

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Antimikrobiální aktivita derivátů thymochinonu

Diplomová práce

Kateřina Hanková

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

Ing. Pavel Nový, Ph.D.,

Mgr. Petr Maršík, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Antimikrobiální aktivita derivátů thymochinonu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. 4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli Ing. Pavlu Novému, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Petru Maršíkovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup, cenné rady a trpělivost při tvorbě této diplomové práce.

Dále mé poděkování patří členům Katedry kvality a bezpečnosti potravin za podporu při práci a neutuchající zájem o mé výzkumné téma. Mé poděkování také patří Ing. Jaroslavovi Kurfürstovi za konzultaci se statistickým zpracováním výsledků, Mgr. Barboře Hankové, Mgr. Václavu Špillarovi, PhD. a Mgr. Magdaléně Hrnkové za korekturu práce. Velké poděkování náleží firmě Hanka Mochov, s.r.o. za darování čerstvých rostlin tymiánu pro výzkumnou část této práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za mimořádnou podporu a pochopení při studiu.

Antimikrobiální aktivita derivátů thymochinonu

Souhrn

Bioaktivní látky rostlin, které jsou ve velké míře zastoupeny sekundárními metabolity, byly využívány lidmi skrze rostliny již od nepaměti. Na jejich účincích se dodnes zakládají některá tradiční léčitelství, např. ajurvédská či tradiční čínská medicína. Jelikož rostliny stále poskytují široké množství látek, jejichž účinky ještě nebyly objeveny, jsou tyto produkty metabolismu rostlin stále v zájmu vědecké společnosti. V případě analýzy účinných látek v rostlinách čeledi hluchavkovité se výzkum často zaměřuje na analýzu silic, zatímco tato studie je soustředěna na mnohdy opomíjené glykosilované deriváty, které by mohly mít vysoké uplatnění např. v potravinářském a farmaceutickém průmyslu.

Cílem této práce je analýza derivátů thymochinonu a ověření jejich antimikrobiální aktivity. Konkrétně byly vybrány deriváty thymohydrochinon a zatarosid B. Studie je rozšířena o zmapování výskytu příbuzných látek thymochinonu, konkrétně glykosidicky vázaných terpenů u vybraných rostlin z čeledi hluchavkovitých (*Origanum majorana*, *Origanum vulgare*, *Satureja hortensis*, *Thymus serpyllum*, *Thymus vulgaris* a *Zataria multiflora*).

Antimikrobiální aktivita byla testována pomocí mikrodiluční metody proti vybraným grampozitivním bakteriím (*S. aureus*, *B. cereus*) a gramnegativní bakterii (*E. coli*). Pro analýzu a identifikaci vybraných látek v rostlinách byla nejprve optimalizována extrakční metoda a vybrané frakce následně analyzovány pomocí UHPLC–MS/MS.

Byla zjištěna schopnost thymohydrochinonu inhibovat pouze grampozitivní bakterie s minimální inhibiční koncentrací 8 µg/ml, zatímco glykosid zatarosid při použitém rozsahu koncentrací (≤ 128 µg/ml) nebyl aktivní proti žádné z testovaných bakterií. Dále bylo identifikováno až 24 derivátů thymochinonu a jemu příbuzného thymolu v závislosti na rostlinném druhu. Nejvíc těchto derivátů bylo detekováno v tymiánu obecném (*T. vulgaris*), který většinou vykazoval i jejich nejvyšší relativní obsah ze sledovaných rostlin. Souběžně se ukázalo, že tymián převyšuje svým obsahem zatarosidu B i *Z. multiflora*, která byla dosud popisována jako jeho jediný ověřený zdroj. V případě jeho izomeru, zatarosidu A, který byl zatím pouze předběžně identifikován, byl vyšší obsah stanoven u rostliny *Z. multiflora*.

Tato práce by mohla být výchozím bodem pro detailnější prozkoumání biologické aktivity analyzovaných glykosilovaných derivátů a identifikaci jejich možného využití v oblasti potravinářského či farmaceutického průmyslu.

Klíčová slova: deriváty thymochinonu, zatarosid, glykosidy, antimikrobiální aktivita, mikrodiluční metody, tymián

Antimicrobial activity of thymoquinone derivatives

Summary

Bioactive phytochemicals, largely represented by secondary plant metabolites, have been used in natural remedies for thousands of years; for example, in traditional Chinese or Ayurvedic medicine. However, a large number of these metabolites and their effects still remain unknown, providing a broad venue for scientific study. In the Lamiaceae family species most of the research concentrates on the analysis of essential oils. By contrast, in this study the often neglected glycosidically bound derivatives are analyzed.

This thesis focuses on the analysis of thymoquinone derivatives and testing of their antimicrobial activity. For this purpose, thymohydroquinone and zataroside B were selected. The study was further extended by mapping of thymoquinone-related compounds, specifically, of glycosidically bound terpenes and their distribution in selected species of the Lamiaceae family (*Origanum majorana*, *Origanum vulgare*, *Satureja hortensis*, *Thymus serpyllum*, *Thymus vulgaris* and *Zataria multiflora*).

The antimicrobial activity was tested using the microdilution technique on selected gram-positive (*S. aureus*, *B. cereus*) and gram-negative (*E. coli*) bacteria. For the purpose of the analysis and selected plant compounds identification, the extraction method was optimized and chosen fractions were subsequently analyzed using UHPLC-MS/MS

Thymohydroquinone was found to inhibit gram-positive bacteria at concentrations above 8 µg/ml. In contrast, zataroside glycoside showed no inhibiting effect against any of the studied bacteria at examined concentration range (≤ 128 µg/ml). Moreover, up to 24 thymoquinone and thymol derivatives were identified across the specimen. The highest number of these derivatives was detected in *T. vulgaris* which also exhibited the greatest relative concentrations of all the examined species. The concentration of zataroside B in *T. vulgaris* was found to exceed the concentration detected in *Z. multiflora*; up to now considered its only confirmed source. In case of preliminarily identified zataroside A isomer, higher concentration was, however, found in *Z. multiflora*.

This study provides a starting point for a more detailed investigation of biological activity in studied glycosylated derivatives and identifies their potential for food or pharmaceutical industry applications.

Keywords: thymoquinone derivatives, zataroside, glucosides, antimicrobial activity, microdilution method, thyme

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Léčivé rostliny	11
3.2 Čeled' hluchavkovité	11
3.2.1 Zástupci hluchavkovitých v ČR.....	12
3.2.1.1 Rod Thymus.....	12
3.2.1.2 Saturejka zahradní (<i>Satureja hortensis</i> L.)	12
3.2.1.3 Dobromysl obecná (<i>Origanum vulgare</i> L.)	13
3.2.1.4 Majoránka zahradní (<i>Origanum majorana</i> L.)	13
3.2.1.5 <i>Zataria multiflora</i> Boiss.	13
3.3 Bioaktivní látky	14
3.3.1 Monoterpeny	14
3.3.2 Chinony.....	14
3.3.2.1 Thymochinon	15
3.3.2.2 Thymohydrochinon.....	16
3.3.2.3 Dithymochinon	16
3.3.3 Glykosidy.....	16
3.3.3.1 Rostlinné glykosidy	17
3.3.3.2 Zatarosid	17
3.4 Vybraní zástupci patogenních bakterií	18
3.4.1 <i>Staphylococcus Aureus</i>	18
3.4.2 <i>Bacillus Cereus</i>	19
3.4.3 <i>Escherichia Coli</i>	19
4 Metodika	20
4.1 Extrakce z hluchavkovitých	20
4.1.1 Optimalizace procesu macerace hluchavkovitých.....	20
4.1.1.1 Pilotní metodika macerace sušeného tymiánu	20
4.1.1.2 Macerace čerstvého a sušeného tymiánu	20
4.1.1.3 Optimalizovaný postup pro maceraci sušených vzorků	21
4.1.2 Úprava vzorku po maceraci	21
4.1.3 Extrakce vzorku	22
4.1.4 Proces optimalizace extrakce tymiánu.....	22
4.1.5 Optimalizovaná metoda extrakce tymiánu	23
4.2 Analýza jednotlivých fází extrakce	23
4.2.1 Analýza UHPLC–MS/MS	23

4.3	Mikrodiluční testy	24
4.3.1.1	Příprava inokula	24
4.3.1.2	Příprava koncentrační řady sledované látky	25
4.3.1.3	Mikrodiluční testy	25
5	Výsledky.....	27
5.1	Kvalitativní analýza UHPLC/MS	27
5.2	Testování antimikrobiální aktivity	33
6	Diskuze	34
7	Závěr	37
8	Literatura.....	38
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	43

1 Úvod

Bezpečnost potravin je stále vysokou prioritou pro společnost, a tedy se na ni stále zaměřuje celá řada vědeckých skupin. Důležitou oblastí bezpečnosti potravin je inhibice kontaminujících mikroorganismů způsobujících kažení a otravy z potravin (Adam & Moss 2010; Demnerová 2012). J Jednou z možných cest ochrany potravin před činností mikroorganismů je využívání bioaktivních látek obsažených v rostlinách. Tyto účinné látky zahrnují i skupinu tzv. sekundárních metabolitů rostlin, které je produkují jako součást obranných mechanismů, nebo jako atraktanty se záměry rozmnožování, či signální molekuly. Mezi sekundární metabolity můžeme řadit také monoterpeny, které se v rostlinách vyskytují volně nebo ve formě glykosidů. Významným znakem volných monoterpenů je jejich těkavost, která umožňuje snadnou destilací jejich získání z rostlinných silic (Sarer et al. 1982; Dvořáková et al. 2011; Tauchen & Klouček 2020).

Mou osobní motivací k výběru tématu je zájem o možnosti a rozvoj fytotherapie. Považuji za důležité, že moderní věda může poskytovat oporu pro sofistikované každodenní zacházení s léčivými rostlinami. Zvolené téma mi umožnilo nahlédnout na principiálně podobná využití rostlin v lidovém léčitelství různých kultur v historickém kontextu. Ačkoli jsou tyto úvahy zajímavé, tato práce se plně vztahuje k biochemickému pohledu na zvolenou problematiku.

Cílem této diplomové práce je analýza derivátů thymochinonu (TQ) a testování jejich antimikrobiální aktivity. Konkrétně byly vybrány deriváty thymohydrochinon (THQ) a zatarosid (ZAT). Studie je rozšířena o zmapování výskytu příbuzných látek thymochinonu, konkrétně glykosidicky vázaných terpenů, u rostlin z čeledi hluchavkovitých. Východisky této práce jsou dvě publikované studie vzájemně související zacílením na identifikaci derivátů thymochinonu. V první publikaci byla popsána izolace těchto derivátů z rostliny *Nigella sativa*, která se vyskytuje v oblasti Středoziemního moře, Pákistánu a Indie a je využívána lidovým léčitelstvím po staletí (Gali-Muhtasib et al. 2006). V druhé studii byly thymochinon, thymohydrochinon a dithymochinon identifikovány i ve vybraných rostlinách čeledi hluchavkovité našeho regionu (Taborsky et al. 2012).

Čeď hluchavkovitých je velmi významnou skupinou v oblasti léčivých rostlin především díky obsahu účinných látek v jejich silici, kterých obsahuje celou řadu. Patří mezi ně hlavně thymol, karvakrol, cymol, karvon, kafr, p-cymen, aj. Dalšími významnými látkami jsou pak třísloviny, hořčiny či glykosidy. Zejména díky obsahu účinných látek v rostlinách čeledi hluchavkovitých je řada jejich zástupců využívána v potravinářství či farmakologii. Například u eugenolu, thymolu či metholu byla prokázána inhibice růstu mikroorganismů na potravinách a s tím spojený jejich potenciál jako přírodních konzervantů (Korbelář & Endris 1981).

Tato studie je prvním krokem k pochopení potenciálu těchto derivátů jako látek více rozpustných ve vodě. S ohledem na skutečnost, že vědecké studie biologicky účinných látek v rostlinách čeledi hluchavkovitých se zpravidla zaměřují na analýzu silic (Karapinar & Esen Aktuğ 1987; Ghannadi 2002; Skočibušić et al. 2006), se analýza v této práci se soustředí na méně prostudované glykosilované deriváty. Domnívám se, že tyto látky by mohly mít širší

využití např. v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Studií chceme navázat na několik výzkumů, ve kterých byly izolovány a identifikovány nové monoterpenoidní glykosidy z rostlin (Kitajima et al. 2004; Takeuchi et al. 2004; Koukoulitsa et al. 2006).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Vědeckými hypotézami pro tuto studii jsou:

- specifická změna chemické struktury bude mít vliv na antimikrobiální aktivitu;
- deriváty thymochinonu, jako například zatarosidy izolované doposud pouze z rostliny *Zataria multiflora*, mohou být přítomny i v dalších druzích čeledi hluchavkovitých s vysokým obsahem patřičných prekurzorů.

Hlavním cílem práce je ověření antimikrobiální aktivity derivátů thymochinonu. Dílčím cílem je prověřit jejich výskyt v různých druzích rostlin z čeledi hluchavkovitých.

3 Literární rešerše

3.1 Léčivé rostliny

Historie využití léčivých rostlin je velmi obsáhlá v nejstarších kulturách i v našich zemích. Například první česky psaný herbář *Knieha lékarská, kteráž slove Herbář aneb Zelinář* lékaře Jana Černého je datován již k roku 1517 (Janča & Zentrich 1995a). Jelikož syntetické léky jsou záležitostí převážně moderní společnosti, zhruba posledních stopadesáti let, je zřejmé, že se lidé v minulosti spoléhali na přírodní formu léčitelství. I přes dostupnost moderních farmak jsou léčivé účinky rostlin dodnes ceněny, zejména v tradiční čínské či ajurvédské medicíně.

Celá řada rostlin je označována za léčivé a využívána pro účinky tzv. sekundárních metabolitů rostlin. Tato skupina zahrnuje širokou skupinu látek, jež slouží jako mediátory mezi organismem a prostředím. Funkce sekundárních metabolitů rostlin je velmi rozmanitá, od využití v ochranných mechanismech, zprostředkování rozmnožování, až funkce signálních molekul (Karapinar & Esen Aktuğ 1987; Wink 2015; Tauchen & Klouček 2020).

3.2 Čeleď hluchavkovité

Hluchavkovité, *Lamiaceae*, je významnou čeledí, jež má své široké využití především v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Jedná se o čeleď čítající zhruba 220 rodů, které jsou rozšířené po celém světě, přičemž jen v České republice je rozšířeno okolo 35 z nich. Jedná se o jednoleté, dvouleté i vytrvalé rostliny, jež jsou charakterizovány květem s jednoduchou či větvenou čtyřhrannou lodyhou. Jednoduché listy jsou postavené většinou vstřícně a křížmostojně, bez palistů. Květy bývají převážně souměrné oboupohlavné (Korbelář & Endris 1981).

