

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality zemědělských produktů**



**Stanovení antioxidační aktivity látek vázaných na  
křemičité materiály**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Veronika Vlčková**

**Vedoucí práce: Doc. Ing. Lenka Kouřimská, Ph.D.**

© 2015 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stanovení antioxidační aktivity látek vázaných na křemičité materiály" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí 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 datum odevzdání

\_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala všem, kteří mi pomáhali s přípravou práce nebo mě jakkoliv podporovali během jejího vytváření. Především děkuji doc. Ing. Lence Kouřimské, Ph.D. za rady, pomoc a odborné vedení při zpracování diplomové práce.

# Stanovení antioxidační aktivity látek vázaných na křemičité materiály

## Souhrn

Spektrum využití mezoporezních křemičitých materiálů je široké. Lze je použít jako katalyzátory, pro detekci škodlivin a nežádoucích složek v potravinách či ke kontrolovanému uvolňování bioaktivních látek. V experimentální části této diplomové práce je testován mezoporezní křemičitý materiál MCM-41. V současné době se zkoumá řada možností jeho použití v praxi. Především se jedná o využití MCM-41 jako nosiče určitých sloučenin a jejich kontrolovaného uvolňování.

Tato práce je zaměřená na efekt MCM-41 použitého jako nosiče antioxidačních látek. Cílem bylo stanovení a porovnání antioxidační aktivity látek vázaných na MCM-41 a látek volných. Náš předpoklad byl, že antioxidační aktivita látek vázaných na mezoporezní křemičitý materiál bude větší než antioxidační aktivita látek volných. Konkrétní testované sloučeniny byly cinnamaldehyd, karvakrol, thymol, tymochinon, eugenol, allylisothiokyanát a allyldisulfid. Pro stanovení antioxidační aktivity byl vybrán Schaalův test, který probíhal za standardních podmínek (skladování 25 g vzorku v kádinkách za přístupu vzduchu při teplotě 60 °C). Pouze jeden z testů byl proveden za jiných podmínek (skladování 2,5 g vzorku v Petriho miskách za přístupu vzduchu při teplotě 40 °C). Celkově bylo provedeno šest Schaalových testů.

Dle dosažených výsledků nelze potvrdit stanovenou hypotézu. Pouze při koncentraci 0,01 % a 0,08 %, kdy byly testovány všechny vybrané sloučeniny, by mohla být hypotéza potvrzena. Zde čtyři ze sedmi sloučenin měly vyšší antioxidační aktivitu ve formě vázané na MCM-41 oproti formě volné. Ve zbylých testech však byly dosažené protekční faktory naopak nižší u vzorků s antioxidantem vázaným na MCM-41 nebo byly výsledky u obou forem srovnatelné.

Testované antioxidanty v obou formách vykazovaly slabou antioxidační aktivitu ve srovnání se silným antioxidantem, syntetickým BHA.

**Klíčová slova:** mezoporezní křemičité materiály, MCM-41, Schaalův test, silice, antioxidační aktivita

# Determination of antioxidant activity of compounds encapsulated in silica materials

## Summary

The spectrum utilization of mesoporous silica materials is wide. It can be used as catalysts, for the detection of harmful or undesirable components in food or for a controlled release of bioactive compounds. In the practical part of this diploma thesis the mesoporous silica material MCM-41 is tested. There are currently many possibilities of its use in practice which are examined. It's primarily about the use of MCM-41 as a carriers of certain compounds and their controlled release.

This work is focused on the effect of MCM-41 used as carrier of antioxidants. The aim of this thesis was to determine and compare the antioxidant activity of compounds encapsulated in MCM-41 and free compounds. Our presumption was that the antioxidant activity of the compounds encapsulated in mesoporous silica material will be higher than the antioxidant activity of free compounds. The particular compounds which were tested were cinnamaldehyde, carvacrol, thymol, thymoquinone, eugenol, allyl isothiocyanate and allyl disulfid. For the determination of the antioxidant activity the Schaal's test was selected. The test was conducted under standard conditions (25 g of sample stored in beakers in air of 60 °C). Only one of the tests was performed under different conditions (2,5 g of sample stored in a Petri dish in air of 40 °C). Overall, six Schaal's tests were conducted.

According to the results the hypothesis cannot be confirmed. Only, while testing all the selected compounds at the concentration of 0,01% and 0,08 %, the hypothesis might be confirmed. In this case, four of the seven compounds had higher antioxidant activity while encapsulated in MCM-41 compared to the free form. However, in the remaining tests the protection factors were obtained lower in samples with compounds encapsulated in MCM-41 or the results were comparable for both forms.

Antioxidants tested in both forms showed weak antioxidant activity in comparison with the strong antioxidant, synthetic BHA.

**Keywords:** mesoporous silica materials, MCM-41, Schaal test, essential oils, antioxidant activity

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Cíl práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Přehled literatury .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Mezoporézní křemičité materiály .....</b>	<b>10</b>
3.1.1 Využití křemičitých materiálů jako katalyzátorů.....	10
3.1.2 Detekce škodlivin a nežádoucích složek v potravinách pomocí MKM ....	13
3.1.3 Kontrolované uvolňování bioaktivních látek.....	15
3.1.4 MCM-41 .....	17
3.1.4.1 MCM-41 jako selektivní médium pro separaci látek .....	18
3.1.4.2 MCM-41 a kontrolované uvolňování bioaktivních látek.....	19
3.1.4.3 MCM-41 jako nosič antioxidantů .....	19
<b>3.2 Antioxidanty .....</b>	<b>20</b>
3.2.1 Cinnamaldehyd .....	21
3.2.1.1 Antioxidační aktivita cinnamaldehydu .....	21
3.2.2 Karvakrol.....	23
3.2.2.1 Antioxidační aktivita karvakrolu.....	23
3.2.3 Thymol .....	24
3.2.3.1 Antioxidační aktivita thymolu .....	24
3.2.4 Tymochinon.....	25
3.2.4.1 Antioxidační aktivita tymochinonu .....	26
3.2.5 Eugenol.....	26
3.2.5.1 Antioxidační aktivita eugenolu .....	27
3.2.6 Allylisothiokyanát .....	28
3.2.6.1 Antioxidační aktivita allylisothiokyanátu .....	28
3.2.7 Allyldisulfid.....	29
3.2.7.1 Antioxidační aktivita allyldisulfidu .....	29
<b>4 Experimentální část .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Materiály .....</b>	<b>31</b>
4.1.1 Sádlo.....	31
4.1.2 MCM-41 .....	31

4.1.3	Antioxidanty .....	31
4.1.4	Činidla potřebná pro stanovení peroxidového čísla .....	31
4.1.5	Přístroje.....	31
<b>4.2</b>	<b>Metody.....</b>	<b>32</b>
4.2.1	Stanovení antioxidační aktivity dle Schaala .....	32
4.2.1.1	Postup Schaalova testu .....	33
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>35</b>
5.1	Schaalův test č. 1 .....	35
5.2	Schaalův test č. 2 .....	37
5.3	Schaalův test č. 3 .....	38
5.4	Schaalův test č. 4 .....	39
5.5	Schaalův test č. 5 .....	40
5.6	Schaalův test č. 6 .....	41
5.7	Grafické srovnání výsledků antioxidační aktivity .....	43
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>Seznam zkratk.....</b>	<b>60</b>
<b>10</b>	<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>62</b>
<b>11</b>	<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>63</b>
<b>12</b>	<b>Seznam grafů.....</b>	<b>64</b>

# 1 Úvod

Mezoporézní křemičité materiály mají řadu využití, mezi něž patří i použití v potravinářském, kosmetickém či farmaceutickém průmyslu. Lze je použít jako katalyzátory, pro detekci škodlivin a nežádoucích složek v potravinách a pro kontrolované uvolňování bioaktivních látek.

