]. 2014, **4**(6), 591-607 [cit. 2020-11-16]. ISSN 2156-6976. PMID: 25520854. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4266698/

[9] MAN, Shuli, Wenyuan GAO, Yanjun ZHANG, Luqi HUANG a Changxiao LIU. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia* [online]. 2010, **81**(7), 703-714 [cit. 2020-05-12]. ISSN 0367-326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2010.06.004

[10] HASHIM, Puziah, Hamidah SIDEK, Mohd Helme M. HELAN, Aidawati SABERY, Uma Devi PALANISAMY a Mohd ILHAM. Triterpene Composition and Bioactivities of Centella asiatica. *Molecules* [online]. 2011, **16**(2), 1310-1322 [cit. 2020-11-10]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules16021310

[11] CHONG, N.J. a Z. AZIZ. A systematic review on the chemical constituents of Centella asiatica. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* [online]. 2011, **2**(3), 445-459 [cit. 2020-04-24]. ISSN 0975-8585.
Dostupné z: https://www.rjpbcs.com/pdf/2011_2(3)/53.pdf

[12] ORHAN, Ilkay Erdogan. Centella asiatica (L.) Urban: From Traditional Medicine to Modern Medicine with Neuroprotective Potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2012, **2012** [cit. 2020-05-12]. ISSN 1741-427X. Dostupné z: doi:10.1155/2012/946259

[13] Asiatic acid. *National Center for Biotechnology Information: PubChem Database* [databáze online]. Bethesda (Maryland) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Asiatic-acid

[14] Asiaticoside. *National Center for Biotechnology Information: PubChem Database* [databáze online]. Bethesda (Maryland) [cit. 2020-11-10]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/108062

[15] Madecassic acid. *National Center for Biotechnology Information: PubChem Database* [databáze online]. Bethesda (Maryland) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/73412

[16] Asiaticoside A. *National Center for Biotechnology Information: PubChem Database* [databáze online]. Bethesda (Maryland) [cit. 2020-11-10]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/45356919

[17] JOSHI, Virendra P., Neeraj KUMAR, Bikram SINGH a R. P. CHAMOLI. Chemical Composition of the Essential Oil of Centella asiatica (L.) Urb. from Western Himalaya. *Natural Product Communications* [online]. 2007, **2**(5), 587-590 [cit. 2020-11-16]. ISSN 1555-9475. Dostupné z: doi:10.1177/1934578X0700200515

[18] DEVKOTA, Anjana, Stefano DALL' ACQUA, Stefano COMAI, Gabriella INNOCENTI a Pramod Kumar JHA. Chemical Composition of Essential Oils of Centella asiatica (L.) Urban from Different Habitats of Nepal. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive* [online]. 2013, **4**(2), 300-304 [cit. 2021-07-12]. ISSN 0976-3333. Dostupné z: http://www.ijpba.info/ijpba/index.php/ijpba/issue/view/21

[19] LEE, Tan K. a Charles S. VAIRAPPAN. Antioxidant, antibacterial and cytotoxic activities of essential oils and ethanol extracts of selected South East Asian herbs. *Journal of Medicinal Plants Research* [online]. 2011, **5**(21), 5284-5290 [cit. 2020-10-25]. ISSN 1996-0875. Dostupné z: doi:10.5897/JMPR.9000230

[20] GALANAKIS, Charis M. *Polyphenols - Properties, Recovery, and Applications* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2018, s. 5-15 [cit. 2021-01-25]. ISBN 978-0-1281-3573-0. Dostupné z: https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpPPRA0006/polyphenols-properties/polyphenols-properties

[21] RATTANAKOM, Supawan a Patchanee YASURIN. Chemical Profiling of Centella asiatica under Different Extraction Solvents and its Antibacterial Activity, Antioxidant Activity. *Oriental Journal of Chemistry* [online]. 2015, **31**(4), 2453-2459 [cit. 2020-10-25]. ISSN 0970-020X. Dostupné z: doi:10.13005/ojc/310480

[22] MOHAMMAD AZMIN, Siti Nuurul Huda a Mohd Shukri MAT NOR. Chemical fingerprint of Centella Asiatica's bioactive compounds in the ethanolic and aqueous extracts. *Advances in Biomarker Sciences and Technology* [online]. 2020, **2**, 35-44 [cit. 2020-10-25]. ISSN 2543-1064. Dostupné z: doi:10.1016/j.abst.2020.10.001