Mnoho zástupců této čeledi je známých pro své léčivé účinky. Ve starší literatuře mj. uváděno jejich použití při léčbě dýchacího a trávicího ústrojí, či jako obklady na rány. Nálevy z tymiánu jsou například doporučovány pro léčbu chronických zánětů průdušek či proti černému kašli (Korbelář & Endris 1981). Rostliny čeledi hluchavkovitých se vyznačují především antimikrobiálními účinky, které jsou dány vysokým obsahem účinných látek v silici, terpeny či fenolickými látkami, zejména thymolem, karvakrolem a p-cymenem. Dalšími zastoupenými látkami jsou pak třísloviny, hořčiny či glykosidy. Obsah těchto látek kolísá a je závislý na chemotypu rostlin (Korbelář & Endris 1981; Karapinar & Esen Aktuğ 1987; Cosentino et al. 1999; Oussalah et al. 2007; Epps et al. 2015; Marchese et al. 2016). Zvláště monoterpeny, thymol a karvakrol, působí proti velkému množství bakterií, a proto jsou často využívány v potravinářství jako přirozené konzervanty a prodlužují tak životnost potravin. V roce 2003 byla provedena studie, která zkoumala schopnost několika druhů koření (mj. tymián, saturejka či dobromysl) inhibovat růst 12 druhů patogenních bakterií vyskytujících se v potravinách. Byla potvrzena schopnost těchto látek inhibovat růst bakterií, při zvýšené citlivosti gram-pozitivních (Nevas et al. 2004).

3.2.1 Zástupci hluchavkovitých v ČR

Tato velmi široká čeleď zahrnuje obecně známé druhy. Mezi ty nejznámější můžeme řadit rody: bazalka, dobromysl, levandule, majoránka, máta, mateřídouška, meduňka, rozmarýn, saturejka či šalvěj. Ty jsou bohatě využívány v kuchyních a domácnostech, v lidovém povědomí jsou známé i jako „léčivky“.

3.2.1.1 Rod *Thymus*

Již po staletí jsou zástupci rodu *Thymus* využívány pro své léčivé účinky. První zmínky jsou již ve spisech ze starověkého Říma, Řecka či Egypta. Mateřídouška (*Thymus serpyllum*) a tymián (*Thymus vulgaris*) jsou využívány zejména pro své antimikrobiální, antiseptické, antirevmatické, diuretické či sedativní účinky. Také jsou známy jeho pozitivní účinky na imunitní systém k podpoře obranyschopnosti proti běžným nemocem, jako je nachlazení, chřipka či infekce. Hlavní podíl na tom má vysoký obsah silic zahrnující převážně cymen, thymol či karvakrol. Dále tyto rostliny obsahují např. třísloviny, saponiny či flavony (Janča & Zentrich 1995b; Nikolić et al. 2014; Jarić et al. 2015).

3.2.1.1.1 Tymián obecný (*Thymus vulgaris* L.)

Tymián obecný je jedním z nejznámějších zástupců čeledi hluchavkovitých. Původem pochází ze Středozeří, odkud se rozšířil i k nám. Jedná se o trvalku s výškou lodyhy do 30 cm a s květy nachové barvy na konci jara a začátku léta. Je známým přírodním antibiotikem, a to zejména díky vysokému obsahu thymolu v silici (Korbelář & Endris 1981; Janča & Zentrich 1995c). Právě obsah thymolu (40–50 % hm.), dále pak p-cymen (20–30 % hm.), γ -terpinen (20 % hm.), linaloolu (7 % hm.) či karvakrolu (1 % hm.), způsobuje vysokou schopnost inhibice grampozitivních a gramnegativních bakterií, i kvasinek (Cosentino et al. 1999; Nevas et al. 2004; Nikolić et al. 2014; Tauchen & Klouček 2020).

3.2.1.1.2 Mateřídouška úzkolistá (*Thymus serpyllum* L.)

Mateřídouška úzkolistá, známá také jako divoký tymián, je polokeř s lodyhami, které jsou dlouhé 10–50 cm. Listy jsou vstřícné, dlouhé asi 5–15 mm, květy jsou drobné, světle až tmavě fialové. Kvete od dubna do září. Je druhem rozšířeným po střední Evropě, na Balkáně či západní Asii. V lidovém léčení byla používána na záněty (vnitřní i vnější použití), na dýchací obtíže či dezinfekci močových cest. Obsah silice je obdobný jako u tymiánu obecného, tedy nejvíce je zastoupen thymol (okolo 40 % hm.), následně p-cymen (okolo 10 % hm.), γ -terpinen (přes 7 % hm.) aj. Obsahy těchto látek jsou jako u většiny rostlin ovlivněny regionem výskytu, obdobím sklizně a částí rostlin (Pilát & Ušák 1960; Janča & Zentrich 1995b; Nikolić et al. 2014; Jarić et al. 2015).

3.2.1.2 Saturejka zahradní (*Satureja hortensis* L.)

Stejně jako tymián i saturejka pochází ze Středozeří, odkud se rozšířila do naší oblasti mírného pásma. Lodyha obvykle dorůstá výšky okolo 20–25 cm, kvete od července do září. Je využívána

její nať jako koření v gastronomii. Jako „léčivka“ se podílí na snížení krevního tlaku, pomáhá při onemocnění trávicího traktu a má baktericidní účinky.

Hlavními obsahovými složkami jsou silice, dále pak třísloviny, pryskyřice a minerální látky. Její silice obsahuje zejména karvakrol (přes 50 % hm.), p-Cymen a γ -Terpinen (okolo 10 % hm.), což má za následek vysokou schopnost inhibovat růst bakterií (Janča & Zentrich 1996; Hajhashemi et al. 2000; Ghannadi 2002; Nevas et al. 2004).

3.2.1.3 Dobromysl obecná (*Origanum vulgare* L.)

Dobromysl neboli oregano, je velmi rozšířenou rostlinou v Evropě i Asii. Jedná se o trvalku s lodyhou dosahující okolo 0,5 m. Květy mají růžové až fialové zbarvení. V lidovém léčitelství je známa především pro svoji schopnost tlumit křeče, či jako lék na suchý, dráždivý kašel. Jak již její název napovídá, jedná o přírodní antidepresivum. Využívaná je též ve velké míře v gastronomii po celém světě (Janča & Zentrich 1995a).

V roce 2000 byla publikována studie zaměřená na glykosidicky vázané aglykony v dobromysli obecné a jejich antioxidační schopnosti. Hlavní detekovanou složkou byl označen thymochinon s obsahem zhruba 40 %, následován benzylalkoholem (8,9 %), eugenolem (7,5 %) aj. Aglykony byly následně porovnány se silicí a vykazovaly obdobné antioxidační účinky, ovšem samostatné obsahové látky jako jsou thymol či thymochinon vykazovaly antioxidační schopnost nižší. Tato skutečnost mimo jiné poukazuje na důležitost synergického působení látek v rostlinách (Milos et al. 2000).

3.2.1.4 Majoránka zahradní (*Origanum majorana* L.)

Majoránka je bylinou, jejíž lodyha dosahuje výšky až 0,5 m. Má drobné bílé až fialové květy. Kvete převážně v letních měsících. Známe jsou především její léčivé účinky podporující trávení a účinky protizánětlivé a dezinfekční. I proto je velmi využívaným kořením v gastronomii (Janča & Zentrich 1995b).

Jako u většiny rostlin čeledi hluchavkovitých je hlavní účinnou složkou silice, konkrétně thymol a karvakrol (Sarer et al. 1982). Z *Origanum majorana* byly již roku 1986 izolovány fenolické glykosidy a methyларbutin. Arbutin je známý především pro své využití při urologických obtížích (Assaf et al. 1987).

3.2.1.5 *Zataria multiflora* Boiss.

Zataria multiflora, známá také jako Shiraz Thyme, je u nás téměř neznámým zástupcem čeledi hluchavkovitých. Volně roste především v oblasti Iránu, Afghánistánu a Pákistánu. Silice obsahuje především karvakrol (27–80 %) a thymol (25–40 %) v závislosti na ekotypu (Shafiee & Javidnia 1997; Zomorodian et al. 2011).

Jedná se o rostlinu využívanou v lidovém léčitelství íránské oblasti pro její prokázané protizánětlivé účinky u akutních i chronických zánětů. Dále vykazuje antiseptické, antibakteriální či antispasmodické účinky (Hosseinzadeh et al. 2000; Saei-Dehkordi et al. 2010).

3.3 Bioaktivní látky

3.3.1 Monoterpeny

Většina účinných látek obsažených v silici rostlin, např. kafr, karvakrol či p-cymen, se řadí mezi tzv. monoterpeny, jenž jsou tvořeny dvěma isoprenoidovými jednotkami. Ty dále můžeme dělit na cyklické, zahrnující i aromatické, a acyklické. Jedná se o poměrně širokou skupinu látek vyskytujících se v rostlinách, která zahrnuje okolo 3000 struktur. Monoterpeny se podílejí na obranných mechanismech, reprodukčním cyklu či regulaci růstu. V kvetoucích rostlinách často slouží jako atraktanty pro přilákání hmyzu. Monoterpeny jsou sekundárními metabolity tzv. dráhy kyseliny malonové a methyletrytolu. V rostlinách se vyskytují volně či vázané ve formě glykosidů (Dvořáková et al. 2011; Wink 2015; Tauchen & Klouček 2020). Jedná se o velmi vyhledávané bioaktivní látky v potravinářském, kosmetickém či farmaceutickém průmyslu. Mohou být používány jako aditivita v potravinách, či pomocné prostředky v přírodní léčbě, např. ve formě aromaterapie. Využívají se při léčbě revmatismu, infekcí či gastrointestinálního traktu. Neméně důležité je zmínit i rizika, která pro náš organismus představují. Příkladem může být účinná látka pulegon zastoupená v silici rostliny *Mentha pulegium*, již jsou připisovány poměrně silné hepatotoxické účinky (Wink 2015; Tauchen & Klouček 2020).

Látky p-Cymen, thymol a karvakrol patří mezi aromatické látky řadící se k monocyklickým monoterpenům (Tauchen & Klouček 2020). Například thymol (2-isopropyl-5-methylphenol) je jednou z nejvýznamnějších účinných složek izolovaných ze silice čeledi hluchavkovitých (Karapinar & Esen Aktuğ 1987).

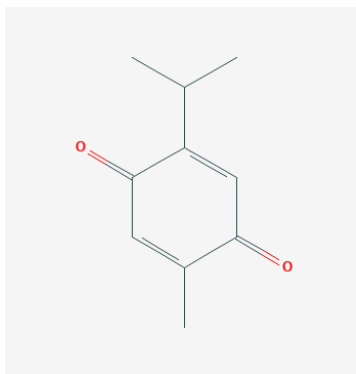
Látka p-Cymen byla identifikována i jako hlavní složka silice rostliny *Nigella sativa* (Jrah Harzallah et al. 2011). Je prokázána řada účinků, jako je protizánětlivý, antimikrobiální, antifungální či antiseptický. Byla prokázána jejich schopnost inhibovat růst některých bakterií vyskytujících se v potravinách, např. vysoká citlivost bakterie *S. Aureus* (Karapinar & Esen Aktuğ 1987).

3.3.2 Chinony

Chinony jsou sekundární metabolity, které se přirozeně vyskytují v houbách, rostlinách, živočiších či bakteriích. Strukturně se jedná o cyklické diketony, které obsahují konjugované dvojné vazby. Dělení na jednotlivé skupiny chinonů vychází z příslušných aromatických uhlovodíků, ze kterých jsou odvozeny. Skupina derivátů benzochinonu se vyskytuje v houbách, lišejnících či mikroorganismech (např. rod *Streptomyces*), deriváty naftachinonu a antrachinonu pak můžeme hledat v rostlinách (O'Brien 1991). Použití chinonu je datováno až do starověku, především jako součást pigmentů či léků. Dodnes velmi rozšířené je např. použití henny, jejíž účinnou látkou je derivát naftochinonu lawson (Bentley & Campbell 1974; Abulyazid et al. 2013), či kůry a listů z ořešáku královského obsahující juglon, jež je známá pro své laxativní či antibakteriální účinky (Janča & Zentrich 1995b; Babula et al. 2006). Ubichinony (koenzymy Q), řadící se mezi deriváty benzochinu, se účastní dýchacího řetězce u savců (Ernster & Dallner 1995).

3.3.2.1 Thymochinon

Thymochinon (TQ) je společně s thymohydrochinonem jedním z významných zástupců 1,4-benzochinonu. Strukturou se jedná o 2-isopropyl-5-methyl-1,4-benzochinon (Obr.1). Je spojován s mnoha důležitými účinky na lidské zdraví, např. protirakovinné či protizánětlivé (Gali-Muhtasib et al. 2006).



Obrázek 1: Chemická struktura thymochinonu (Převzato z databáze PubChem).

V minulosti byl TQ spojován především s rostlinou *Nigella sativa*, rostoucí v oblasti Středoziemního moře, Pákistánu a Indie. Semena této rostlin jsou používána jako přírodní lék již více než 2000 let pro své prospěšné účinky na lidské zdraví a k léčbě nemocí (Nickavar et al. 2003; Gali-Muhtasib et al. 2006). Byla prokázána řada účinků jako jsou antidiabetické, antimikrobiální, protizánětlivé, spasmolytické aj. (Ramadan 2007; Goyal et al. 2017). Jedny z prvních zmínek o této rostlině byly již ve sbírce Sahíh al-Bucháří (kniha 76, kapitola 7). Jedná se o sbírku islámských tradic, která byla dokončena roku 846 islámským učencem Imam Muhammad al-Bukhari. V této knize je *Nigella sativa* neboli Black cumin označována za lék, který vyléčí veškeré nemoci, s výjimkou smrti (Al-Bukhari b.r.).

Sahih al-Bukhari 5687¹:

„Narrated Khalid bin Sad: We went out and Ghalib bin Abjar was accompanying us. He fell ill on the way and when we arrived at Medina he was still sick. Ibn Abi 'Atiq came to visit him and said to us, "Treat him with black cumin. Take five or seven seeds and crush them (mix the powder with oil) and drop the resulting mixture into both nostrils, for 'Aisha has narrated to me that she heard the Prophet saying, 'This black cumin is healing for all diseases except As-Sam.' Aisha said, 'What is As-Sam?' He said, 'Death.'“

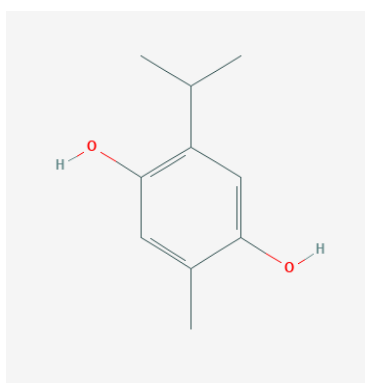
Právě tato zmínka zapříčinila rozsáhlý výzkum zaměřený na rostlinu *Nigella sativa*, resp. thymochinon a jeho deriváty, posledních 50 let (Nickavar et al. 2003; Ramadan 2007). Nejedná se ovšem o jedinou rostlinu obsahující účinnou látku thymochinon. Rozsáhlé pozitivní účinky thymochinonu vyvolaly snahu o jeho identifikaci i v rostlinách běžných v našem regionu. Thymochinon společně se svými deriváty thymohydrochinonem a dithymochinonem

¹ Přeložil do angličtiny M. Muhsin Khan.

byly analyzovány v rostlinách čeledi hluchavkovitých, např. *Monarda didyma*, *Satureja hortensis*, *Thymus serpyllum* či *Thymus vulgaris*. Současně byla provedena kvantifikace obsahu těchto látek, kde je důležité poukázat až na dvojnásobně vyšší obsah TQ v rostlině *Monarda didyma* než *Nigella sativa*, pro thymohydrochinon až 5x vyšší (Taborsky et al. 2012).