Jedním z nejvíce prozkoumaných a testovaných je MCM-41. V oblasti zájmu je jeho použití jako nosiče bioaktivních látek, jeho schopnost působit jako selektivní médium a možnost použití pro kontrolované uvolňování látek, které může být podmíněno různými externími podněty chemickými, fyzikálními či enzymatickými. V současných studiích je zkoumáno jeho využití jako nosiče antioxidantních látek, které jsou v potravinářském průmyslu využívány k prodloužení trvanlivosti řady potravin. Zkoumá se využití MCM-41 jako nosiče antioxidantů v obalových materiálech a ve funkčních potravinách.

Pro porovnání antioxidantní aktivity látek vázaných a nevázaných na mezoporézní křemičitý materiál byly vybrány přírodně identické sloučeniny cinnamaldehyd, karvakrol, thymol, tymochinon, eugenol, allylthiokyanát a allyldisulfid.

Vzhledem k lepší stabilitě MCM-41 v lipofilním prostředí byl vybrán pro experimentální část Schaalův test, hodnotící oxidační stabilitu sádla.



## 2 Cíl práce

Cílem práce bylo porovnání antioxidační aktivity látek vázaných a nevázaných na mezoporézní křemičité materiály a shrnutí aktuálních poznatků na dané téma. Zkoumané sloučeniny byly cinnamaldehyd, karvakrol, thymol, tymochinon, eugenol, allylthiokyanát a allyldisulfid. Dané sloučeniny byly testovány buď samostatně nebo vázané na mezoporézní křemičitý materiál MCM-41.

Práce měla potvrdit či vyvrátit následující hypotézu:

Antioxidační aktivita biologicky aktivních látek vázaných na křemičité materiály je větší než aktivita látek nevázaných.

## 3 Přehled literatury

### 3.1 Mezoporézní křemičité materiály

Mezoporézní křemičité materiály (MKM), taktéž zvané jako mezoporézní molekulová síta, byly objeveny v roce 1992 společností Mobil Research and Development Corporation. Původní záměr vývoje těchto materiálů bylo jejich využití pro katalytické krakování těžkých olejových frakcí (Rathouský et al., 1997). V posledních letech se, mimo jiné, zkoumá jejich možné použití v oblasti zdravotnictví či potravinářství. Užívají se pro kontrolované uvolňování bioaktivních látek, vitamínů, léčiv, nutraceutik či silic, také slouží jako katalyzátory v syntéze základních nutrientů či k detekci škodlivin (Bernardos and Kouřimská, 2013).

Jedná se tedy o materiály tvořené oxidem křemičitým, které mohou být připravovány v různé formě. Ta spočívá především ve specifické velikosti pórů, které dosahují velikosti kolem 2 až 10 nm. Další vlastnosti mezoporézních křemičitých materiálů jsou velká specifická plocha povrchu (o velikosti až 1200 m<sup>2</sup>/g), vysoká nosnost, stabilita, biokompatibilita, inertnost, dále také homogenní velikost pórů s možností uzavření a snadná funkcionalizace (Bernardos and Kouřimská, 2013). Tyto unikátní vlastnosti pak doplňuje bezpečnost těchto materiálů vzhledem k životnímu prostředí a lidskému organismu. Toto vyplývá ze znalostí o syntetickém amorfním oxidu křemičitém, který je používán již několik desetiletí v široké škále průmyslových odvětví, včetně potravinářského, kosmetického a farmaceutického průmyslu. K tomuto závěru docházíme na základě rozsáhlých chemicko-fyzikálních, ekotoxilogogických, toxikologických, bezpečnostních a epidemiologických dat, kdy musí být dodržena podmínka, že je tento materiál vyvíjen a používán podle současných hygienických standardů a doporučení (Fruijtier-Polloth, 2012).

#### 3.1.1 Využití křemičitých materiálů jako katalyzátorů

Výborné vlastnosti MKM vedou k vysoké flexibilitě v možném využití. Aby se mohly tyto materiály použít jako katalyzátory, tak se kupříkladu podrobují izomorfní substituci některých prvků (např. Al) do silikátové mřížky, čímž získají kyselé vlastnosti, inkorporací vanadu a titanu získávají vlastnosti oxidační a bazické vlastnosti mohou získat náhradou protonů alkalickými kationty jako je kation cesný nebo sodný (Rathouský et al., 1997).

Jedny z prvních prací zabývajících se možností spojení mezoporézních materiálů a potravinářství se objevují od roku 2000. MKM jsou v nich využívány jako katalyzátory

v syntéze mastných kyselin. Jako katalyzátor jsou v tomto případě aplikovány křemičité materiály typu MCM-41 (z angl. mobil crystalline materials No. 41), jež jsou funkcionalizovány sulfonovou kyselinou. Cílem je vznik monoglyceridů. Jejich výroba byla možná již před užitím křemičitých materiálů, avšak použití funkcionalizovaného MCM-41 optimalizovalo jejich výtěžnost. Selektivně katalyzovaly potřebné reakce, neboť vykazovaly vysokou kyselost a dobrou přístupnost k aktivním centrům vzhledem k velikosti kanálků o průměru přesahujícím 1,4 nm. Takto získané estery mastných kyselin s glycerolem jsou žádanými chemickými produkty hojně využívanými jako emulgátory v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu (Márquez-Alvarez et al., 2004).

Hexagonální mezoporézní křemičité materiály mohou být také využity v procesu Claisenova přesmyku allylfenyletherů, který nastává při iniciačních podmínkách, které zahrnují typicky teplotu přesahující 200 °C. Použitím MKM jako pevných kyselin, které katalyzují přesmyk, se stává celá reakce ekologicky šetrnější. Tímto procesem se mohou získávat cenné produkty, jež se dále používají jako vonné či chuťové přísady v potravinářství, farmacii a dalších přechodných průmyslových odvětví (Yadav and Lande, 2006). Velký zájem o tyto materiály je i ze strany výrobců bionafty. Základními surovinami bionafty jsou rostlinné oleje, živočišný tuk a odpad ve formě odpadních olejů z vaření a tuku. Vzhledem k tomu, že jsou MKM nezávadné vůči životnímu prostředí, mohou být vhodným katalyzátorem vstupujícím do procesu výroby bionafty (Melero 2009; Srinivas and Satyarthi, 2011). Práce autorů Srinivas and Satyarthi (2011) se zabývá katalytickými vlastnostmi MCM-41 funkcionalizovaným hliníkem. Dalším autorem, který zkoumá možnosti MKM ve výrobě bionafty je Chen et al. (2014). Ve své práci se zaměřují na materiál SBA-15 (z angl. Santa Barbara amorphous type material), který funkcionalizovali sulfonovou kyselinou. Závěry experimentu byly, že při použití funkcionalizovaného SBA-15 v procesu jako katalyzátoru byla hladina vedlejších nežádoucích produktů velmi nízká, také že je katalyzátor odolný vůči vodě a volným mastným kyselinám a nakonec byl i opětovně použitelný, jelikož byla zachována jeho vysoká aktivita. Negativním ukazatelem při výrobě bionafty je vyšší přítomnost volných mastných kyselin. Na jejich katalytickém odstranění se využil také materiál SBA-15 funkcionalizovaný fenylsulfonovou kyselinou. Pevné částice SBA-15 katalyzovaly esterifikaci volných mastných kyselin s methanolem v testovaných rostlinných olejích. Tento kyselý katalyzátor pak vykazuje dobrou stabilitu a umožňuje i několikanásobné použití bez ztráty katalytické aktivity (Xie et al., 2013).