[23] HASHIM, Puziah. MiniReview Centella asiatica in food and beverage applications and its potential antioxidant and neuroprotective effect. *International Food Research Journal* [online]. 2011, **18**(4), 1215-1222 [cit. 2020-11-04]. ISSN 2231-7546. Dostupné z: http://ifrj.upm.edu.my/18%20(04)%202011/(1)IFRJ-2011-013.pdf

[24] *Public statement on Centella asiatica (L.) Urban, herba* [online]. London: European Medicines Agency, 2010 [cit. 2021-07-12]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/final-public-statement-centella-asiatica-l-urban-herba-first-version_en.pdf

[25] WONGFHUN, Pronprapa, Michael H. GORDON a Arunee APICHARTSRANGKOON. Flavour characterisation of fresh and processed pennywort (Centella asiatica L.) juices. *Food chemistry* [online]. 2010, **119**(1), 69-74 [cit. 2020-05-23]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.072

[26] PURKRTOVÁ, Sabina. *Metody konzervace potravin v potravinářské mikrobiologii* [online]. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: http://old-biomikro.vscht.cz/vyuka/mzp/2017-03-10_MZP_METODY_KONZERVACE_POTRAVIN.pdf

[27] RASID, N.A.M., N.N.M. NAZMI, M.I.N. ISA a N.M. SARBON. Rheological, functional and antioxidant properties of films forming solution and active gelatin films incorporated with Centella asiatica (L.) urban extract. *Food Packaging and Shelf Life* [online]. 2018, **18**, 115-124 [cit. 2021-03-11]. ISSN 2214-2894. Dostupné z: doi:10.1016/j.fpsl.2018.10.002

[28] OROIAN, Mircea a Isabel ESCRICHE. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International* [online]. 2015, **74**, 10-36 [cit. 2021-02-07]. ISSN 0963-9969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2015.04.018

[29] SADGROVE, Nicholas a Graham JONES. A Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. *Agriculture* [online]. 2015, **5**(1), 48-102 [cit. 2020-04-25]. ISSN 2077-0472. Dostupné z: doi:10.3390/agriculture5010048

[30] SAMADI, Mahtab, Zurina Zainal ABIDIN, Robiah YUNUS, Dayang Radiah AWANG BIAK, Hiroyuki YOSHIDA a Eng Hai LOK. Assessing the kinetic model of hydro-distillation and chemical composition of Aquilaria malaccensis leaves essential oil. *Chinese Journal of Chemical Engineering* [online]. 2017, **25**(2), 216-222 [cit. 2020-10-21]. ISSN 1004-9541. Dostupné z: doi:10.1016/j.cjche.2016.09.006

[31] OYEDEJI, O.A. a A.J. AFOLAYAN. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of Centella asiatica. Growing in South Africa. *Pharmaceutical Biology* [online]. 2005, **43**(3), 249-252 [cit. 2020-06-21]. ISSN 1388-0209. Dostupné z: doi:10.1080/13880200590928843

[32] BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2004, **94**(3), 223-253 [cit. 2021-07-12]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

[33] MINIJA, J. a J.E. THOPPIL. Antimicrobial activity of Centella asiatica (L.) Urb. essential oil. *Indian Perfumer* [online]. 2003, **47**(2), 179-181 [cit. 2021-04-25]. ISSN 0019-607X. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/332104268_Antimicrobial_activity_of_Centella_asiatica_L_Urb_essential_oil

[34] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy* [online]. 2004, **98**(4), 174-179 [cit. 2021-02-07]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf

[35] HAO, Zhenxia, Qinqin ZHENG, Lili JIN, Sujuan ZHOU, Hongping CHEN, Xin LIU a Chengyin LU. Rapid measurement of total polyphenol content in tea by kinetic matching approach on microfluidic paper-based analytical devices. *Food Chemistry* [online]. 2021, **342** [cit. 2021-02-10]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.128368

[36] CICCO, Nunzia, Maria T. LANORTE, Margherita PARAGGIO, Mariassunta VIGGIANO a Vincenzo LATTANZIO. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* [online]. 2009, **91**(1), 107-110 [cit. 2021-02-10]. ISSN 0026-265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2008.08.011

[37] PROCHÁZKOVÁ, Dana. Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů. *Chemické listy* [online]. 2002, **96**, 827–852 [cit. 2021-01-31]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin334/bulletin334.pdf