3.3.2.2 Thymohydrochinon

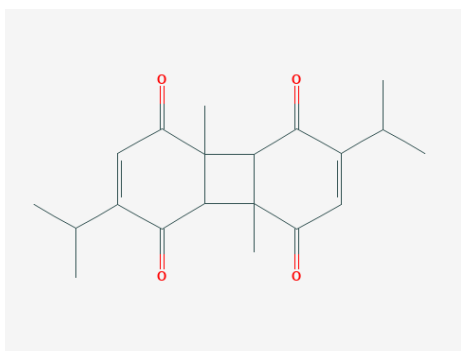
Thymohydrochinon (THQ) je derivátem látky thymochinon. Rozdíl je pouze ve dvou navázaných atomech vodíku (Obr. 1, str. 15; Obr. 2). Jako derivát thymochinonu byl i THQ identifikován v rostlině *Nigella sativa* a dalších rostlinách čeledi hluchavkovitých (kap. 3.3.2.1 Thymochinon, str. 15). Thymohydrochinon společně s thymochinonem mají svůj podíl na protizánětlivých účincích rostliny *Nigella sativa* (Marsik et al. 2005).



Obrázek 2: Chemická struktura thymohydrochinonu (Převzato z databáze Pubchem).

3.3.2.3 Dithymochinon

Jedná se o dimer thymochinonu (Obr. 3), jenž vzniká dimerizací v důsledku vystavení teple a slunečnímu záření. Byl identifikován v několika zástupcích čeledi hluchavkovitých a rostlině *Nigella sativa*, stejně jako thymochinon či thymohydrochinon (Taborsky et al. 2012). V porovnání s TQ a THQ má DTQ nižší schopnost inhibovat bakterie (Halamova et al. 2010).



Obrázek 3: Chemická struktura dithymochinonu (Převzato z databáze Pubchem).

3.3.3 Glykosidy

Glykosidy jsou přírodní organické látky skládající se ze dvou částí, cukru a aglykonu, propojených acetylhydroxylovou vazbou. Aglykon je důležitou částí glykosidů, jež udává

vlastní působení celé látky, resp. její farmakologické účinky. Právě rozmanitost aglykonů u jednotlivých glykosidů má za následek i jejich rozdílné působení (Korbelář & Endris 1981; Jirásek & Starý 1986; Janča & Zentrich 1995a).

Glykosidy mohou být snadno štěpeny na aglykon a cukernou část, např. působením kyselin či enzymů. Mezi enzymy podílející se na štěpení glykosidů řadíme glykosidové hydrolázy, transglykosylázy, lyázy či fosforylázy. Schopnost těchto enzymů a kyselin, které jsou např. součástí gastrointestinálního traktu, poukazuje na vysoký potenciál využití odštěpeného aglykonu pro farmaceutický či potravinářský průmysl. Samotný aglykon jako aktivovaná molekula může specificky působit v lidské organismu a využít tak svůj terapeutický potenciál (Janča & Zentrich 1995a; Khan et al. 2017). Glykosilací je možné původně hydrofobní aglykony převést na více rozpustné látky ve vodě, které mají lepší biologickou dostupnost a zároveň rozdílnou schopnost transportu skrze buněčnou membránu. Příkladem může být ovlivnění farmakokinetiky, kdy je možné využití aktivního transportu glukózy do mozkové tkáně (Kren & Martinkova 2012; Kytidou et al. 2020).

V posledních letech došlo k významnému rozvoji výzkumu terapeutických účinků glykosidů, mezi něž můžeme řadit protirakovinné, antitrombotické, antidepresivní, antioxidační, antimikrobiální či antifungální účinky. Jejich široká rozmanitost a snížené riziko vedlejších účinků zvyhodňují jejich použití oproti některým syntetickým lékům (Stick & Williams 2009; Iyer et al. 2010; Serafini et al. 2011; Khan et al. 2017; Ayogu & Odoh 2020).

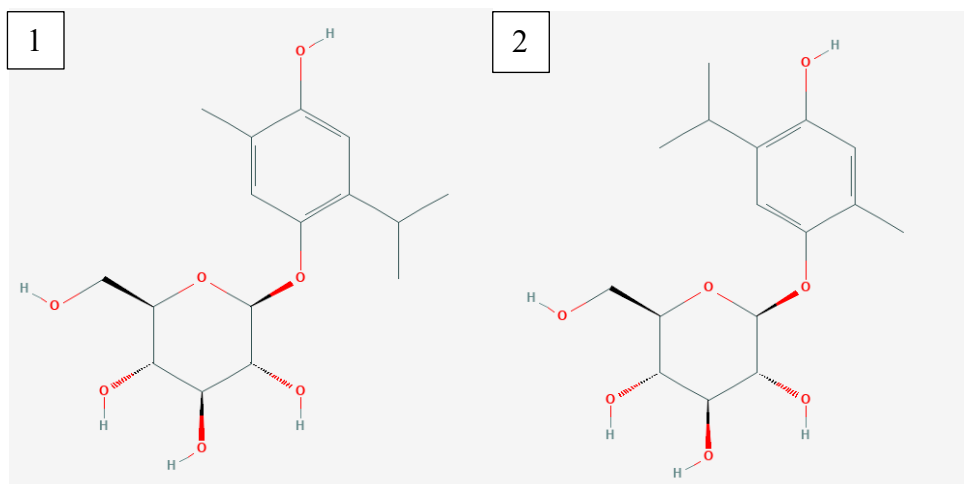
3.3.3.1 Rostlinné glykosidy

Glykosidy se v rostlinách běžně vyskytují a jejich funkce je spojována především s transportními mechanismy zásobních sacharidů či odbouráváním nežádoucích látek. Jedná se o přirozeně se vyskytující rostlinné sekundární metabolity s významným terapeutickým potenciálem a klinickým využitím. Ve většině případů se jedná o látky hořké a některé i jedovaté (např. glykosidy náprstníku), proto je důležité nezapomínat i na jejich toxikologický význam. Rozdělení rostlinných glykosidů je dáno povahou necukerné složky – aglykonu. Řadí me sem např. fenolické, kyanogenní glykosidy či glukosinoláty (Korbelář & Endris 1981; Hollman 1985; Jirásek & Starý 1986; Mika 1988; Janča & Zentrich 1995a).

Na důležitost glykosidů obsažených v rostlinách poukazovaly již studie z roku 1986 a 1979, které jim připisovaly podíl na biosyntéze vyšších terpenoidů či složení éterických olejů (Croteau et al. 1979; Grzunov et al. 1986).

3.3.3.2 Zatarosid

V roce 1999 byly poprvé izolovány a identifikovány nové p-cymen deriváty – glykosidy, které byly pojmenovány jako Zatarosid-A a Zatarosid-B (Obr. 4, str. 18). Oba izomery zatarosidu ($C_{16}H_{24}O_7$) byly izolovány z hexanové frakce extraktu rostliny *Zataria Multiflora* a jejich struktura byla potvrzena pomocí NMR spektroskopie. Zatarosid se jako glykosid skládá z cukerné části glukózy a aglykonu thymochinonu (Ali et al. 1999).



Obrázek 4: Chemická struktura zatarosidu A (1) a zatarosidu B (2) (Převzato z PubChem).

3.4 Vybraní zástupci patogenních bakterií

3.4.1 *Staphylococcus Aureus*

Staphylococcus aureus je jedním z hlavních zástupců grampozitivních bakterií rodu *Staphylococcus*, pod který spadá více jak 40 druhů a poddruhů. Patří mezi koky a jedná se o nepohyblivé, nesporující, fakultativně anaerobní bakterie. Typ metabolismu mají fermentační, při kterém např. fermentací glukózy produkují kyseliny (taxonomické kritérium), i respirační. Jsou odolné vůči vysychání či vyšším koncentracím NaCl. Optimální růst probíhá při 35–37 °C (možný růst i při 7–48 °C), v aerobním, pH 6-7. Dobře roste na běžném živném agaru a v bujónu tvoří zákal a sediment (Bednář et al. 1996).

Běžně se stafylokoky vyskytují v přírodě, na rostlinách, ve vodě, půdě či ve vzduchu. Dále pak na kůži, jejích derivátech a na sliznici teplokrevných živočichů, konkrétně *S. aureus* pak u vyšších primátů (Bednář et al. 1996; Adam & Moss 2010). Bývá společně s bakteriemi *Streptococcus pneumoniae* či *Neisseria meningitidis* častým patogenem dutiny ústní a nosní. Stafylokoky produkují celou řadu toxinů (např. cytotoxiny), enzymů (např. proteáza či lipáza), které mohou napomáhat k šíření infekce do dalších tkání, a dalších produktů (Franklin 1998; Drnková 2019).

S. aureus způsobuje krátké až středně dlouhé typy onemocnění, která nebývají příliš dobře evidována. Otrava jídlem kontaminovaným bakterií *S. aureus* je typická krátkou inkubační dobou (2–4 hod) a je provázena nevolností, zvracením, křečemi žaludku apod. Tyto příznaky většinou odezní do 2 dnů. Stafylokokové infekce mají sklon k recidivě či chronickému průběhu (Bednář et al. 1996; Adam & Moss 2010). Vlivem zvyšujícího užívání antibiotické terapie dochází ke vzniku poly- a multirezistentních rezistentních kmenů *S. aureus* k methicillinu (MRSA) (Klevens et al. 2007; Drnková 2019).

3.4.2 *Bacillus Cereus*

B. cereus je grampozitivní sporulující aerobní tyčinka a jeden z hlavních zástupců rodu *Bacillus*. Tvoří endospory a je schopna růstu na běžných živných půdách, není kultivačně náročná. Optimální růst probíhá při teplotě 28–35 °C, možný v rozsahu 8–55 °C.

V přírodě se běžně vyskytuje jako součást půdy, prachu a vegetace. Je producentem celé řady toxinů a enzymů (např. cereový enterotoxin či C fosfolipázy). Řadí se mezi patogeny potravin, jejichž požitím může dojít k otravě projevující se syndromem zvracením s krátkou inkubací (emetický toxin) či syndromem průjmů (eneterotoxin). Vedle otrav z potravin jsou nemoci vyvolané bakterií *B. cereus* velmi vzácné (např. pneumonie, meningitida), většinou pouze u hostitele s významně sníženou imunitou (Bednář et al. 1996; Kotiranta et al. 2000; Adam & Moss 2010).

3.4.3 *Escherichia Coli*

Jedná se o gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinku spadající mezi *Enterobacteriaceae*. Přírodně je součástí střevní mikroflóry teplotokrevných živočichů nebo ji může nalézt v životním prostředí. Je častým kontaminantem potravin, jež byly vystaveny kontaminaci fekálního původu (např. skrze znečištěnou vodu). Optimálně roste při 37 °C, v rozsahu 7–50 °C, na běžných kultivačních půdách. Má fermentativní metabolismus, tedy štěpí cukry na kyseliny, u glukózy zahrnuje i produkci plynů (Bednář et al. 1996; Adam & Moss 2010).

Většina kmenů není považována za patogenní, může ale vyvolávat např. extraintestinální onemocnění (převážně močového traktu), sepsi, či meningitidu. Jedním z přínosů je její podíl na syntéze vitamínu K, který je nepostradatelný v procesu srážlivosti krve (Bednář et al. 1996; Drnková 2019).

4 Metodika

4.1 Extrakce z hluchavkovitých

4.1.1 Optimalizace procesu macerace hluchavkovitých

4.1.1.1 Pilotní metodika macerace sušeného tymiánu

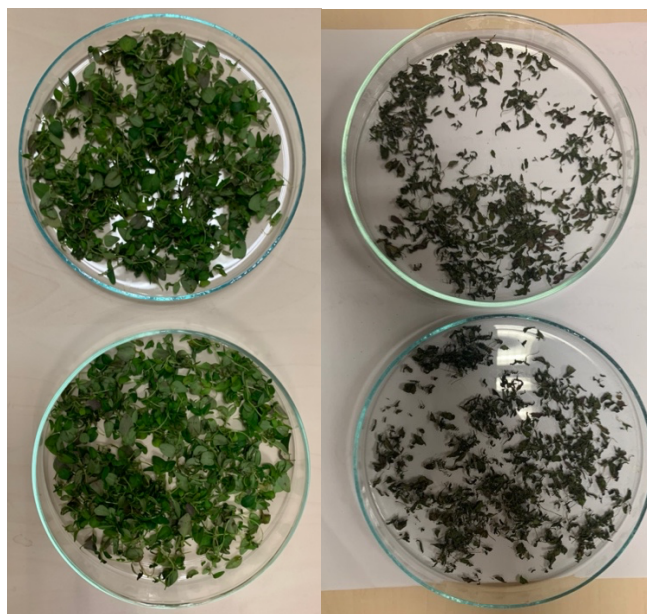
Pro optimalizaci macerace jednotlivých zástupců hluchavkovitých bylo využito vzorků čerstvého tymiánu (*Thymus vulgaris*) poskytnutých od firmy Hanka Mochov s.r.o. (pěstováno na polích u Mochova, Praha–východ). Natě tymiánu byly sušeny po dobu 7 dnů v klimatizované místnosti se stálou teplotou a volně ložené na stolech. Následně byly skladovány v dřevěných krabicích za přístupu vzduchu, ale při omezeném přístupu světla za pokojové teploty. Vzorky z těchto natí byly později využity k optimalizaci metodik macerace, následné extrakce a analýzy.

Pro první metodiku byla sušená nat' zpracována oddělením lístků a nastříháním stonků. K maceraci bylo naváženo 250 g ($\pm 0,05$ g) natě sušeného tymiánu a macerováno po dobu 24 hod ve 2,5 litrech 80% metanolu (Sigma-Aldrich) za kontinuálního třepání (třepačka GFL 3006; 100 rpm). Macerát byl filtrován přes řídké síto s buničinou a následně centrifugován (centrifuga Universal 320R; 9000 rpm; 15 min). Dále byla použita vakuová filtrace (filtr 0,45 μm) a odebrán alikvot 1 ml pro analýzu. Alikvot byl následně vysušen pomocí dusíku a byla zvážena přesná hmotnost jeho sušiny (18,8 mg). Suchý vzorek byl rozpuštěn v 1 ml 50 % metanolu a z něj bylo odebráno 100 μl pro 10x ředění s destilovanou vodou. Takto upravený vzorek byl zkušebně analyzován metodou UHPLC–MS/MS.