Další využití křemičitých materiálů je v biokatalýze. Nanočástice tvořené magnetitem, zlatem nebo oxidem křemičitým byly prvními nanomateriály aplikovanými v této oblasti.

Enzymy kapsulované v křemičitých nanočásticích jsou vysoce stabilními biokatalyzátory (Wang, 2009). Příklad konkrétního enzymu zkoumal Zhang (2011). Jeho práce byla zaměřena na enzym xylitol dehydrogenázu (XDH), který může být užíván pro enzymatickou syntézu různých vzácných cukrů. Imobilizace XDH na křemičité nosiče nezlepšila průmyslovou produkci vzácných cukrů. Při testování se však autor zaměřil konkrétně na xylitol dehydrogenázu produkovanou rekombinantní bakterií *Rhizobium etli* CFN42 (ReXDH). L-xylulóza, vzniklá biotrasformací xylitolu, katalyzované ReXDH, má možnost využití v medicíně při diagnostice hepatitidy. I další vzácné cukry, které mohou vznikat podobným způsobem, mají řadu aplikací i ve farmacii či v potravinářství.

Moelans et al. (2005) zkoumali typy imobilizace na MKM. Porovnávali klasickou přímou metodu adsorpce s novou nepřímou metodou termicky aktivované difúze. Nová metoda skýtá potenciál v možnosti ovlivňování imobilizovaného množství a následné katalytické aktivity některých biomolekul. Výzkum ukázal, že klasická metoda je ve většině případů účinnější, avšak u některých biomolekul může být imobilizace termicky aktivovanou difúzí výhodnější. Nejednoznačné výsledky poukazují na nutnost dalšího přezkoumání celkového konceptu imobilizace biomolekul na porézních materiálech. Přehled MKM užívaných jako katalyzátory uvádí Tabulka 1.

**Tabulka 1 Mezoporézní křemičité materiály jako katalyzátory (Bernardos and Kouřimská, 2013)**

MKM	Katalyzátor	Syntetizovaná látka	Aplikace v potravinářství
MCM-41	sulfonové kyseliny	mastné kyseliny	emulgátory
MCM-41	Pd <sub>6</sub> Ru <sub>6</sub> /SiO <sub>2</sub>	nylon-6	obalové materiály
MCM-41	Pd <sub>6</sub> Sn/SiO <sub>2</sub>	nylon-6	obalové materiály
HSM	heteropolykyseliny	6-allyl-2,4-di-terc-butylfenol	cenné produkty
Mezostруктурální pevné látky	sulfonová kyselina	metylestery mastných kyselin	produkce bionafty
SBA-15	enzymy	biomolekuly	vývoj potravin
RL-SBA-15	enzymy	biomolekuly	vývoj potravin
MSU-X	enzymy	biomolekuly	vývoj potravin
Nanoporézní křemičité sklo	enzymy	cukry	potravinářský průmysl
Nanotechnologické nosiče	enzymy	odstraňovač biofilmů	potravinářské zpracování
Epoxidové křemičité nanočástice	xylitol dehydrogenáza	L-xylulóza	potravinářský průmysl
Nanostrukturovaná silica	Au	laktobionová kyselina	potravinářský průmysl

MCM-41- mobil crystalline materials No.41; HMS- hexagonální mezoporézní křemičitý materiál; SBA-15- Santa Barbara amorphous type material; RL-SBA-15- Rod-like SBA-15; MSU-X- Michigan State University

### 3.1.2 Detekce škodlivin a nežádoucích složek v potravinách pomocí MKM

Obecné povědomí o potřebě monitorování a kontrolování průmyslových procesů roste. Proto je snaha o zlepšení metod detekce různých škodlivin či nežádoucích nezdravých produktů, a to jak z hlediska citlivosti, tak z hlediska dostupnosti a jednoduchosti.

Jedním z velmi diskutovaných témat je přítomnost dusitanových iontů v pitné vodě a potravinách. Dusitanové ionty jsou potenciálně toxické pro lidský organismus, a proto byly Evropskou unií stanoveny limity pro jejich maximální hodnoty. Několik postupů stanovujících množství dusitanových iontů již bylo navrhováno, ale žádný neumožňoval spolehlivou a také rychlou analýzu komplexních vzorků. Je zde tedy prostor pro alternativní metody, které budou do praxe vhodnější než metody dříve navrhované. Možnou alternativou může být metoda, která se zabývá biodetekčním zařízením užívajícím stabilní enzymy s vysokou aktivitou a specificitou k dusitanům. Dusitany redukující enzymy se používají v nejmodernějších elektrochemických a optických metodách, kde se také nabízí využití MKM (Almeida et al., 2010).

MKM mohou být využity také jako senzory šťavelové kyseliny (OA - oxalic acid), která je pro organismus toxická prostřednictvím tvorby šťavelanu vápenatého, což může mít při jeho nadměrném množství za následek hypokalcémii nebo dokonce selhání ledvin. Detekci OA pomocí křemičitého materiálu SBA-15 se věnovali Raoof et al. (2015). Materiál SBA-15 je v jejich práci funkcionalizován palladiem (Pb/SBA-15) a použit při voltametrické detekci OA. Elektrooxidace OA může být katalyzována Pb/SBA-15 a detekce touto metodou má stabilní výsledky, proto lze očekávat aplikaci metody na vzorky potravin a do budoucna i možnost praktického využití. Voltametricky se stanovuje celá řada nežádoucích látek, další u které se zkoumá potenciální použití MKM je fungicid karbendazim, který je potenciálním karcinogenem a teratogenem. Jeho detekci v pomerančovém džusu se zabývali Razzino et al. (2015). MKM, v tomto případě s uhlíkem, použili jako tenký film na skleněné elektrodě. Takto provedené přímé elektrochemické stanovení carbendazimu vykazovalo taktéž vysokou citlivost a nízkou mez detekce.

Současným trendem bezpečnosti potravin je podpora vývoje metod detekujících také látky, které se mohou vyskytovat v potravinách ve stopových množstvích, jež mohou negativně působit na lidský organismus. Biogenní aminy spadají do této kategorie, neboť v kombinaci s některými léčivy nebo v případě osob, které mají poškozená játra, mohou ve vyšším množství působit škodlivě na centrální nervový systém či systém kardiovaskulární. Detekci těchto látek se zabývali García-Acosta et al. (2006). Pro chromo-fluorogenní test

využili mezoporézní křemičitý materiál obsahující pyrilium. Užití těchto pevných látek demonstrovalo, že kombinace molekulárního konceptu a 3D pevné fáze se změněnými vlastnostmi (například možnost uzavírání do pórů či hydrofobnost) teoreticky otvírá cesty k vývoji lepší detekce konkrétních látek.