[38] HOLČAPEK, Michal. Hmotnostní spektrometrie: 6. přednáška. *Michal Holčapek: Mass Spectrometry Group @ University of Pardubice* [online]. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2006-2021 [cit. 2021-02-01].
Dostupné z: https://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf

[39] KAUR, Ishtdeep, Nancy SUTHAR, Jasmeen KAUR, Yogita BANSAL a Gulshan BANSAL. Accelerated Stability Studies on Dried Extracts of Centella asiatica Through Chemical, HPLC, HPTLC, and Biological Activity Analyses. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2016, **21**(4), 127-137 [cit. 2021-02-07]. ISSN 2156-5899. Dostupné z: doi:10.1177/2156587216661468

[40] ČAKOVÁ, Adriana. *Stanovení antimikrobiální a antioxidační aktivity vybraných bylinných extraktů* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-12]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131340. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.

[41] CHMELOVÁ, Nikola. *Charakterizace bylin rodu Plectrantus pro využití v potravinářství* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-12]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131335. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.

[42] Statistické tabulky. *Veterinární univerzita Brno* [online]. [cit. 2021-06-25]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/stat/FVHE/Teorie/tabulky.htm#Dixon

[43] BYAKODI, Manisha K., Zabin K. BAGEWADI a Uday M. MUDDAPUR. Phytoconstituents Profiling and Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Attributes of Methanolic Extract of Centella asiatica. *Research journal of pharmaceutical biological and chemical sciences* [online]. 2018, **9**(3), 493-500 [cit. 2021-06-27]. ISSN 0975-8585. Dostupné z: https://www.rjpbcs.com/pdf/2018_9(3)/[59].pdf

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ABTS 2,2‘-azinobis(3-etylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)

BHA butylhydroxyanizol

CATTF *Centella asiatica* total triterpenic fraction

CI chemická ionizace *(chemical ionization)*

DPPH 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl

EAE enzymově asistovaná extrakce (*enzyme assisted extraction*)

EI elektronová ionizace *(electron ionization)*

ETCA Estratto Titolato di *Centella asiatica*

FRAP antioxidační potenciál redukce železnatých kationtů (*ferric reducting/antioxidant power)*

GAE ekvivalent kyseliny gallové *(gallic acid equivalent)*

GC plynová chromatografie *(gass chromatography)*

GC-FID plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (*gas-chromatography – flame ionization detector)*

GC-MS plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (*gas-chromatography mass-spectrometry)*

GRAS obecně uznávané za bezpečné (*generally recognised as safe)*

HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie *(high performance liquid chromatography)*

HPP paskalizace (*high pressure processing)*

HRSCA (*hydroxyl radical-scavenging capacity assay)*

HS sorpce z prostoru par *(headspace)*

HS-SPME-GC-MS plynová chromatografie ve spojení s headspace mikroextrakcí tuhou fází a hmotnostní spektrometrií (*headspace solid-phase micro-extraction gas-chromatography mass-spectrometry*)

IT iontová past *(ion trap)*

LC kapalinová chromatografie *(liquid chromatography)*

MAE mikrovlnná extrakce *(microwave assisted extraction*)

MBC minimální baktericidní koncentrace *(minimum bactericidal concentration)*

MIC minimální inhibiční koncentrace *(minimum inhibitory concentration)*

ORAC kapacita absorpce kyslíkových radikálů (*oxygen radical absorbance capacity*)

PAD pulzní amperometrický detektor (*pulsed amperometric detector)*

PDA fotodiodový detektor *(photodiode array)*

PEF extrakce využívající pulzní elektrické pole (*pulsed electric field assisted extraction*)

PLE vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (*pressurized liquid extraction*)

Q kvadrupólový analyzátor *(quadrupole)*

SFE superkritická fluidní extrakce (*supercritical fluid extraction*)

SPE extrakce na tuhou fázi *(solid-phase extraction)*

SPME mikroextrakce tuhou fází *(solid-phase micro-extraction)*

TAA celková antioxidační kapacita (*total antioxidant capacity*)

TEAC ekvivalent antioxidační kapacity Troloxu *(trolox equivalent antioxidant capacity)*