4.1.1.2 Macerace čerstvého a sušeného tymiánu

K maceraci pro závěrečnou analýzu tymiánu byl použit vzorek čerstvého tymiánu (*Thymus vulgaris*) v květináči nakoupeném v obchodním řetězci Kaufland (Výrobce: Bylinky s.r.o., země původu: ČR). Byla oddělena nat', ze které bylo odváženo po 5 g na dva vzorky. Každá část byla zhomogenizována pomocí homogenizátoru IKA T18 Ultra–Turax ve 100% metanolu. Vzorek byl následně převeden do dvou Erlenmayerových baněk v celkovém množství 75 ml metanolu a macerován 24 hod za kontinuálního třepání (200 rpm).

Dalších 10 g (2x po 5 g) tymiánu bylo nejprve ponecháno volně na dvou Petriho miskách k sušení po dobu 7 dnů v klimatizované místnosti (Obr. 5, str. 21) a následně zpracováno dle stejného postupu jako vzorky čerstvého tymiánu.



Obrázek 5: Čerstvý tymián před a po 7 dnech sušení v Petriho miskách.

4.1.1.3 Optimalizovaný postup pro maceraci sušených vzorků

Pro další analýzy obsahu thymochinonu, thymohydrochinonu a zatarosidu v čeledi hluchavkovitých byly použity vzorky sušených bylin od české firmy (Valdemar Grešík – Natura), balení po 50 g. Byly použity rostliny: tymián obecný (*Thymus vulgaris*), saturejka zahradní (*Satureja hortensis*), mateřídouška obecná (*Thymus serpyllum*), majoránka zahradní (*Origanum Majorana*). Dále byl použit vzorek rostliny *Zataria Multiflora* (pouze 5 g) ze soukromého zdroje.

Sušené vzorky byly homogenizovány a macerovány dle stejného postupu jako vzorky sušeného/čerstvého tymiánu (kap. 4.1.1.2 Macerace čerstvého a sušeného tymiánu). Bylo vždy naváženo 2x po 5 g od každého vzorku s následnou homogenizací a macerací v 75 ml 100% metanolu po dobu 24 hod za kontinuálního třepání (150 rpm).

4.1.2 Úprava vzorku po maceraci

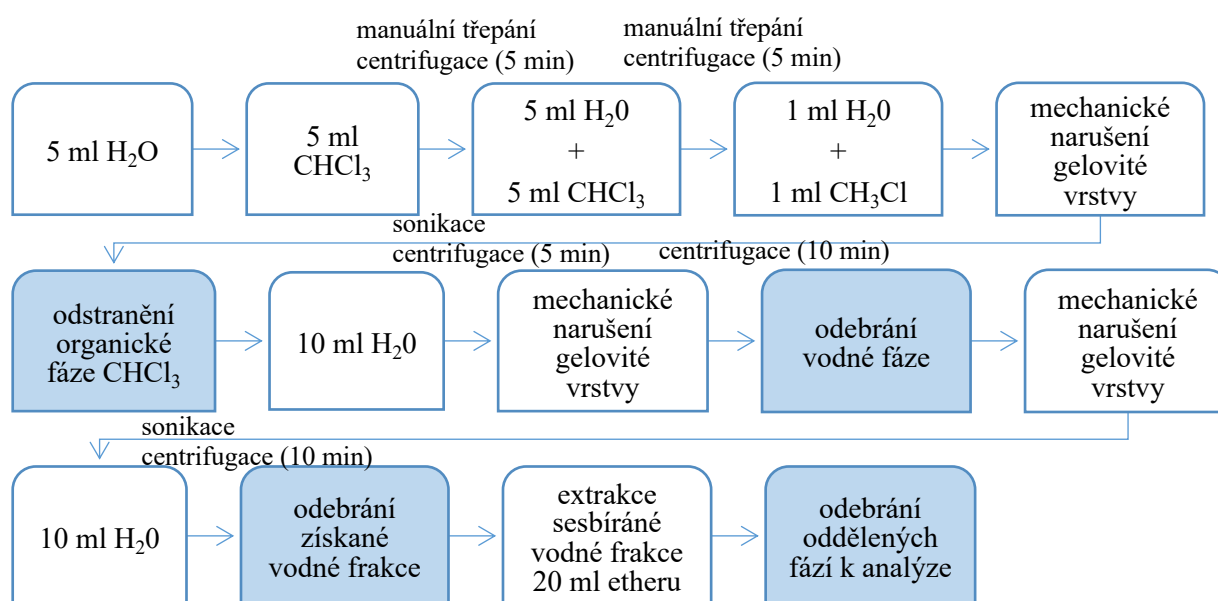
Po 24 hodinách macerace byly vzorky filtrovány, nejprve přes řídké síto s buničinou a následně přes vakuovou filtraci (nylon 66; 47 mm; 0,45 micron). Druhý den byl filtrát odpařen na vakuové odparce dosucha, opět rozpuštěn v čistém metanolu a převeden do lékovky. Takto vzniklý vzorek byl uchován v mrazicím boxu při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.3 Extrakce vzorku

4.1.4 Proces optimalizace extrakce tymiánu

Byla provedena postupná optimalizace extrakce TMQ, TQ a ZAT na vzorku tymiánu s následnou analýzou odebraných frakcí. Pro první metodiku byla zvolena extrakce pomocí destilované vody, chloroformu a ethyletheru (vše Sigma-Aldrich). Nejprve byl objem vzorku doplněn do 25 ml čistým metanolem. Byl odebrán alikvot 1 ml vzorku pro přímou analýzu HPLC–MS/MS, tzv. “prasák“.

Zbýlý macerát byl znovu odpařen dosucha. Následně byl vzorek postupně extrahován v několika krocích dle níže uvedeného schématu (Obr. 6). Extrakce byla provedena za manuálního třepání po dobu cca 1–2 min (Obr. 7, str. 23) mezi jednotlivými kroky (s výjimkou mezi prvním a druhým krokem) s následnou centrifugací (Hettich Universal 320R; 9000 rpm), příp. sonikací (Sonorex Digitec, Bandelin). V průběhu extrakce se vytvořila mezi jednotlivými fázemi pěna, která byla mechanicky narušena za účelem oddělení vodné fáze. Tento krok bylo nutné několikrát opakovat pro dostatečnou separaci vodné fáze z prostřední gelovité vrstvy (Obr. 8, str. 23).



Obrázek 6: Schéma první metodiky extrakce tymiánu.



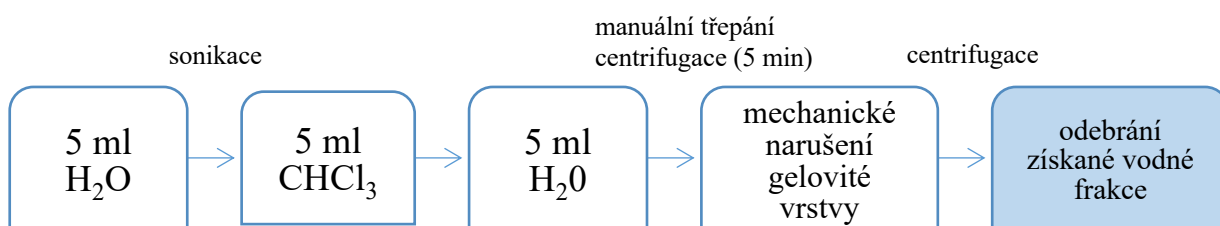
Obrázek 7. Vzorek v průběhu extrakce.



Obrázek 8: Oddělené fáze extrakce po centrifugaci.

4.1.5 Optimalizovaná metoda extrakce tymiánu

Na základě výsledků analýzy odebraných vzorků z jednotlivých frakcí byla extrakce zjednodušena a počet kroků byl zredukován při zachování efektivity procesu. Přidáním jednotlivých rozpuštědel dle schématu (Obr. 9) bylo provedeno rozpuštění suchého vzorku s následnou extrakcí. Počet opakování manuálního třepání s následnou centrifugací byl upraven podle vzorku a schopnosti oddělení jednotlivých fází, zvláště pak vyloučení vody z gelovité mezivrstvy.



Obrázek 9: Optimalizovaný postup extrakce

4.2 Analýza jednotlivých fází extrakce

4.2.1 Analýza UHPLC–MS/MS

Extrahované vzorky (6 vzorků vodné frakce extrakce rostlin tymián, saturejka, dobromysl, mateřídouška, majoránka, *Z. multiflora*) a vzorek kontroly kvality (směsný vzorek se zachováním stejné koncentrace) byly ředěny či rozpuštěny jako H₂O/MeOH v poměru 1:1.

Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí systému ultravysokotlaké kapalinové chromatografie (UHPLC) Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA) za použití kolony Hydro-Synergy RP18 (2,5 μm , 100x2 mm; Phenomenex) a za daných podmínek (40 °C, průtoku 0,250 ml/min, doba analýzy 20 min) ve spojení s hmotnostním analyzátozem Q-TOF Impact II (Bruker Daltonik GmbH, Německo) s ultravysokým rozlišením a přesným určením hmoty (HRAM) analytů. Pro analýzu byla použita gradientová eluce (Tab. 1) s mobilními fázemi A (0,2 % kyselina mravenčí, v/v) a B (metanol, v/v). Objem nástřiku vzorku pro analýzu činil 5 μl .

Vzorky vybraných rostlin, tymiánu a satirejky, které se během analýzy ukázaly jako nejperspektivnější, byly měřeny ve 3 opakováních, stejně jako vzorek kontroly kvality.

Tabulka 1: Gradient (min/% B) použitý pro analýzu vodných extraktů vybraných rostlin metodou UHPLC.

Čas (min)	0	0,1	10	12	13	20
MF B (%)	5	5	100	100	5	5

Analýza vybraných látek obsažených ve vodných frakcích rostlinných extraktů, převážně glykosidů, probíhala v pozitivním módu. Záznam spekter byl proveden ve FullScan módu (mód úplného skenování). Metoda analýzy byla nastavena a vytvořena pomocí softwarů Compass otofControl 5.2 (Bruker Daltonik GmbH, USA) a Compass HyStar 5.1 (Bruker Daltonik GmbH, USA). Výsledná data byla následně částečně zpracována k vyhodnocení pomocí programu TasQ client 4.3 (Bruker Daltonik GmbH, USA), kde byly porovnány retenční časy a molekulové hmotnosti s určenými teoretickými hodnotami. Výstupní data byla statisticky vyhodnocena v programu Microsoft Excel.

4.3 Mikrodiluční testy

4.3.1.1 Příprava inokula

V této práci byly používány standardní sbírkové kmeny z American type culture collection (ATCC) (Tab. 2, str. 25). Jako kultivační médium byl použit bujón Müller-Hinton (MHB) od OXOID (Basingstoke, Velká Británie), který byl připraven z 21 g rozpuštěných v 1 litru tris-buffered saline a poté autoklávován (121 °C, 15 minut) a uchován v chladničce při 4 °C.

Inokulum bylo připraveno za použití 5 ml MHB a několika kapek vybrané bakterie pro dané měření. Takto aspeticky vytvořená suspenze byla ponechána inkubaci při 35 °C přes noc, vždy minimálně 16 hod. Následující den byla připravena nová zkumavka obsahující pouze 10 ml MHB, u které byla změřena denzita na denzitometru. Do takto změřeného média bylo postupně přidáváno inokulum připravené předchozího dne, dokud se nezvýšila denzita o 0,5 McF.

Tabulka 2: Vybraní zástupci bakterií pro mikrodiluční testy.

Grampozitivní bakterie	Gramnegativní bakterie
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<i>B. cereus</i> ATCC 1177	

4.3.1.2 Příprava koncentrační řady sledované látky

Dva vybraní zástupci derivátů thymochinonu (TQ), thymohydrochinon (připraven v laboratoři redukcí z TQ, Sigma-Aldrich) a zatarosid B (Sigma-Aldrich), byly testovány na bakteriích podle koncentrační řady ($\mu\text{g/ml}$): 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25. Tato ředící řada byla připravena z výchozí koncentrace 128 $\mu\text{g/ml}$, jež byla připravena ze zásobního roztoku vzorku o koncentraci 100x vyšší. Pro vytvoření zásobního roztoku bylo z navážky vypočteno množství rozpouštědla DMSO (zatarosid) nebo 96% ethanolu (thymohydrochinon) na dosažení 100 % účinnosti látky. Takto připravený zásobní roztok byl napipetován po 6,25 μl (pro 1 měření) či 12,5 μl (pro 2 měření) do „ependorfek“ k uskladnění v mrazicím boxu za teploty $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ na další měření.

Před každým měřením byla připravena nová ředící řada pro antibiotikum tetracyklin T3258 (Sigma-Aldrich) s čistotou $\geq 88\%$, pro mikrodiluční testy v koncentracích ($\mu\text{g/ml}$): 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0313. Zásobní roztok pro antibiotikum byl připraven rozpuštěním v 96% ethanolu v množství vypočteném ze skutečné navážky o koncentraci 100x vyšší než první koncentrace ředící řady (16 $\mu\text{g/ml}$) při přepočítání na 100% účinnost. Zásobní roztok byl vždy připraven „čerstvý“ pro jednotlivá měření.

4.3.1.3 Mikrodiluční testy

K testování byly připraveny mikrotitrační destičky dle schématů (Tab. 3 a Tab. 4, str. 26) s objemem jednotlivých jamek 200 μl . Kontrolou čistoty je čisté médium MHB, kontrolou pak médium zaočkované zvolenou bakterií (*S. Aureus* či *E. Coli*). Testování bylo vždy provedeno dvakrát pro každou bakterii ve 3 opakování.

Tabulka 3: Schéma mikrotitrační destičky pro TMQ + ZAT (kde K je kontrola, K_{ϵ} je kontrola čistoty, konkrétní čísla vyjadřují koncentraci testované látky v $\mu\text{g/ml}$, zatarosid v 1.-3. řádku, thymohydrochinon v 6.-8. řádku)

K	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	K_{ϵ}
K	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	K_{ϵ}
K	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	K_{ϵ}
K											K_{ϵ}
K											K_{ϵ}
K	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	K_{ϵ}
K	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	K_{ϵ}
K	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	K_{ϵ}

Tabulka 4: Schéma mikrotitrační destičky pro tetracyklin (kde K je kontrola, K_č je kontrola čistoty, konkrétní čísla vyjadřují koncentraci antibiotika v µg/ml)

K											K _č
K											K _č
K	16	8	4	2	1	0,5	0,125	0,125	0,0625	0,0313	K _č
K	16	8	4	2	1	0,5	0,125	0,125	0,0625	0,0313	K _č
K	16	8	4	2	1	0,5	0,125	0,125	0,0625	0,0313	K _č
K											K _č
K											K _č
K											K _č

Připravené destičky byly následně dvakrát zaočkovány čerstvě standardizovaným inokulem (tedy veškeré jamky s výjimkou kontrola čistoty ve 12. řádku) tak, aby bylo dosaženo počáteční koncentrace mikroorganismů cca 5×10^5 KTJ. Destičky byly ponechány v inkubátoru po dobu 24 hod za teploty 35 °C. Druhý den byla vyhodnocena schopnost testovaných látek inhibovat růst daných bakterií. Během testování byla mírně upravena metodika pro bakterii *Bacillus cereus* tím, že byl testován zatarosid společně s antibiotikem tetracyklin na jedné destičce a thymohydrochinon byl testován samostatně. Koncetrační řady byly zachovány.