Sudan I je průmyslové barvivo používané pro barvení plastů a jiných syntetických materiálů. Jeho přidávání do potravin je zakázáno z důvodu potenciální karcinogenity. Jeho přítomnost byla zjištěna v chilli, kurkumě nebo také v palmovém oleji. Je tedy nezbytné jeho rychlé stanovení. Pro tento účel byla vyvinuta rychlá, citlivá a k praktickému použití vhodná elektrochemická metoda, která zahrnuje užití charakteristických vlastností mezoporézního  $\text{SiO}_2$ . Tato metoda byla již i úspěšně využita v praxi k detekci Sudan I v pálivém chilli prášku a ve vzorcích džusů (Yang and He, 2010).

Dalším cílem detekce senzorů s MKM je norethisteron. Jedná se o druh anabolického steroidního hormonu, který se užíval hojně pro podporu růstu hospodářských zvířat a v některých případech i ilegálně při jejich množení. Rezidua norethisteronu v krmivech však představovala riziko pro lidský organismus, a proto byl nakonec zakázán i pro účel podpory růstu hospodářských zvířat. Jeho detekce je možná pomocí mezoporézních křemičitých nanočástic (MSN) funkcionalizovaných aminoskupinou. Na takto připravené MSN je možné imobilizovat nanočástice zlata, které slouží k adsorpci křenové peroxidázy a následně protilátky  $\text{Ab}_2$ . Výsledná nanočástice označuje imunosenzory pro detekci antigenu norethisteronu. Tento typ označení imunosenzorů má velký potenciál v detekci růstových hormonů u potravin živočišného původu (Wei et al., 2010).

Detekce těžkých kovů je také důležitou součástí ve snaze zajistit spotřebiteli bezpečnost potravin. Jejich přímé stanovení v komplexních vzorcích není možné. Materiál MCM-48 funkcionalizovaný pyridinem je používán v metodě detekující nikl a olovo. Jedná se o novou, citlivou a nízkorozpočtovou metodu extrakce na pevnou fázi se stanovením konkrétních hodnot pomocí atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací. Tuto metodu testovali Sadeghi et al. (2011) na různých typech zeleniny a porovnávali se dvěma standardními referenčními materiály. Výsledky potvrdily přesnost metody a byly optimalizovány její parametry.

Šířičitany jsou v současnosti přidávány do potravin a nápojů jako konzervační či antimikrobiální činidla. Jejich vysoká expozice však může mít negativní dopady na lidský organismus, může se konkrétně jednat o různé formy dermatitidy, hypotenzi nebo gastrointestinální potíže, a pokud se jedná o osoby se zvýšenou citlivostí na tyto látky, tak i malá dávka může vyvolat bronchokonstrikci či astmatický záchvat. Proto je velký zájem

o vývoj rychlé a účinné metody pro jejich detekci. Santos-Figueroa et al. (2013) pro jeho detekci použili hydrofobní hybridní anorganicko-organické křemičité nanočástice. Tento materiál byl použit pro stanovení siřičitanů v červeném víně. Přehled MKM s možností užití pro detekci nežádoucích látek je uveden v Tabulce 2.

**Tabulka 2 Mezoporézní křemičité materiály jako sensory (Bernardos and Kouřimská, 2013)**

<b>MKM</b>	<b>Senzor</b>	<b>Nežádoucí škodlivá látka</b>
HSM	enzym	dusitany
MCM-41	sloučeniny pyrilia	biogenní aminy
MCM-41	merkaptopropylové skupiny	metylrtuť
SMPS	ligand cyklického etheru	biogenní aminy
Mezoporézní SiO <sub>2</sub>	mezoporézní SiO <sub>2</sub>	Sudan I
Mezoporézní SiO <sub>2</sub>	mezoporézní SiO <sub>2</sub>	Sudan I
MSN	protilátka Ab <sub>2</sub>	antigen norethisteronu
MSN	GMSNs	rezidua streptomycinu
MCM-48	pyridin	nikl

HMS- hexagonální mezoporézní křemičitý materiál; MCM-41- mobil crystalline materials No. 41; SMPS- mezoporézní křemičité nosiče; GMSNs- mezoporézní křemičité materiály obsahující nanočástice zlata; MCM-48- mobil crystalline materials No. 48

### 3.1.3 **Kontrolované uvolňování bioaktivních látek**

Obecně může být uvolňování biologicky aktivních látek enkapsulovaných a uzavřených v MKM spuštěno, je-li prostředí definováno určitým pH či přítomností některých enzymů. V případě, že není aktivní látka zcela opouzdřena, tedy že nejsou mezopóry zavřeny bránou (z angl. gate-like), tak se bioaktivní látky uvolňují postupně. Toto postupné uvolňování je vhodné například pro aktivní obalové materiály. Vhodné jsou pro toto uplatnění antioxidantní látky, které se mohou podílet na údržnosti potravin s obsahem tuků. Heiglins et al. (2004) se tímto tématem zabývali. Vyšetřovali efekt polymerních materiálů s různou polaritou, nízkohustotní polyethylen (LPDE) a ethylen vinyl acetát (EVA), na migrační chování antioxidantu. Jako antioxidant si zvolili  $\alpha$ -tokoferol, který se běžně používá jako přídatná látka v potravinářském průmyslu.  $\alpha$ -tokoferol byl adsorbován na dva typy křemičitých materiálů, SBA-15 a Syblock. Křemičitý materiál v celém procesu zajišťuje nejen kontrolované a dostatečné uvolňování antioxidantu během skladování potraviny, ale také jeho ochranu během extruze (vytlačování) materiálu. Závěry byly takové, že migrace (při 80 % z migrace celkové) byla v případě LPDE opožděna o 2,4 dne oproti EVA, dále že při použití

křemičitých materiálů bylo toto opoždění 3,4 dne bez rozdílu mezi typy materiálu. Statisticky významný byl i rozdíl mezi množstvím antioxidantu v čisté formě a ve formě vázané na křemičitém materiálu, které se dostalo do simulantu potravin. V čisté formě se jednalo o 82 % a antioxidant, který se uvolňoval z MKM byl využit v celém množství. Podobnou studii provedli Garguilo et al. (2013). Zkoumali materiál LPDE s křemičítým materiálem SBA-15, na kterém byl taktéž navázán  $\alpha$ -tokoferol. Porovnávali vzorky SBA-15 funkcionalizovaného aminy s antioxidantem a čistého SBA-15 s antioxidantem. Polymerní film s modifikovaným SBA-15 uvolňoval  $\alpha$ -tokoferol pomaleji než film s čistým SBA-15. Antioxidační efektivita tokoferolu byla tudíž vyšší u modifikovaného křemičitého materiálu.

Park et al. (2011) zkoumali dva typy MKM jako nosiče allylisothiokyanátu (AITC) a jeho antimikrobiálních vlastností. Testovali MCM-41 a SBA-15. Oba nosiče desorbovali až 90 % AITC během 96 hodin. Rozdíly byly v průběhu desorpce, kdy SBA-15 desorbovalo během prvních 12 hodin 65 % mikrobiální látky a MCM-41 pouze 20 %. U MCM-41 bylo tedy uvolňování pozvolnější.