TECA titrated extract of *Centella asiatica*

TOF analyzátor doby letu *(time of flight)*

TPC celkový obsah fenolických látek *(total phenolic content)*

TROLOX 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina

TTF total triterpenic fraction

TTFCA total triterpenoid fraction of *Centella asiatica*

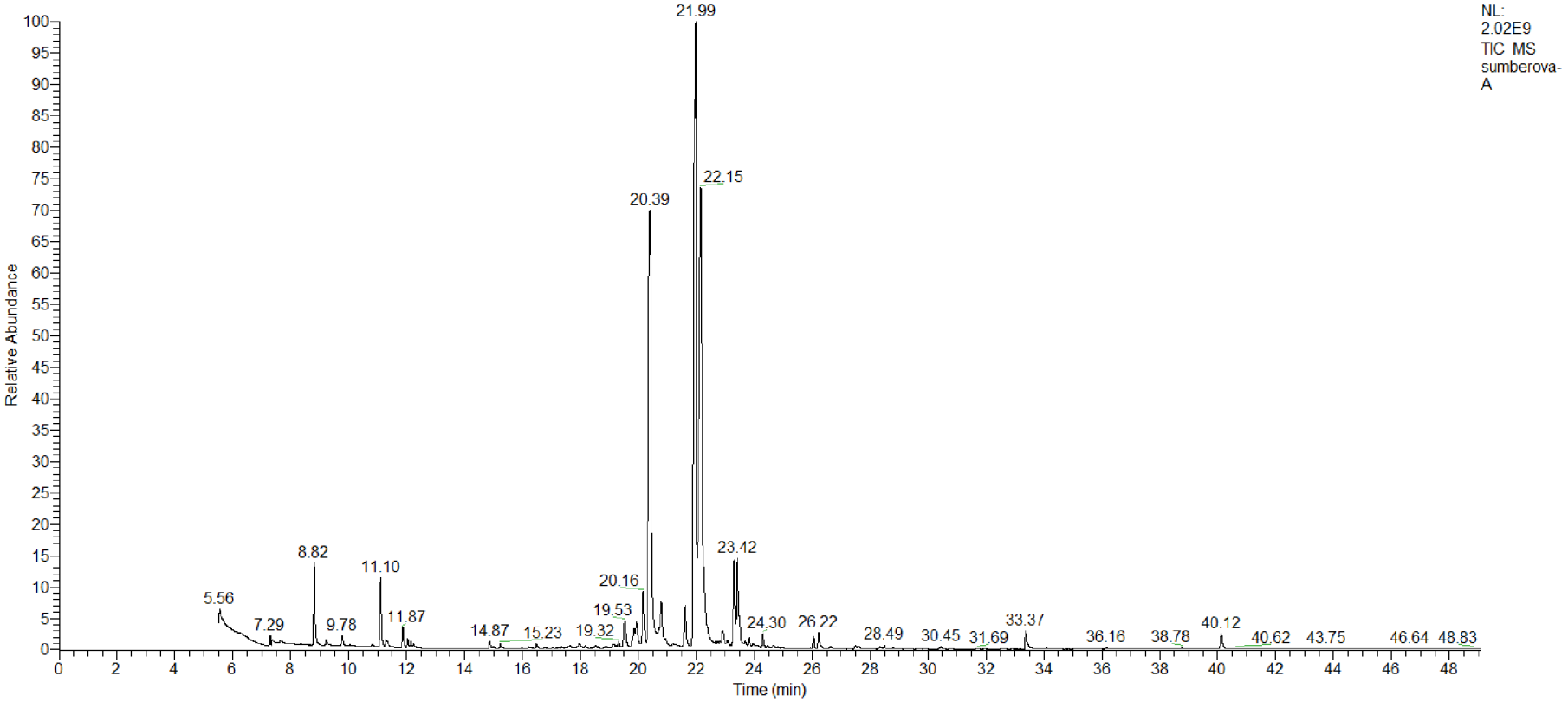
UAE ultrazvuková extrakce *(ultrasound assisted extraction)*

UV ultrafialové *(ultraviolet)*

VIS viditelné *(visible)*

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Chromatogram aromatických látek pupečníku asijského (*Centella asiatica*): identifikace sloučenin podle retenčních časů (viz. Tabulka 11)

9 PŘÍLOHY

Příloha 1 Chromatogram aromatických látek pupečníku asijského *(Centella asiatica):* identifikace sloučenin podle retenčních časů (viz. Tabulka 11)