5 Výsledky

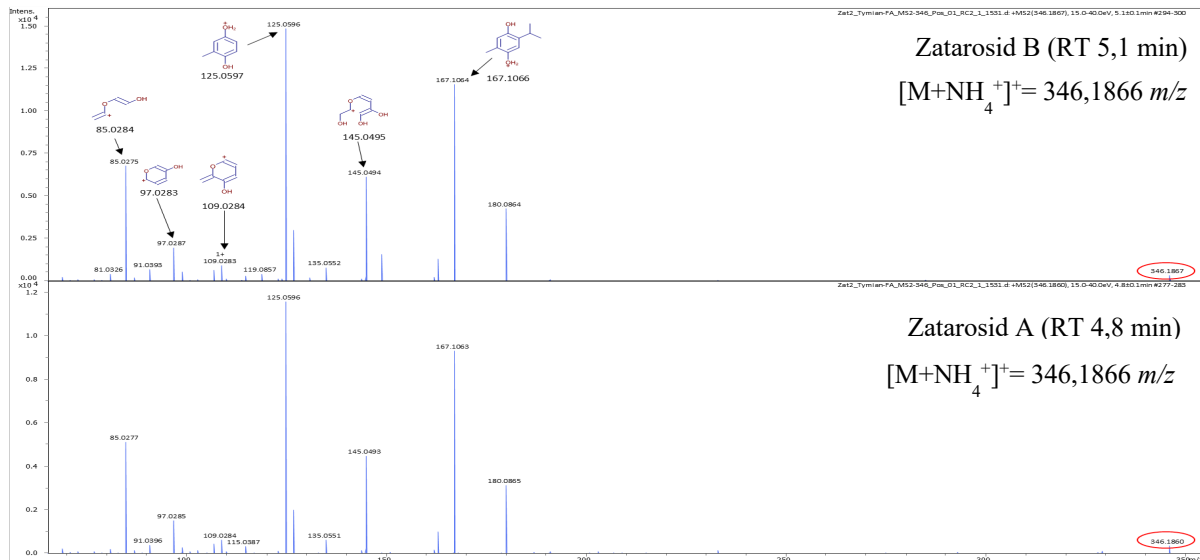
5.1 Kvalitativní analýza UHPLC/MS

Identifikace vybraných látek byla provedena ve vodných frakcích odebraných po extrakci macerátu jednotlivých rostlin za pomoci metody UHPLC–MS/MS. Na základě účelově vytvořené tabulky teoretických hodnot m/z adduktů potenciálních metabolitů byly vybrané látky cíleně identifikovány (Tab. 5). Tyto výstupy analýzy v podobě extrahovaných chromatogramů a hmotnostních spekter byly dále zpracovány pro stanovení relativních obsahů jednotlivých látek. Zjištěné hodnoty byly pro porovnání vzorků vztaženy ke směsnému vzorku neboli kvalitativní kontrole, která představovala průměrné hodnoty obsahu identifikovaných látek.

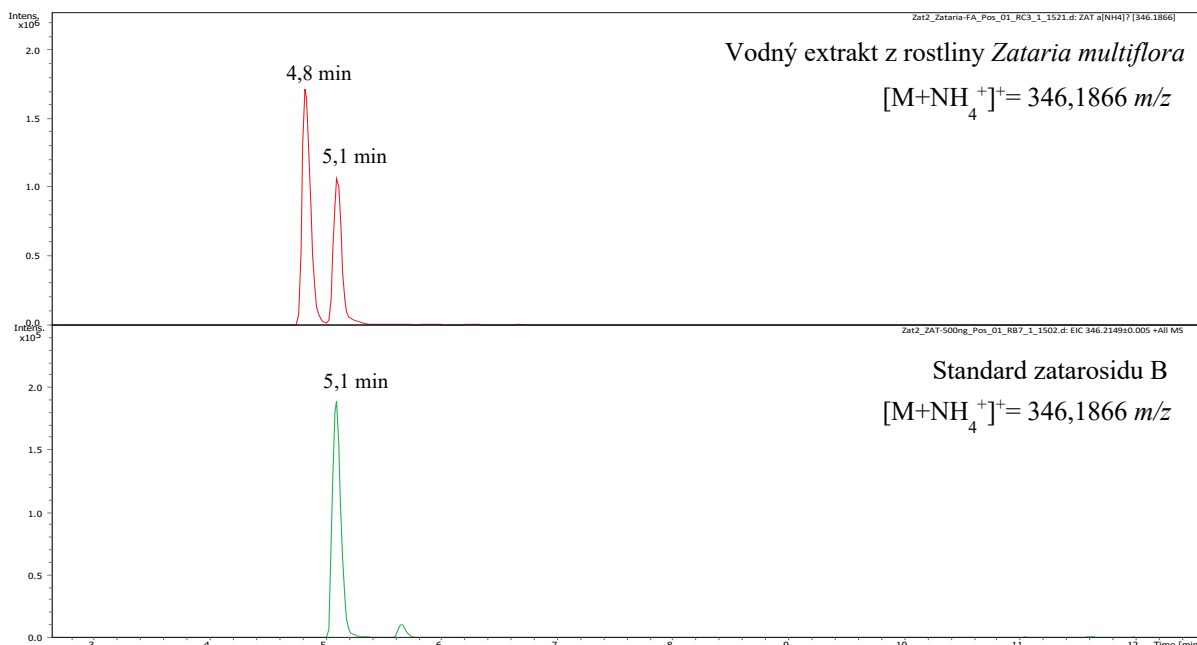
Tabulka 5: Teoretické hodnoty pro práci s vyhodnocením dat analýzy UHPLC/MS, kde rt = retenční čas.

Látka	Sumární vzorec	Předpokládaná M_r	Detekovaný ion	m/z detek. iontu	RT [min]
DTQ	$C_{20}H_{24}O_4$	328,1675	$[M+H]^+$	329,1753	9,2
THQ-Ac	$C_{12}H_{16}O_3$	208,1099	$[M+H]^+$	209,1178	7,7
THQ-Hex-Hex	$C_{22}H_{34}O_{12}$	490,2050	$[M+NH_4]^+$	508,2394	3,6
THQ-Hex-Hex-Mal	$C_{25}H_{36}O_{15}$	560,2105	$[M+NH_4]^+$	594,2398	4,5
THQ-Hex-Mal 1	$C_{19}H_{26}O_{10}$	398,1577	$[M+NH_4]^+$	432,1870	5,7
THQ-Hex-Mal 2	$C_{19}H_{26}O_{10}$	398,1577	$[M+NH_4]^+$	432,1870	5,9
THQ-Hex-Rham	$C_{22}H_{34}O_{11}$	458,2152	$[M+NH_4]^+$	492,2445	8,0
THQ-Me	$C_{11}H_{16}O_2$	180,1150	$[M+H]^+$	181,1229	7,8
THY	$C_{10}H_{14}O$	150,1045	$[M+H]^+$	151,1123	7,7
THY-Hex/THQ-Rham 1	$C_{16}H_{24}O_6$	312,1573	$[M+NH_4]^+$	330,1917	7,5
THY-Hex/THQ-Rham 2	$C_{16}H_{24}O_6$	312,1573	$[M+NH_4]^+$	330,1917	8,0
THY-Hex-Hex 1	$C_{22}H_{34}O_{11}$	474,2101	$[M+NH_4]^+$	492,2445	5,7
THY-Hex-Hex 2	$C_{22}H_{34}O_{11}$	474,2101	$[M+NH_4]^+$	492,2445	6,0
THY-Hex-Mal 1	$C_{19}H_{26}O_9$	398,1577	$[M+NH_4]^+$	416,1921	7,8
THY-Hex-Mal 2	$C_{19}H_{26}O_9$	398,1577	$[M+NH_4]^+$	416,1921	8,2
THY-Hex-Rham	$C_{22}H_{34}O_{10}$	458,2152	$[M+NH_4]^+$	476,2496	7,0
THY-Hex-Rham-Mal	$C_{25}H_{36}O_{13}$	544,2156	$[M+NH_4]^+$	562,2500	7,4
THY-Hex-Xyl	$C_{21}H_{32}O_{10}$	444,1995	$[M+NH_4]^+$	462,2339	7,5
THY-Hex-Xyl-Mal	$C_{24}H_{34}O_{13}$	544,2156	$[M+NH_4]^+$	548,2343	7,5
THY-Me	$C_{11}H_{16}O$	164,1201	$[M+H]^+$	165,1279	9,6
Zatarosid A	$C_{16}H_{24}O_7$	328,1522	$[M+NH_4]^+$	346,1866	4,8
Zatarosid B	$C_{16}H_{24}O_7$	328,1522	$[M+NH_4]^+$	346,1866	5,1

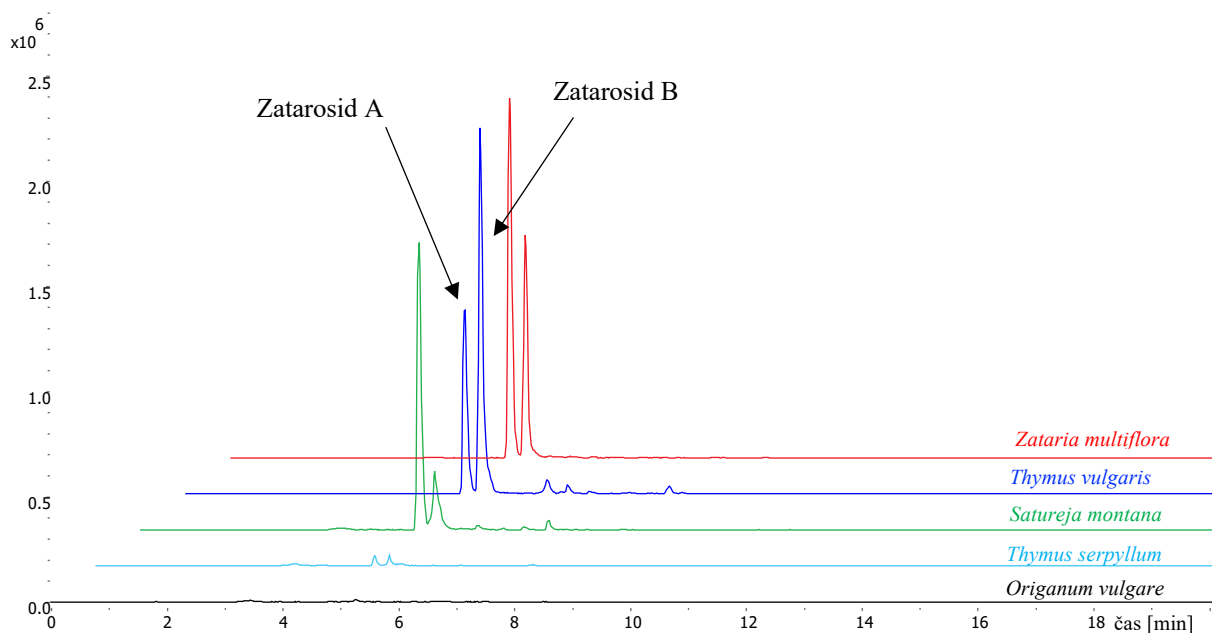
Pro znázornění postupu v analýze identifikovaných látek byl jako reprezentativní vybrán monoglukosidový konjugát thymohydrochinonu zatarosid B (Obr. 10), jehož retenční čas (5,1 min) byl porovnán s komerčně dostupným standardem zatarosidu B (Obr. 11). Na obr. 10 jsou znázorněny identifikované struktury jednotlivých fragmentů spektra (Obr. 10). V rámci pilotního screeningu byly porovnány chromatogramy a srovnáno zastoupení obou izomerů zatarosidu, A a B, v jednotlivých rostlinách (Obr. 12, str. 29).



Obrázek 10: Hmotnostní spektra zatarosidu A a zatarosidu B (včetně struktur jednotlivých fragmentů spektra u zatarosidu B). Červeně označené jsou amonné ionty zatarosidu A (346,1860) a zatarosidu B (346,1867), jejichž teoretická m/z je 346,1866 (Tab. 5, str. 27).

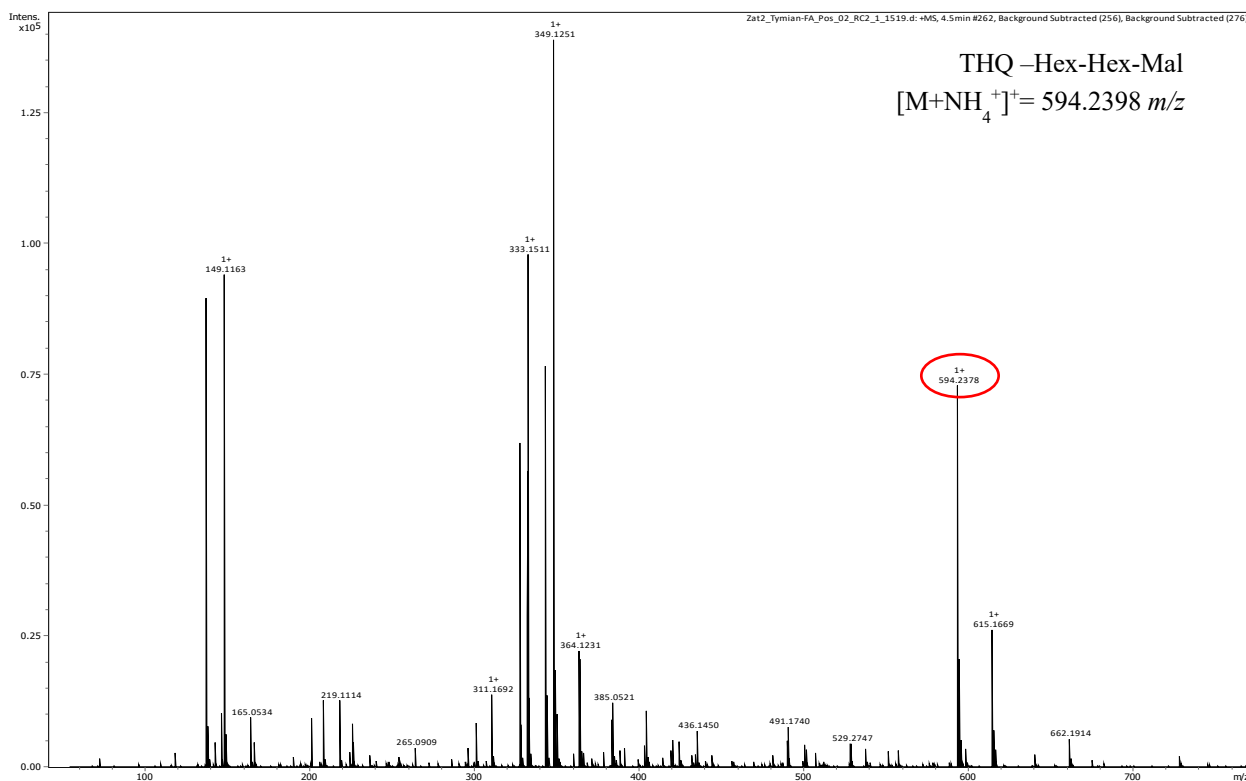


Obrázek 11: Reprezentativní chromatogram identifikace zatarosidu B ve vodném extraktu ve srovnání se standardem zatarosidu B na základě retenčního času.