Jak již bylo zmíněno, tak v případě, že je bioaktivní látka v MKM uzavřena, může být kontrolovaně uvolněna při určitém pH, či v přítomnosti určitých enzymů. K uvolnění bioaktivní látky může dojít také při změně redoxního potenciálu prostředí nebo v přítomnosti světla. Externí podnět k uvolnění látky tedy může být chemický, fyzikální anebo enzymatický. Jakým způsobem dojde k uvolnění, určuje typ brány, kterou je daná MKM uzavřena. Jedním z příkladů jsou laktózou uzavřené mezoporézní křemičité nosiče (SMPS), které mohou být selektivně otevřeny působením enzymu  $\beta$ -D-galaktosidázy.  $\beta$ -D-galaktosidáza je enzym, který se běžně vyskytuje v lidském organismu kolem kartáčového lemu enterocytů tenkého střeva. Je tedy možné jejich budoucí použití jak ve farmacii, tak v potravinářském průmyslu (Bernardos et al., 2009).

K uvolňováním látek z mezoporézních materiálů pomocí světla se osvědčily například MSN uzavřené nanočásticemi zlata. Kontrolovaným uvolňování látek z MSN se zabýval i Agostini et al. (2012). K uzavření MSN bylo využito fragmentu *o*-methoxybenzylaminu, který se štěpí za přítomnosti UV záření. Tento typ kontrolovaného uvolňování je slibnou moderní možností ve vývoji řízeného transportu látek.

Uzavřené MKM, které lze otevřít pomocí záření mají velký potenciál v medicíně a to především v oblasti léčby různých typů nádorových onemocnění. Řada prací se věnuje tomuto tématu a jedním z nich je práce Lin et al. (2010). Práce se zabývá kumarinem uzavřeným MSN. Kumarin byl dobrým spouštěčem v přítomnosti záření (z angl. phototrigger) pro kontrolované uvolňování léčiv či fluorescenčních látek potřebných pro některé medicínské



zobrazovací techniky. Uvolňování látek bylo možné přesně regulovat pomocí změny vlnové délky, intenzity nebo doby působení záření.

Medicínské využití mají i MKM schopné uvolňovat léčivé látky při určitém pH. Ve srovnání s normálními tkáněmi jsou totiž tkáně postižené zánětem nebo nádorovými změnami kyselější. Nabízí se tedy možnost využití těchto materiálů pro jejich schopnost působit právě v místě problému a navíc s pozvolnějším uvolňováním a tudíž s delší dobou působení, čímž se může snížit celkové zatížení organismu. Příkladem jsou MSN, které uzavírají léčiva pomocí brány tvořené makrocyclickým  $\beta$ -cyklodextrinem ( $\beta$ -CD). V neutrálním prostředí nedochází k uvolňování léčiv, až mírně kyselé prostředí způsobí oslabení vazby  $\beta$ -CD a následuje uvolnění bioaktivní látky (Wang et al., 2014).

**Tabulka 3** Kontrolované uvolňování bioaktivních látek (Bernardos and Kouřimská, 2013)

Mezoporézní nosič	Bioaktivní látka	Mechanismus uvolňování	Funkce v potravinářství
SBA-15	$\alpha$ -tokoferol	migrace	antioxidant
SMPS	kurkumin	migrace	nutraceutika
SMPS	oligofenol	migrace	nutraceutika
SMPS	trans- $\beta$ -karoten	migrace	nutraceutika
MCM-41	vitamin B <sub>2</sub>	změna pH	mikronutrient
Mesoporous silica Hollow	vitamin B <sub>3</sub>	změna pH	mikronutrient
MCM-41	barvivo	přítomnost $\beta$ -D-galaktosidázy	nutrient
MCM-41	allylthiokyanát	adsorpce-desorpce	antimikrobní
SBA-15	allylthiokyanát	adsorpce-desorpce	antimikrobní
SMPS	(-)-mentol	adsorpce-desorpce	anestetikum/protidráždivý

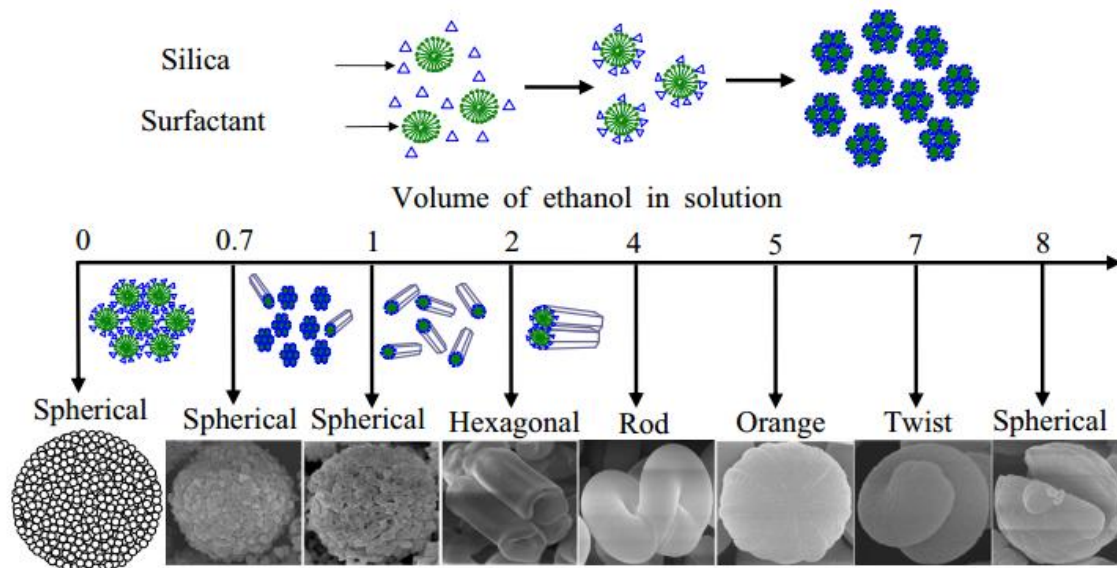
SBA-15- Santa Barbara amorphous type materia; SMPS- mezoporézní křemičité nosiče; MCM-41- mobil crystalline materials No. 41

### 3.1.4 MCM-41

MCM-41 byly objeveny společně se skupinou mezoporézních molekulových sít M41S v roce 1992. Zkratka MCM-41 vychází z anglického názvu „Mobil Composition of Matter 41“, současně se také uvádí jako „mobil crystalline materials No. 41“ (Brady et al., 2008). Obecné vlastnosti MCM-41 jsou stejné jako u MKM, tudíž se jedná o materiál s vlastnostmi velmi dobrými pro užití materiálu jako nosiče různých funkčních látek bez rizika pro životní prostředí a lidský organismus.

MCM-41 je tvořen rovnoběžnými kanály šestiúhelníkového průřezu, které jsou uspořádány do hexagonální voštinové struktury. Velikost kanálů je zpravidla 3 - 4 nm a je dána způsobem syntézy. Stěny mají rozměry 0,8 - 1 nm. Tenké stěny v porovnání s velikostí pórů způsobují extrémní parametry molekulového síta, kdy plocha povrchu kanálů dosahuje

hodnot  $1100 \text{ m}^2/\text{g}$  a objem činí  $0,8 - 0,9 \text{ cm}^3/\text{g}$  (Rathouský et al., 1997). Nedávná studie Qu et al. (2014) poukazuje na možnosti úpravy morfologie pomocí množství ethanolu v základním roztoku, ve kterém se připravuje MCM-41. S různým množstvím ethanolu se mění velikost pórů, jejich objem, povrch a také celkový vzhled materiálu, viz Obrázek 1.



Obrázek 1 Shrnutí vlivu množství ethanolu na morfologii křemičitého materiálu (Qu et al. 2014)

#### 3.1.4.1 MCM-41 jako selektivní médium pro separaci látek

Mezoporézní křemičitá síta, včetně MCM-41, mohou být slibná jako selektivní média s použitím pro separaci vysokomolekulárních látek, kupříkladu bílkovin, což je v zájmu potravinářského a farmaceutického průmyslu. Řada těchto aplikací zahrnuje separaci z vodných roztoků, ve kterých má MCM-41 omezenou stabilitu. Vytvořením hydrofobního povrchového povlaku z hexamethyldisilozanu (HMDS) se stabilita MCM-41 ve vodném roztoku výrazně zlepšila. Silylací HMDS se zvýšila jeho stabilita až na 12 dní. (Kisler et al., 2003).

Mezoporézní křemičitá síta mají jedinečné vlastnosti žádoucí pro adsorpci látek, díky nimž se nabízí možnost separace na základě specifické velikosti a povrchu daných látek. Kisler et al. (2001) zkoumali použití MCM-41, a také MCM-48, pro separaci biologických molekul. Konkrétně se jednalo o proteiny lysozym a trypsin a o vitamín riboflavin. Výsledky ukázaly dobrý potenciál těchto materiálů pro výlučnou separaci.

Ve výzkumu Sezões et al. (2010) byla porovnávána separace modelových bílkovin o různé velikosti, lysozymu, který má poměrně malé rozměry a bovinního sérového albuminu s rozměry velkými. MCM-41 byl porovnáván s dalšími MKM (SBA-15 a MCF-

mezostrukturované buněčné pěny). Jako potenciálně lepšími materiály pro separaci bílkovin vyšly SBA-15 a MCF, mezi nimiž nebyl statisticky významný rozdíl.

#### 3.1.4.2 MCM-41 a kontrolované uvolňování bioaktivních látek

Bernardos et al. (2008) zjišťovali možnosti MCM-41 jako nosiče pro kontrolované uvolňování vitamínu B<sub>2</sub>. V případě použití tohoto materiálu *per os*, může představovat materiál MCM-41 uzavřený bránou, reagující na pH prostředí, ochranu biologicky aktivní látky a je tudíž schopný dodat látku přes kyselé prostředí žaludku, kdy je brána uzavřena, do zásaditého prostředí střeva, které umožňuje otevření brány a tudíž uvolňování a následné vstřebávání vitamínu. MCM-41 byl v tomto případě funkcionalizován aminoskupinou a test byl prováděn v prostředí vody.

Průmyslovým odvětvím, ve kterém má MCM-41 velký potenciál je farmacie, kde se může uplatnit jako nosič určený pro řízené uvolňování řady léčivých látek. MCM-41 funkcionalizovaný aminoskupinou byl zkoumán jako nosič modelového léku, ibuprofenu. Jako kontrolní vzorek sloužil čistý MCM-41 s ibuprofenem. Navíc byly oba materiály provedeny ve dvojí formě, s homogenní velikostí pórů a s póry nepravidelného tvaru. Výsledky ukázaly, že delší doba uvolňování léku, a tudíž usnadnění jeho podávání, je u materiálu funkcionalizovaného aminoskupinou s homogenní velikostí pórů (Manzano et al., 2008).

Mesalazin by mohl být jednou z látek, pro které je vhodné použití MCM-41 jako nosiče. Jedná se o protizánětlivý lék s nízkou rozpustností a citlivostí na světlo, jehož příprava je poměrně náročným procesem. Používá se v léčbě idiopatických střevních onemocnění (Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida). Vhodnou metodou jeho imobilizace na MCM-41, která by mohla zvýšit jeho stabilitu a biologickou dostupnost, se zabývali Popova et al. (2014b). Jako nosiče mesalazinu použili MCM-41 funkcionalizovaný amino- anebo karboxylovou skupinou. Nanočástice byly nakonec potaženy alginátem sodným, což ještě upravilo dobu uvolňování a snížilo cytotoxicitu mesalazinu. Takto upravený nosič se jeví jako vhodný pro perorální podávání léku.

#### 3.1.4.3 MCM-41 jako nosič antioxidantů

Resveratrol je polyfenolická sloučenina vyskytující se v největší míře ve vinné révě, ale také ve vysoce pigmentovaném ovoci a zelenině. Bylo prokázáno, že je silným antioxidantem, že působí protizánětlivě a také že působí proti nádorovému bujení. Jedná se

o poměrně stabilní sloučeninu, ovšem pouze v případě, že je chráněn před světlem a vysokými hodnotami pH (Suwalsky et al., 2015). Jeho imobilizací a následným možným kontrolovaným uvolňováním se zabývali Popova et al. (2014a). Testovali jeho imobilizaci na sférický MCM-41. Stabilizace biologicky aktivního trans-resveratrolu na křemičitý materiál byla velmi účinná. Při uvolňování vykazoval resveratrol lepší rozpustnost než v případě jeho volné formy a imobilizací na MCM-41 byl taktéž chráněn před izomerizací na biologicky neaktivní cis-resveratrol.

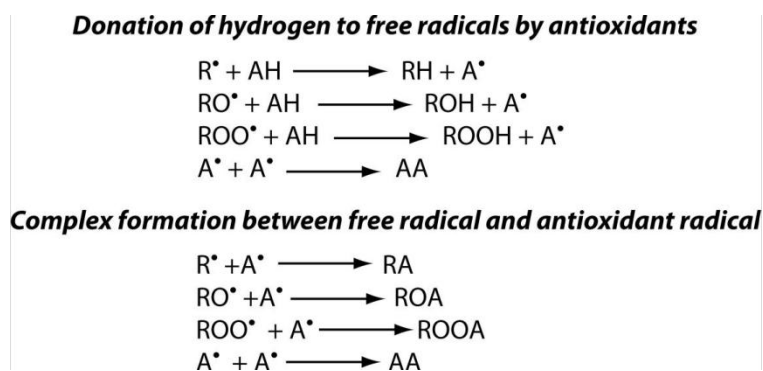
Rutin, glykosid kvercetinů, je antioxidační látka vyskytující se v hojné míře ve vyšších rostlinách, v pohance a v ovoci, především v ovocných slupkách citrusových plodů (pomeranč, grapefruit, citron a limetka). Imobilizací rutinu na MCM-41 za účelem stabilizace flavonoidů se zabývala studie Berlier et al. (2013a). Zkoumalo se možné použití takto upraveného rutinu v lokálních přípravcích, neboť volný rutin vykazuje špatnou fyzikálně-chemickou stabilitu. MCM-41 byl funkcionalizován aminopropylenem a pro kontrolu sloužil MCM-41 nefunkcionalizovaný. Aminopropylové skupiny hrály důležitou roli v interakci s kvercetinovým aglykonem. Konečné výsledky dokazovaly lepší fyzikálně-chemické vlastnosti, vyšší fotostabilitu a zvýšenou kožní akumulaci (studie na vepřové kůži *ex vivo*). Vzhledem k pozitivním výsledkům výzkumu je možné budoucí použití takto upraveného nosiče pro kožní lokální aplikaci ve farmaceutickém či kosmetickém průmyslu.