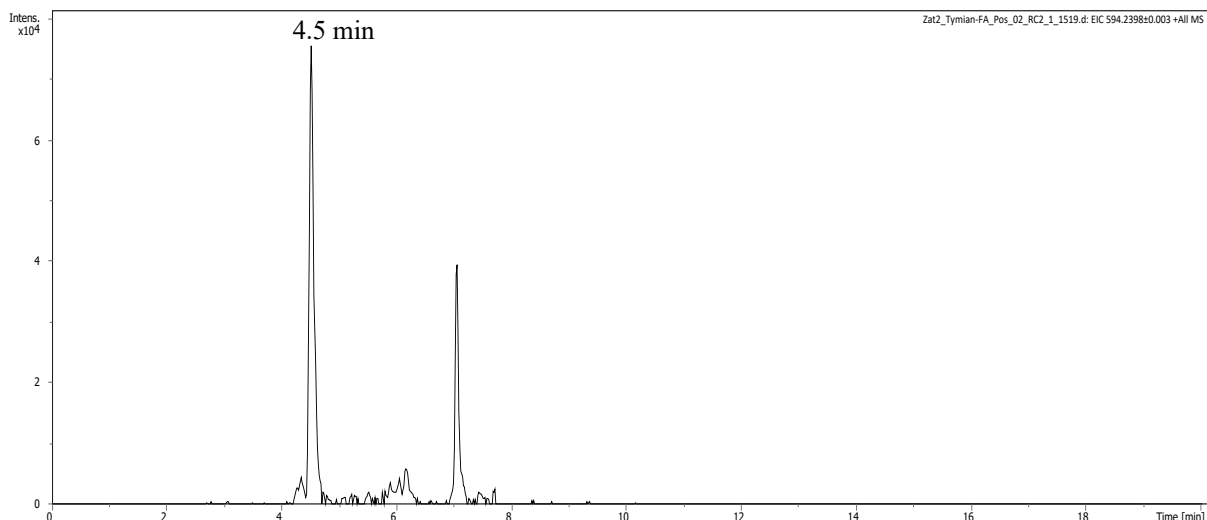


Obrázek 12: UHPLC-MS/MS chromatogram zatarosidu A a zatarosidu B v jednotlivých rostlinách.

Látky identifikované bez standardu byly určeny na základě hmotnostního spektra, resp. adduktového iontu (nejčastěji s amonným nebo vodíkovým iontem) předpokládaného metabolitu. Jako reprezentativní příklad je na obr. 13 uvedeno spektrum a extrahovaný iontový chromatogram (obr. 14) malonyl-glykosilovaného thymohydrochinonu (THQ-Hex-Hex-Mal).

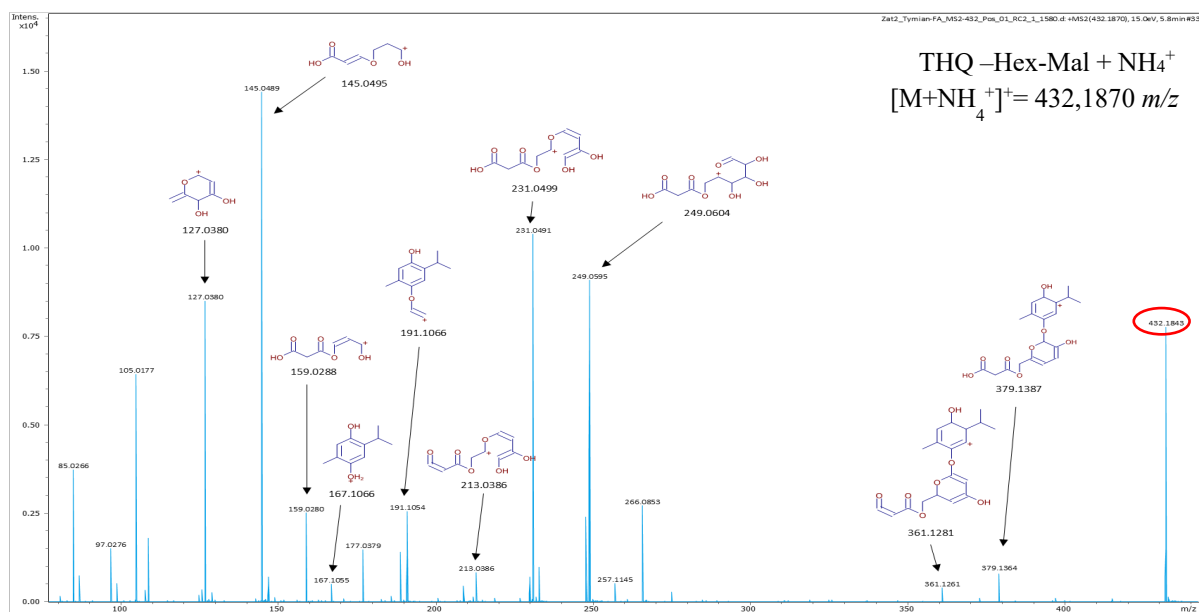


Obrázek 13: Hmotnostní spektrum analyzovaného malonylovaného glykosidu, derivátu thymohydrochinonu. Červeně označený je jeho identifikovaný amonný ion.



Obrázek 14: UHPLC-MS/MS extrahovaný iontový chromatogram THQ-Hex-Hex-Mal (RT= 4,5; Tab.2, str. 23) identifikovaného ve vzorku *T. vulgaris*.

Následně byla provedena i MS² fragmentace tohoto iontu a analýzou fragmentového spektra identifikovány i jednotlivé klíčové fragmenty potvrzující správnost předběžné identifikace stanovené látky. Pro ilustraci je jako příklad na obr. 15 uvedeno anotované HRES fragmentové spektrum malonyl-glykosilovaného thymohydrochinonu (THQ-Hex-Hex-Mal), který je vybrán jako reprezentativní struktura zahrnující většinu významných strukturních motivů (glykosylový a malonylový zbytek) přítomných v ostatních předběžně identifikovaných metabolitech. Na hmotnostním spektru je možné vidět přímé potvrzení malonylonových derivátů, které jasně dokazuje, že docházelo k manolizaci látek obsažených v tymiánu. Fragmenty 379,1387 m/z a 361,1281 m/z dokazují zachované malonylované zbytky. Zahrnuti jsou i další fragmenty, např. ion 167,1066 m/z, který odpovídá thymohydrochinonu, či ion 125,0597 m/z odpovídající methylhydrochinonu a další fragmenty derivátů hexóz.



Obrázek 15: Analyzované spektrum THQ-Hex-Hex-Mal, kde jsou identifikované i jednotlivé fragmenty. Červeně označený je amonný ion stanovené látky (432, 1843 m/z).

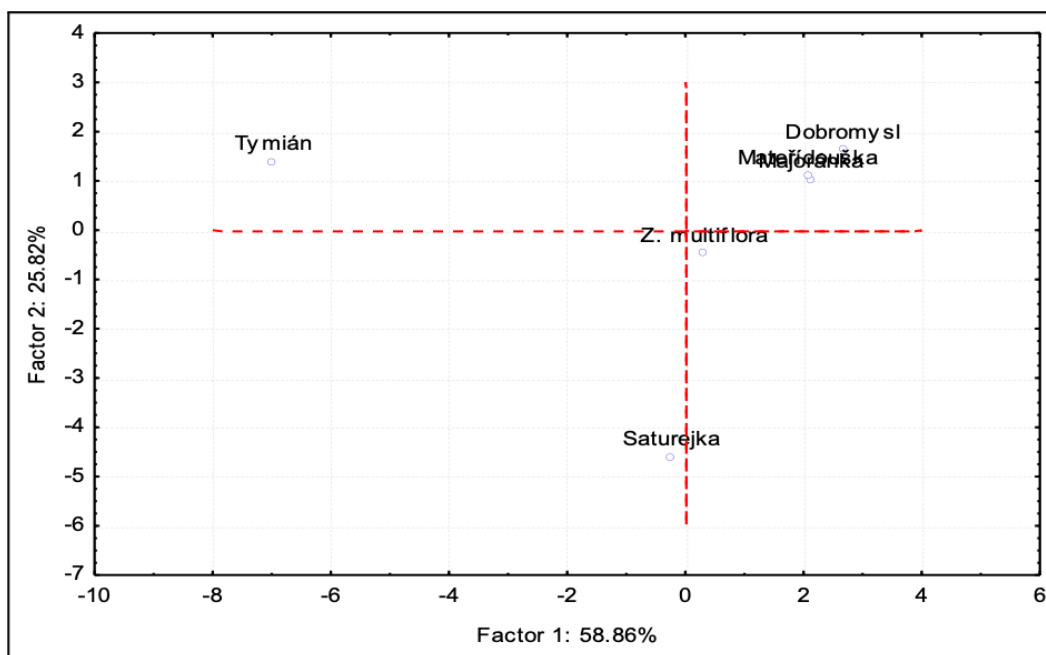
Hmotnostní spektra a retenční časy byly porovnány s teoretickými údaji odvozenými od standardů thymolu, zatarosidu či thymochinonu. Procentuální obsah analyzovaných látek (Tab. 6) byl vypočten z relativních ploch píků vztažených ke směsnému vzorku všech analyzovaných rostlin, tedy kvalitativní kontrole, jejíž obsah byl stanoven 100 %. Vzorky tymiánu, satirejky a kvalitativní kontrola byly analyzovány ve 3 opakováních za účelem zjištění přesnosti analytického stanovení. V průběhu testování se ukázalo být výhodné soustředit se na rostliny tymián (*Thymus vulgaris*) a satirejka (*Satureja hortensis*), u kterých bylo podle předpokladu zjištěno nejvyšší absolutní množství i relativní obsah identifikovaných látek. Z toho důvodu byla u těchto rostlin provedena další měření (MS²) a pro vyšší přesnost následně statisticky vyhodnocena.

Tabulka 6: Procentuální obsah a identifikace vybraných derivátů thymochinonu a thymolu ve vybraných zástupcích čeledi hluchavkovité. U identifikovaných látek byl stanoven procentuální relativní obsah vztažený ke kontrole kvality (směsný vzorek vybraných rostlin).

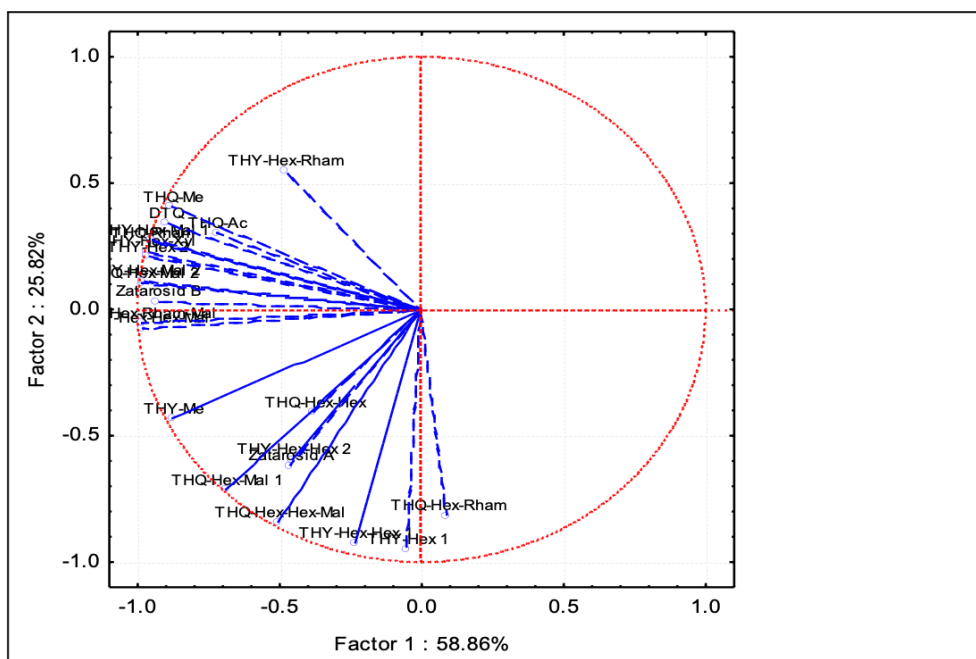
Identifikovaná látka	Identifikace a relativní obsah stanovených látek [% ±SD] ve vybraných rostlinách					
	Dobromysl	Majoránka	Mateřídouška	Saturejka*	Tymián*	Z. multiflora
DTQ	–	–	119,3	–	545,8 ±0,79	–
THQ-Ac	–	529,1	–	–	1028,1 ±0,33	725,4
THQ-Hex-Hex	–	–	13,0	242,6 ±0,07	234,1 ±0,29	545,6
THQ-Hex-Hex-Mal	–	–	11,2	740,7 ±0,52	394,0 ±0,52	392,9
THQ-Hex-Mal 1	0,8	7,0	17,0	774,7 ±0,52	594,5 ±1,37	271,5
THQ-Hex-Mal 2	2,7	3,6	111,2	746,6 ±0,43	4353,1 ±9,44	1261,0
THQ-Hex-Rham	69,4	101,9	1000,4	1761,8 ±2,95	144,7 ±1,16	180,5
THQ-Me	127,6	54,1	79,3	52,8 ±0,01	341,8 ±0,17	90,9
THQ-Rham	20,9	195,9	76,8	208,6 ±0,07	5433,6 ±9,72	50,8
Thymol (THY)	131,2	143,1	127,3	66,2 ±0,06	98,6 ±0,04	145,3
THY-Hex-Hex-Mal	–	–	140,7	689,4 ±0,52	1818,0 ±3,36	214,8
THY-Hex-Hex 1	5,7	164,3	132,2	731,5 ±0,60	230,6 ±0,34	136,8
THY-Hex-Hex 2	103,1	480,8	311,6	576,4 ±1,04	473,0 ±0,84	348,8
THY-Hex-Mal 1	20,3	118,1	41,0	110,2 ±0,02	5447,7 ±8,83	26,1
THY-Hex-Mal 2	–	4,3	27,3	469,3 ±0,19	2600,2 ±5,73	126,7
THY-Hex-Rham	79,8	529,1	1081,4	15,9 ±0,03	1140,7 ±5,23	261,1
THY-Hex-Rham-Mal	–	–	–	181,2 ±0,85	527,6 ±2,21	58,0
THY-Hex-Xyl	129,7	120,8	174,1	237,8 ±0,18	1929,1 ±3,51	283,9
THY-Hex-Xyl-Mal	–	–	–	–	I**	–
THY-Hex 1	–	196,9	77,2	5461,9 ±0,07	209,8 ±9,79	45,9
THY-Hex 2	–	3,0	45,4	340,5 ±0,10	4028,7 ±8,83	208,0
THY-Me	56,7	48,6	51,0	183,8 ±0,09	221,0 ±0,69	84,3
Zatarosid A	2,2	9,5	13,2	405,1 ±0,41	293,7 ±0,59	520,8
Zatarosid B	2,1	5,1	36,3	342,6 ±0,15	1607,0 ±3,74	893,8

*Výsledné hodnoty byly statisticky zpracovány v programu Microsoft Excel (nepárový t-test, $p < 0,05$). Je uveden průměr hodnot a směrodatná odchylka. **I (=identifikována) – látka byla identifikována, ale nebylo možné určit relativní obsah látky z důvodu nedostatečné detekce u vzorku kontroly kvality.