I další studie se zabývaly využitím antioxidačních látek s možností ochrany kůže před UV zářením neutralizací volných radikálů. Kvercetin je flavonoid vyskytující se v zelenině, ovoci, semenech, čaji, kávě nebo také v kapradinách a v přírodních barvivech. Jedná se o antioxidant s experimentálně prokázanými antikarcinogenními účinky (Baghel et al., 2012). Oktyl-funkcionalizovaný MCM-41 byl zkoumán jako nosič pro imobilizaci kvercetinů. Zlepšila se jeho stabilita v přítomnosti UV záření a zachovala se tak účinnost působení proti poškození kůže. Stabilita byla pozorována při pH 5, která odpovídá hodnotám pH pokožky (Berlier et al., 2013b).

### 3.2 Antioxidanty

Antioxidanty obecně jsou látky schopné chránit organismus před oxidačním stresem a potraviny před autooxidací. Jedná se tedy o inhibitory oxidace, čehož je docíleno reakcí s volnými radikály a tvorbou méně reaktivních komplexů, viz Obrázek 2. Lze je rozdělit na enzymatické antioxidanty, neenzymatické antioxidanty a reparativní enzymy. Další možností jejich dělení je na přírodní (přirozeně se vyskytující) a syntetické. Z přirozeně se

vyskytujících antioxidantů můžeme jmenovat kyselinu askorbovou, tokoferoly, karotenoidy a mnoho dalších. Za skupinu antioxidantů syntetických je to butyl hydroxyanisol (BHA), butylhydroxytoluen (BHT) nebo trolox, ve vodě rozpustný analog tokoferolu (Baser and Buchbauer, 2010). Přírodní antioxidanty jsou v současné době v potravinářském průmyslu žádanější, neboť panuje obecné odmítání syntetických látek v potravinách z obavy jejich možné škodlivosti vůči lidskému organismu.



Obrázek 2 Reakce antioxidantu (AH) s volnými radikály a s antioxidantovým radikálem a tvorba komplexů (Flora et al., 2012)

Konkrétní sloučeniny, kterými se zabývá předložená práce, jsou skořicový aldehyd, karvakrol, thymol, tymochinon, eugenol, allylisothiokyanát a allyldisulfid.

### 3.2.1 Cinnamaldehyd

Cinnamaldehyd, taktéž označovaný jako skořicový aldehyd je nenasycený aromatický aldehyd vyskytující se v rostlinách rodu *Cinnamomum*. Nevyskytuje se ve stejném množství v celé rostlině. Hlavní složku silice z listů tvoří eugenol, v kůře kořenů se jedná o kafr a linalool a v kůře kmene je to právě skořicový aldehyd kdo tvoří hlavní složku silice, a to až 70 % (Baser and Buchbauer, 2010). Jedná se o nažloutlou kapalinu s výraznou příjemnou skořicovou vůní. Pro svoji jedinečnou chuť a vůni je běžně přidáván do různých potravinářských produktů jako například do skořicových pudinků, chleba, sušenek, jablečných omáček či ovocných šťáv (Gowder and Devaraj, 2006). Skořicový aldehyd je poměrně bezpečná látka schválená pro použití v potravinách s dalšími možnými benefity, mezi které lze uvést její antioxidační a antimikrobiální účinky (Naveena et al., 2013).

#### 3.2.1.1 Antioxidační aktivita cinnamaldehydu

Antioxidační a antimikrobiální aktivitou sloučenin silice skořice se zabývali El-Baroty et al. (2010). Zdrojem skořicové silice byla kůra z rostliny *Cinnamomum zeylanicum*, která

byla charakterizována pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem (GC/MS). Celkový zisk silice z kůry rostliny byl 0,85 g ze 100 g materiálu a hlavní složkou byl trans-cinnamaldehyd, který tvořil 45,62 % silice. Antioxidační aktivita silice byla testována pomocí tří metod: rapid TLC-screening test, BCB ( $\beta$ -karoten bleaching test) a DPPH. V obou prvních testech vykazovala vysokou antioxidační aktivitu. Skořicová silice byla porovnávána se silicí zázvorovou, s BHA, BHT a  $\alpha$ -tokoferolem. Její antioxidační aktivita byla vyšší než u silice zázvorové a srovnatelná s referenčními standardy BHA, BHT a  $\alpha$ -tokoferolem.  $IC_{50}$  (účinná-inhibiční koncentrace, která je potřebná pro redukci 50 % radikálu DPPH) v testu DPPH činila 13,1  $\mu$ g/ml, což bylo srovnatelné se standardy. O něco horších výsledků dosáhla silice zázvoru s  $IC_{50}$  = 65,5  $\mu$ g/ml. Jakožto nejaktivnější antimikrobiální složky skořicové silice byly identifikovány cinnamaldehyd a eugenol.

Srovnáním chemických, antioxidačních a antimikrobiálních vlastností silice a oleoresinu (olejoprskyřice) získaných z kůry a listů skořice se věnovali Singh et al. (2007). Pro výzkum byla použita opět rostlina *Cinnamomum zeylanicum* (skořicovník cejlónský). Výtěžnost silice z listů byla 3,1 % a z kůry 2,5 %. Vyšší byla výtěžnost oleoresinů, která činila z listů 6,9 % a z kůry 9,7 %. Detekce a procentuální zastoupení látek bylo stanoveno pomocí GC. Skořicový aldehyd byl zastoupen ve vzorcích získaných ze skořicové kůry. V silici tvořil 97,7 % a v olejoprskyřici 50 %. Oleoresiny ukázaly lepší účinky vůči primárním a sekundárním oxidačním produktům v hořčičném oleji. Oleoresiny z kůry skořice vykazovaly také nejlepší výsledky napříč všemi testovanými koncentracemi v testu DPPH.

Naveena et al. (2013) zkoumali účinky trans-cinnamaldehydu na slepičí maso. Konkrétně se zaměřili na antioxidační účinky a také na ovlivnění stability barvy daného produktu. Maso bylo zkoumáno jak v syrové tak vařené formě a přítomnost skořicového aldehydu neměla nežádoucí vliv na změnu pH, výtěžnost po vaření ani na barevné či chuťové změny. Naopak byl pozorován vliv na snížení peroxidového a thiobarbiturátového čísla v porovnání s kontrolním vzorkem. Po důkladném prozkoumání vlivu cinnamaldehydu na různé druhy mas, by mohl být využit jako vhodné aditivum s antimikrobiálními a antioxidačními účinky v masném průmyslu namísto užití aditiv syntetických.

V současné době se zkoumá i využití cinnamaldehydu v léčbě či prevenci metabolického syndromu. Studie Farrokhfall et al. (2014) byla prováděna na samcích krys, které byly v průběhu 16 týdnů krmeny vysokotučným nebo klasickým krmivem („chow diet“). Cinnamaldehyd byl současně podáván *per os* a u kontrolních skupin se nepodával. Podávání skořicového aldehydu snížilo zatížení slinivky břišní tím, že inhiboval oxidaci

a zánět působící na Langerhansovy ostrůvky a nedocházelo tak ke zvýšené sekreci inzulínu a zvětšení beta buněk.

### 3.2.2 Karvakrol

Karvakrol je monoterpenový fenol produkovaný rostlinami rodu *Thymus*, *Origanum* a řadou dalších aromatických rostlin. Má mnoho biologických a farmakologických vlastností, kterým se věnuje mnoho aktuálních studií z nich většina je provedena na systémech *in vitro* a je třeba ještě dodat výsledky *in vivo* studií. Závěry však ukazují široké spektrum možných vlastností karvakrolu, do kterých lze zahrnout účinky antioxidační, antibakteriální, antifugální, antikarcinogenní, protizánětlivé, hepatoprotektivní, spasmolytické či vasorelaxační. V nízkých koncentracích se používá jako potravinové aditivum sloužící jako konzervant nebo složka upravující chuť produktu. Mezi produkty, ve kterých karvakrol slouží pro úpravu chuti, patří alkoholické nápoje, pečivo, žvýkačky, mražené mléčné výrobky či nealkoholické nápoje. Jako konzervant slouží u potravin jako je rýže, hroznové víno, hroznová rajčata, jablečný džus, mléko, kiwi a další (Suntres et al., 2015).