Pomocí vícerozměrné statistické analýzy hlavních komponent (PCA) byla data dále zpracována pro analýzu vztahů mezi sledovanými analyty a podobnosti jednotlivých vzorků na základě profilů těchto látek (Obr.16, Obr.17). Z analýzy je zřejmý především určitý vliv malonylace jako faktoru rozdílů mezi tymiánem a saturejkou, které se obecně výrazně odlišují od ostatních vyšetřovaných vzorků vyšším zastoupením metabolitů TQ a THY. Dalšími významnými diskriminujícími látkami jsou zatarosid A a B, kde forma B je relativně abundantnější v tymiánu, kdežto forma A je proporcionálně více zastoupena v saturejce, což je patrné i z porovnání chromatogramů (obr. 12, str. 29). Procentuální zastoupení variability dat pro faktor 1 je 58,86 % a pro faktor 2 je 25,82 %. Tedy 84,68 % variability dat bylo popsáno faktory 1 a 2, které zahrnují korelaci zastoupení většiny malonylových glykosidů.



Obrázek 16: Grafické znázornění relativního zastoupení malonylových látek v analyzovaných rostlinách.



Obrázek 17: Grafické znázornění komponentní zátěže jednotlivých faktorů, jak jednotlivé látky přispívají k rozdělení látek.

5.2 Testování antimikrobiální aktivity

Výsledky ukázaly rozdílné schopnosti obou testovaných derivátů thymochinonu inhibovat vybrané zástupce patogenů potravin v porovnání s vybraným antibiotikem tetracyklin (Tab. 7). Thymohydrochinon účinně inhiboval oba zástupce grampozitivních bakterií, *S. aureus* a *B. cereus*, se shodnou minimální inhibiční koncentrací (MIC) 8 µg/ml, zatímco u zástupce gramnegativních bakterií, *E. coli*, byl ve vybraném rozsahu koncentrací neúčinný. Zatarosid B nevykazoval žádnou schopnost inhibovat vybrané patogeny v celém testovaném rozsahu koncentrací. Pro srovnání: vybrané antibiotikum tetracyklin vykazovalo MIC proti grampozitivním bakteriím 0,125 µg/ml a gramnegativní bakterii 0,5 µg/ml.

Tabulka 7: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) thymohydrochinonu, zatarosidu a vybraného antibiotika tetracyklin proti vybraným patogenům v potravinách.

Účinná látka	G ⁺ bakterie		G ⁻ bakterie
	<i>S. aureus</i> MIC*	<i>B. cereus</i> MIC*	<i>E. coli</i> MIC*
Thymohydrochinon	8	8	> 128
Zatarosid	> 128	> 128	> 128
Tetracyklin	0,125	0,125	0,5

*MIC je stanovena v µg/ml, hodnota je modus ze 3 opakování 3 testů.

6 Diskuze

Rostliny jsou nejstarší používané prostředky pro léčení nemocí a dodnes jsou široce využívané některými kulturami, příkladem může být tradiční čínská a ajurvédská medicína. Výzkumné analýzy bioaktivních látek obsažených v rostlinách se často soustředí na testování jejich schopnosti inhibovat mikroorganismy. Mezi bioaktivní látky je možné řadit i sekundární metabolity rostlin zahrnující široké spektrum látek. Ty jsou produkovány rostlinami zejména za účelem obranných mechanismů, atraktantů vedoucích k rozmnožení rostliny či jako signální molekuly (Tauchen & Klouček 2020).

V rámci této diplomové práce byla testována antimikrobiální aktivita vybraných derivátů thymochinonu, konkrétně thymohydrochinonu a zatarosidu. Pro dotvoření širšího kontextu práce byly kromě výše uvedených látek analyzovány ještě další příbuzné sloučeniny, a to ve vodné frakci vybraných zástupců čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Konkrétně šlo o rostliny *Thymus vulgaris*, *Thymus Serpyllum*, *Satureja hortensis*, *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* běžně užívaných v našich zemích. Pro srovnání byla analyzována i rostlina ze západoasijské oblasti, *Zataria multiflora*, též spadající do čeledi hluchavkovitých, ve které byly jako v jediné v minulosti identifikovány dva izomery monoglykosidu thymohydrochinonu zatarosid A a B (Ali et al. 1999).

Identifikace látek v této diplomové práci byla zaměřena především na glykosidové a malonyl-glykosidové konjugáty, mezi které patří i zatarosid, a další deriváty thymochinonu, případně thymolu. Konkrétně byly identifikovány konjugáty cukerných složek s thymohydrochinonem, zastupující deriváty thymochinonu, a thymolem jako zástupcem fenolického monoterpenu obsaženým v silicích rostlin. Glykosidy obsahují ve své struktuře chráněnou formu aglykonu, která by po odštěpení cukerné složky mohla představovat potenciálně účinnou látku využitelnou ve farmacii či potravinářském průmyslu (Khan et al. 2017). Glykosilací je možné původně hydrofobní aglykony převést na látky více rozpustné ve vodě, které mají lepší biologickou dostupnost a mají rozdílnou schopnost transportu skrz buněčnou membránu (Kren & Martinkova 2012; Kytidou et al. 2020).

U tymiánu obecného bylo identifikováno všech 24 látek s nejvyšší mírou zastoupení i relativních obsahů. U tymiánu mezi nejvíce zastoupenými konjugáty byly pro thymochinon identifikovány THQ-Hex-Mal, THQ-Rham a pro thymol THY-Hex, THY-Hex-Mal.

U saturejky zahradní bylo identifikováno 21 látek, u kterých byly stanoveny i jejich relativní množství. Oproti tymiánu zde nebyl identifikován např. dithymochinon, dimer thymochinonu. Relativní obsahy byly u většiny látek násobně nižší, v některých případech až o řád. Podobně jako tymián i saturejka poukazovala na určité odlišení od ostatních rostlin, a to korelaci převážně s glykosidy, které nebyly konjugáty s kyselinou malonylovou (Obr. 16, str. 32).

Z vysokých relativních obsahů látek v tymiánu by se dalo předpokládat, že výsledky mohl ovlivnit zdroj a způsob sušení rostlin, jelikož rostlina byla získána původně jako čerstvá a od jiného výrobce. Tato domněnka byla vyloučena porovnáním obsahu thymolu v tymiánu a ostatních rostlinách, který vyšel srovnatelný (Obr. 10, str. 28). Podle dostupné literatury bývá

totiž obsah thymolu řádově shodný v rostlinách čeledi hluchavkovitých (Komaitis et al. 1992; Milos et al. 2000; Ghannadi 2002; Skočibušić et al. 2006; Nikolić et al. 2014; Jarić et al. 2015; Tauchen & Klouček 2020).

Jelikož u zatarosidu B byla v rámci této práce testována jeho schopnost inhibovat vybrané bakterie, bylo by žádoucí poukázat na zastoupení obou izomerních glykosidů v rostlinách. Byly identifikovány dva píky, které odpovídají glykosilovanému thymohydrochinonu. Tyto izomery zatarosid A i zatarosid B byly určeny i na základě teoretických retenčních časů a hmotnostních spekter (Tab. 6, str. 31).

Retenční čas zatarosidu B byl potvrzen na základě standardu od firmy Sigma-Aldrich. Zároveň byly určeny struktury jednotlivých fragmentů spektra, které potvrzují identifikaci zatarosidu B (Obr.10, str. 28). Mezi tyto fragmenty můžeme řadit thymohydrochinon (167, 1066 m/z), 2-methylhydrochinon (125,0597 m/z) či deriváty hexózy. Pro druhý izomer zatarosid B bylo pořadí odlišné. Nejvyšší relativní obsah byl zjištěn u tymiánu obecného (1607 %), následovala *Z. multiflora* (893,8 %) a saturejka zahradní (342,6 %).

Zatarosid A byl předběžně identifikován na základě hmotnostního spektra, které bylo téměř identické se spektrem standardizovaného zatarosidu B (Obr. 10, str. 28). Zatarosid A byl nejvíce zastoupen u rostliny *Z. multiflora* (520,8 %), následován saturejkou zahradní (405,1 %) a nakonec tymiánem obecným (293,7 %).

Co se týče identifikace malonyl-glykosidů, jejichž obsah převážně odlišoval tymián od ostatních látek, jak poukazuje statistické vyhodnocení (Obr. 16, str. 32), jedná se o nadstavbu této diplomové práce. Výběr identifikovaných látek byl zvolen až na základě hmotnostních spekter, která byla vyhodnocena. Z tohoto důvodu se o nich tato práce, resp. diskuze, zmiňuje pouze velmi okrajově. Důležité je ale poukázat na možný potenciál malonyl-glykosidů v souvislosti s jejich zastoupením v jiných rostlinách, jako jsou např. petržel zahradní (Eckey-Kaltenbach et al. 1993), ženšen (Kochkin et al. 2017) či paprika setá (Marín et al. 2004). Bylo zjištěno, že malonizace je jedním z obranných mechanismů rostlin, konkrétně součástí detoxikačních mechanismů buněk (Taguchi et al. 2005).

Zároveň je vhodné poukázat na některé studie poukazující na vliv konjugace glykosidů s kyselinou malonovou, resp. rozdíly mezi konjugovanou a nekonjugovanou formou glykosidů. Například v roce 2014 byla provedena studie mj. zaměřující se na biologickou dostupnost malonyl-glykosilovaných konjugátů isoflavonoidů izolovaných ze sóji, v níž jsou bohatě zastoupeny, která poprvé poukazovala na vyšší biologickou dostupnost nekonjugovaných forem. Předpokládá se, že nižší biologická dostupnost má za následek pomalejší hydrolyzaci malonyl-glykosidů na aglykony, a tedy by mohlo docházet k jejich hydrolyzaci glukosidázami až v tenkém střevě (Yerramsetty et al. 2014).

V další fázi studie se bádání soustředilo na hlavní cíl této diplomové práce, kdy byla testována schopnost derivátů thymochinonu, thymohydrochinonu a zatarosidu, inhibovat růst vybraných bakterií. Ze zveřejněných studií vyplývá, že testování antimikrobiálního účinku rostlin z čeledi hluchavkovitých se zpravidla týká především jejich silic, které obsahují jako hlavní účinné látky monoterpeny – thymol, karvakrol či p-cymen. Ty se mohou vyskytovat v rostlinách volně

či vázané ve formě glykosidů (Karapinar & Esen Aktuğ 1987; Dvořáková et al. 2011; Tauchen & Klouček 2020).

Pro zjištění antimikrobiálních účinků zatarosidu a thymochinonu byla stanovena jejich minimální inhibiční koncentrace (MIC) pomocí mikrodiluční metody a porovnávána s účinností antibiotika tetracyklin. MIC byla stanovena u tří zástupců bakterií, dvou grampozitivních (*S. aureus*, *B. cereus*) a jedné gramnegativní (*E. coli*).

Schopnost zatarosidu inhibovat vybrané bakterie nebyla prokázána ve zvoleném rozsahu, který byl určen jako významný pro stanovení antimikrobiálních účinků. Thymohydrochinon (THQ) během testování vykazoval schopnost inhibovat grampozitivní bakterie *S. aureus* a *B. cereus* již od koncentrace 8 µg/ml. Pokud bychom srovnali thymohydrochinon s thymochinonen, jehož MIC odpovídá proti stejnému kmenu bakterie *S. aureus* 64 µg/ml (Rondevaldova et al. 2017), je možné poukázat na lepší schopnost THQ inhibovat tuto bakterii již při nižších koncentracích. Pro další srovnání je možné poukázat na thymol, jehož MIC u odlišného kmenu *S. aureus* 6538P byla dokonce 310 µg/ml a pro karvakrol a p-cymen dokonce 1,25 mg/ml (Cristani et al. 2007). Jelikož víme, že thymohydrochinon je aglykonem zatarosidu (Ali et al. 1999), můžeme předpokládat, že nedošlo k odštěpení aglykonu pouze vlivem činnosti testovaných bakterií.

Pro komplexnější pohled je důležité srovnání MIC sledovaných izolovaných látek s rostlinnými silicemi v některých dostupných studiích. Minimální koncentrace silice tymiánu obecného pro inhibici růstu bakterií je uváděna u grampozitivní bakterie *S. aureus* v rozsahu 0,2 – 2,5 µg/ml a u gramnegativní *E. coli* v rozsahu 0,45 – 1,25 µg/ml. MIC pro silici dobromysle obecné je uváděna u bakterií *S. aureus* a *E. coli* ve stejném rozsahu 0,5 – 1,2 µg/ml (Burt 2004), tedy poměrně nízké. MIC pro silici saturejky zahradní proti bakterii *S. aureus* (ATCC 25923) je 25 µg/ml a *E. coli* (ATCC 25922) je 25 µg/ml (Kundaković et al. 2014), jsou o řád vyšší. Srovnání může poukazovat na schopnost rozdílné synergie látek obsažených v jednotlivých rostlinách.

7 Závěr

- Byla stanovena minimální inhibiční koncentrace thymohydrochinonu proti grampozitivním bakteriím *S. aureus* a *B. cereus*. Pro zatarosid nebyla stanovena minimální inhibiční koncentrace u žádné z vybraných bakterií.
- Byly identifikovány nové glykosilované deriváty thymochionu. Do studie byla zahrnuta i identifikace derivátů příbuzné látky thymol a glykosidicky vázaných konjugátů s kyselinou malonovou. V extrahované vodné frakci rostliny *Thymus vulgaris* bylo identifikováno nejvíce látek (24), zvláště malonylovaných glykosidů, čímž se odlišoval od ostatních rostlin. V extrahované vodné frakci *Satureja hortensis* bylo identifikováno 21 látek, přičemž se rostlina odlišovala vyšším zastoupením nemalonylovaných glykosidů.
- Testovaná látka zatarosid B byla identifikována ve všech testovaných druzích. Nejvíce zastoupená byla v rostlině *Thymus vulgaris*, následovaná prvním a dosud jediným potvrzeným zdrojem zatarosidu, rostlinou *Zataria Multiflora*. Dále byl předběžně identifikován druhý izomer zatarosid A ve všech rostlinách s nejvyšším zastoupením v *Z. multiflora*.
- Tato práce poukázala na vysokou schopnost thymohydrochinonu inhibovat růst grampozitivních bakterií *S. aureus* a *B. cereus* v porovnání s příbuznými sloučeninami, a tedy i jeho potenciál k dalšímu využití. Potvrzení a vysoké zastoupení glykosidovaného thymohydrochinonu, zatarosidu, ve vodné frakci tymiánu by mohlo mít vysoký potenciál pro další výzkum zaměřený na odštěpení cukerné části.

8 Literatura

- Abulyazid I, Mahdy EME, Ahmed RM. 2013. Biochemical study for the effect of henna (*Lawsonia inermis*) on *Escherichia coli*. *Arabian Journal of Chemistry* **6**:265–273. King Saud University.
- Adam MR, Moss MO. 2010. *Food Microbiology*. The Royal Society of Chemistry.
- Al-Bukhari IM. (b.r.). Book 71: Medicine. Strana 591 Sahih al-Bukhari. Dostupné z https://www.iiium.edu.my/deed/hadith/bukhari/071_sbt.html.
- Ali MS et al. 2015. Antioxidant, anti-inflammatory potential and chemical constituents of *Origanum dubium* Boiss., growing wild in Cyprus. *Phytochemistry* **8**:38–43.
- Ali MS, Saleem M, Akhtar F, Jahangir M, Parvez M, Ahmad VU. 1999. Three p-cymene derivatives from *Zataria multiflora*. *Phytochemistry* **52**:685–688.
- Assaf MH, Ali AA, Makboul MA, Beck JP, Anton R. 1987. Preliminary study of phenolic glycosides from *Origanum majorana*; quantitative estimation of arbutin; cytotoxic activity of hydroquinone. *Planta Medica* **53**:343–345.
- Ayogu JI, Odoh AS. 2020. Prospects and Therapeutic Applications of Cardiac Glycosides in Cancer Remediation. *ACS Combinatorial Science* **22**:543–553.
- Babula P, Mikelová R, Adam V, Potěšil D, Zehnálek J, Kizek R, Havel L, Sladký AZ. 2006. Chromatografické stanovení naftochinonů v rostlinách. *Chemicke Listy* **100**:271–276.
- Bednář M, Fraňková V, Schindler J, Souček A, Vávra J. 1996. *Lékařská mikrobiologie*. Triton.
- Bentley R, Campbell IM. 1974. Biological reactions of quinones. Strany 683–736 *The Chemistry of the Quinonoid Compounds*. Pittsburgh.
- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology* **94**:223–253.
- Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F. 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* **29**:130–135.
- Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V, Bisignano G, Saija A, Trombetta D. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**:6300–6308.
- Croteau R, El-Bialy H, Dehal SS. 1979. Metabolism of Monoterpenes. *Plant Physiology* **64**:169–175.
- Demnerová K. 2012. Mikrobiologická bezpečnost potravin: Současné strategie pro efektivní kontrolu. *Chemicke Listy* **106**:920–925.
- Drnková B. 2019. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena pro zdravotnické obory 1*. Grada, Praha.
- Dvořáková M, Valterová I, Vaněk T. 2011. Monoterpeny v rostlinách. *Chemicke Listy* **105**:839–845.
- Eckey-Kaltenbach H, Heller W, Sonnenbichler J, Zetl I, Schäfer W, Ernst D, Sandermann H. 1993. Oxidative stress and plant secondary metabolism: 6"-O-malonylapiin in parsley.

- Phytochemistry **34**:687–691.
- Epps SVR, Petrujkić BT, Sedej I, Krueger NA, Harvey RB, Beier RC, Stanton TB, Phillips TD, Anderson RC, Nisbet DJ. 2015. Comparison of anti-Campylobacter activity of free thymol and thymol- β -d-glucopyranoside in absence or presence of β -glycoside-hydrolysing gut bacteria. *Food Chemistry* **173**:92–98.
- Ernster L, Dallner G. 1995. Biochemical and physiological aspects of ubiquinone function. *Membrane and Cell Biology* **1271**:195–204.
- Franklin L. 1998. Staphylococcus aureus infections. *The New England Journal of Medicine* **339**:520–532.
- Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider-Stock R. 2006. Thymoquinone: A promising anti-cancer drug from natural sources. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **38**:1249–1253.
- Ghannadi A. 2002. Composition of the essential oil of *Satureja hortensis* L. seeds from Iran. *Journal of Essential Oil Research* **14**:35–36.
- Goyal SN, Prajapati CP, Gore PR, Patil CR, Mahajan UB, Sharma C, Talla SP, Ojha SK. 2017. Therapeutic potential and pharmaceutical development of thymoquinone: A multitargeted molecule of natural origin. *Frontiers in Pharmacology* **8**:1–19.
- Grzunov K, Mastelic J, Ruzic N. 1986. Terpene alcohols in 6-d-glucosides in the leaves of *dalmatian salvia officinalis*. *Progress in Essential Oil Research*:267–270.
- Hajhashemi V, Sadraei H, Ghannadi AR, Mohseni M. 2000. Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology* **71**:187–192.
- Halamova K, Kokoska L, Flesar J, Sklenickova O, Svobodova B, Marsik P. 2010. In vitro antifungal effect of black cumin seed quinones against dairy spoilage yeasts at different acidity levels. *Journal of Food Protection* **73**:2291–2295.
- Hollman A. 1985. Plants and cardiac glycosides. *British Heart Journal* **54**:258–261.
- Hosseinzadeh H, Ramezani M, Salmani G abass. 2000. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss extracts in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* **73**:379–385.
- Iyer AK V., Zhou M, Azad N, Elbaz H, Wang L, Rogalsky DK, Rojanasakul Y, O'Doherty GA, Langenhan JM. 2010. A direct comparison of the anticancer activities of digitoxin MeON-Neoglycosides and O-Glycosides. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **1**:326–330.
- Janča J, Zentrich JA. 1995a. *Herbář léčivých rostlin* 1. díl. Eminent, Praha.
- Janča J, Zentrich JA. 1995b. *Herbář léčivých rostlin* 3.díl. Eminent, Praha.
- Janča J, Zentrich JA. 1995c. *Herbář léčivých rostlin* 5. díl. Eminent, Praha.
- Janča J, Zentrich JA. 1996. *Herbář léčivých rostlin* 4. díl. Eminent, Praha.
- Jarić S, Mitrović M, Pavlović P. 2015. Review of ethnobotanical, phytochemical, and pharmacological study of *thymus serpyllum* L. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2015**.
- Jirásek V, Starý F. 1986. *Atlas léčivých rostlin* 1. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
- Jrah Harzallah H, Kouidhi B, Flamini G, Bakhrouf A, Mahjoub T. 2011. Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity

- of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone. *Food Chemistry* **129**:1469–1474.
- Karapinar M, Esen Aktuğ Ş. 1987. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. *International Journal of Food Microbiology* **4**:161–166.
- Khan H, Khan Z, Amin S, Mabkhot YN, Mubarak MS, Hadda T Ben, Maione F. 2017. Plant bioactive molecules bearing glycosides as lead compounds for the treatment of fungal infection: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **93**:498–509.
- Kitajima J, Ishikawa T, Urabe A, Satoh M. 2004. Monoterpenoids and their glycosides from the leaf of thyme. *Phytochemistry* **65**:3279–3287.
- Klevens RM et al. 2007. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Journal of the American Medical Association* **298**:1763–1771.
- Kochkin D V., Galishev BA, Glagoleva ES, Titova M V., Nosov AM. 2017. Rare triterpene glycoside of ginseng (ginsenoside malonyl-Rg1) detected in plant cell suspension culture of *Panax japonicus* var. *repens*. *Russian Journal of Plant Physiology* **64**:649–656.
- Komaitis ME, Ifanti-Papatragianni N, Melissari-Panagiotou E. 1992. Composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.). *Food Chemistry* **45**:117–118.
- Korbelář J, Endris Z. 1981. *Naše rostliny v lékařství* 5. Avicenum zdravotnické nakladatelství, Praha.
- Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection* **2**:189–198.
- Koukoulitsa C, Karioti A, Bergonzi MC, Pescitelli G, Di Bari L, Skaltsa H. 2006. Polar Constituents from the aerial parts of *Origanum vulgare*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:5388–5392.
- Kren V, Martinkova L. 2012. Glycosides in Medicine: The Role of Glycosidic Residue in Biological Activity; *Current Medicinal Chemistry* **8**:1303–1328.
- Kundaković T, Stanojković T, Kolundžija B, Marković S, Šukilović B, Milenković M, Lakušić B. 2014. Cytotoxicity and antimicrobial activity of the essential oil from *Satureja montana* subsp. *pisidica* (Lamiaceae). *Natural Product Communications* **9**:569–572.
- Kytidou K, Artola M, Overkleeft HS, Aerts JMFG. 2020. Plant Glycosides and Glycosidases: A Treasure-Trove for Therapeutics. *Frontiers in Plant Science* **11**:1–21.
- Marchese A, Orhan IE, Daglia M, Barbieri R, Di Lorenzo A, Nabavi SF, Gortzi O, Izadi M, Nabavi SM. 2016. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry* **210**:402–414.
- Marín A, Ferreres F, Tomás-Barberán FA, Gil MI. 2004. Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:3861–3869.
- Marsik P, Kokoska L, Landa P, Nepovim A, Soudek P, Vanek T. 2005. In vitro inhibitory effects of thymol and quinones of *Nigella sativa* seeds on cyclooxygenase-1- and -2-catalyzed prostaglandin E2 biosyntheses. *Planta Medica* **71**:739–742.
- Mika K. 1988. *Fytoterapia*. Vydavatel'stvo Osveta, Martin.
- Milos M, Mastelic J, Jerkovic I. 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp.

- hirtum). *Food Chemistry* **71**:79–83.
- Nevas M, Korhonen AR, Lindström M, Turkki P, Korkeala H. 2004. Antibacterial Efficiency of Finnish Spice Essential Oils against Pathogenic and Spoilage Bacteria. *Journal of Food Protection* **67**:199–202.
- Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Roodgar Amoli MA. 2003. Chemical Composition of the Fixed and Volatile Oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* **58**:629–631.
- Nikolić M, Glamočlija J, Ferreira ICFR, Calhella RC, Fernandes Â, Marković T, Marković D, Giweli A, Soković M. 2014. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products* **52**:183–190.
- O'Brien. 1991. Review Article Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chemico-biological interactions* **80**:1–41.
- Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **18**:414–420.
- Pilát A, Ušák O. 1960. *Atlas rostlin. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.*
- Ramadan MF. 2007. Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.): An overview. *International Journal of Food Science and Technology* **42**:1208–1218.
- Rondevaldova J, Novy P, Urban J, Kokoska L. 2017. Determination of anti-staphylococcal activity of thymoquinone in combinations with antibiotics by checkerboard method using EVA capmat™ as a vapor barrier. *Arabian Journal of Chemistry* **10**:566–572. King Saud University.
- Saei-Dehkordi SS, Tajik H, Moradi M, Khalighi-Sigaroodi F. 2010. Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology* **48**:1562–1567.
- Sarer E, Scheffer JJC, Baerheim Svendsen A. 1982. Monoterpenes in the essential oil of *Origanum majorana*. *Planta Medica* **46**:236–239.
- Serafini G, Pompili M, Innamorati M, Giordano G, Tatarelli R, Lester D, Girardi P, Dwivedi Y. 2011. Glycosides, depression and suicidal behaviour: The role of glycoside-linked proteins. *Molecules* **16**:2688–2713.
- Shafiee A, Javidnia K. 1997. Composition of essential oil of *Zataria multiflora*. *Planta Medica* **63**:371–372.
- Skočibušić M, Bezić N, Dunkić V. 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chemistry* **96**:20–28.
- Stick R V., Williams SJ. 2009. Enzymatic Cleavage of Glycosides: Mechanism, Inhibition and Synthetic Applications. *Carbohydrates: The Essential Molecules of Life*:253–284.
- Taborsky J, Kunt M, Kloucek P, Lachman J, Zeleny V, Kokoska L. 2012. Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae, and Ranunculaceae families. *Central European Journal of Chemistry* **10**:1899–1906.

- Taguchi G, Shitchi Y, Shirasawa S, Yamamoto H, Hayashida N. 2005. Molecular cloning, characterization, and downregulation of an acyltransferase that catalyzes the malonylation of flavonoid and naphthol glucosides in tobacco cells. *Plant Journal* **42**:481–491.
- Takeuchi H, Lu ZG, Fujita T. 2004. New monoterpene glucoside from the aerial parts of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **68**:1131–1134.
- Tauchen J, Klouček P. 2020. *Léčivé rostliny a jejich biologicky aktivní látky*. 1. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Wink M. 2015. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines* **2**:251–286.
- Yerramsetty V, Gallaher DD, Ismail B. 2014. Malonylglucoside conjugates of isoflavones are much less bioavailable compared with unconjugated β -glucosidic forms in rats. *Journal of Nutrition* **144**:631–637.
- Zomorodian K, Saharkhiz MJ, Rahimi MJ, Bandegi A, Shekarkhar G, Bandegani A, Pakshir K, Bazargani A. 2011. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from three ecotypes of *Zataria multiflora*. *Pharmacognosy Magazine* **7**:53–59.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ATCC = American type culture collection

DTQ = dithymochinon

Glu = glukóza

Hex = hexóza

HRAM = přesně určená hmota s ultravysokým rozlišením

Mal = malonyl

MIC = minimální inhibiční koncentrace

MF = mobilní fáze

MHB = Mueller–Hinton bujón

MS = hmotnostní spektrometrie

NMR = nukleární magnetická rezonance

PCA = analýzy hlavních komponent

Q–TOF = kvadrupól Time-of-Flight

Rham = Rhamnóza

RT = retenční čas

THQ = thymohydrochinon

THY = thymol

TQ = thymochinon

UHPLC = ultravysokotlaká kapalinová chromatografie ve spojení

Xyl = xylóza

ZAT = zatarosid