Množství určité látky v silici je závislé na mnoha faktorech. Ve studii Raina and Negi (2014) je vidět velký rozptyl obsahu karvakrolu v *Origanum vulgare L. ssp. vulgare* (dobromysl obecná). Silice z rostlin ze sedmi různých lokací byly analyzovány pomocí GS a jejich složení bylo velmi rozdílné. Obsah karvakrolu se pohyboval v rozmezí od 1,5 do 63 %.

#### 3.2.2.1 Antioxidační aktivita karvakrolu

Chemické složení a antioxidační aktivitu silice z rostliny *Thymus caramanicus* zkoumali Safaei-Ghomi et al. (2009). Zastoupení látek bylo zkoumáno pomocí GC a antioxidační aktivita testy DPPH, BCB a bleaching test linolové kyseliny. Výtěžnost silice pomocí hydrodestilace z rostliny byla 0,99 % a pomocí extrakce methanolem se získalo 11,5 % sušeného extraktu. Hlavní složku silice tvořil karvakrol s 85,94 %. Nejvyšší aktivitu v testu DPPH vykazovala polární subfrakce methanolového extraktu jehož  $IC_{50}$  byla 43,17  $\mu\text{g/ml}$ .  $IC_{50}$  silice a standardu karvakrolu vykazovaly hodnoty horší (263,09 a 448,05  $\mu\text{g/ml}$ ). V BCB testu vykazovala dobré antioxidační schopnosti naopak nepolární subfrakce, jejíž hodnoty byly nejbližší k hodnotám standardu BHT.

Antioxidační a antinociceptivní účinky karvakrolu vyšetřovali Guimarães et al. (2010). V metodě TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parametr) vykazoval silné antioxidační

účinky, které byly srovnatelné s účinky troloxu i  $\alpha$ -tokoferolu. Byla taktéž prokázána významná aktivita s oxidem dusnatým, jenž může reagovat s reaktivními formami kyslíku, což vede k tvorbě peroxidusitanů se silnými oxidačními schopnostmi. Karvakrol, jako antioxidant, může snižovat oxidační stres a regulovat či léčit bolest související s prooxidačními stavy.

Další studií zabývající se antioxidačními účinky karvakrolu je práce Quiroga et al. (2014). Byl zkoumán vliv karvakrolu na chemickou a sensorickou stabilitu pražených slunečnicových semínek. Pro přenos silice na semínka byl využit rafinovaný slunečnicový olej. Studie srovnávala účinky karvakrolu, thymolu, syntetického BHT a kontrolního samostatného vzorku. Antioxidační aktivitu sledovali pomocí nárůstu peroxidového a p-anisidinového čísla během skladování. Nejnižší hodnoty vykazoval syntetický BHT a nejvyšší kontrolní vzorek bez antioxidantu. Srovnatelné střední hodnoty vykazoval jak karvakrol, tak thymol. Přítomnost monoterpenů zlepšila stabilitu pražených slunečnicových semínek, bránila oxidaci lipidů a vývoji žluklého zápachu a chutě.

### 3.2.3 Thymol

Čistý thymol je bílá krystalická pevná látka (Esmaeili and Khodadadi, 2012). Jedná se o monoterpenový fenol a je izomerem karvakrolu, který vykazuje podobné biologické účinky jako karvakrol, především antimikrobiální a antioxidační (Ramos et al., 2012). Vyskytuje se hlavně v silici tymiánu a oregána (Ramos et al., 2014b), kdy se jeho množství může pohybovat v poměrně velkém rozsahu. Rozptyl obsahu thymolu v *Origanum vulgare L. ssp. vulgare* z různých lokací byl kupříkladu od 13,7 do 85,9 % (Raina and Negi, 2014). Společně s karvakrolem je považován za bezpečný a je uveden v seznamu povolených látek určených pro aromatizaci vydaným Evropskou komisí (Ramos et al., 2014a).

#### 3.2.3.1 Antioxidační aktivita thymolu

Antioxidační aktivitou (AA) thymolu a karvakrolu se zabývá studie Yanishlieva et al. (1999). Zkoumá autooxidaci purifikovaného sádla a slunečnicového oleje s různou koncentrací antioxidantů. Bylo hodnoceno, zda je významný rozdíl mezi antioxidační aktivitou izomerických sloučenin. Hodnocení AA probíhalo na základě měření peroxidového čísla během skladování vzorků a stanovením protekčního faktoru (stabilizační faktor). AA obou antioxidantů v případě vzorků sádla nebyla statisticky rozdílná. Rozdíl byl však



u vzorků slunečnicového oleje, kde thymol v koncentracích 0,02; 0,05 a 0,1 % vykazoval vyšší AA než karvakrol.

Chemické složení a biologická aktivita silic z rostlin *Satureja montana* L. (saturejka horská) a *Satureja subspicata* Bartl. ex Vis. (syn. *Satureja montana* var. *illyrica*) byly hodnoceny ve studii Čavar et al. (2008). Výtěžnost silic z rostlin se pohybovala od 0,5 do 1,7 % a jejich složení bylo stanoveno pomocí GC. V *S. montana* bylo 31,7 % thymolu a v *S. subspicata* 28,6 %. Všechny vzorky silic vykazovaly za použití metody DPPH antioxidační aktivitu srovnatelnou s pozitivním kontrolním vzorkem thymolu, jehož IC<sub>50</sub> byla stanovena na 13,3 mg/ml.

Antioxidační aktivitu roztoku thymolu v ethanolu zkoumali Esmaeili and Khodadadi (2012). Pro vyhodnocení AA použili DPPH test, který ukázal výborné antioxidační vlastnosti testovaného roztoku. Hodnota IC<sub>50</sub> roztoku byla 0,538 µg/ml.

Uvolňováním a AA thymolu a karvakrolu z polypropylenových obalových filmů se zabývali Ramos et al. (2014a). Migrace antioxidačních látek byla zkoumána na dvou typech simulantů potravin, vodných a tukových. Analýza migrovaných antioxidantů byla prováděna na GC. Vyšší migraci vykazoval thymol, jehož hodnoty antioxidační kapacity stanovené metodou DPPH dosahovaly taktéž vyšších hodnot. Inhibice radikálu v isooktanu byla 42,2 %. Studie dokazuje vysoký potenciál využití jak thymolu tak karvakrolu v aktivních obalech sloužících pro prodloužení trvanlivosti potravin. Ramos et al. (2014b) zkoumali i thymol v obalech tvořených kyselinou polymlečnou. V procesu výroby obalu byl poměrně stabilní a následně vykazoval významnou antioxidační aktivitu.

#### 3.2.4 Tymochinon

Tymochinon je látka vyskytující se v rostlině *Nigella sativa* (černucha setá) a je její hlavní biologicky aktivní složkou. V řadě studií vykazuje antioxidační, protizánětlivé, antidiabetické, imunomodulační či antikancerogenní účinky (Johnson-Ajinwo and Li, 2014). Další vlastnosti tymochinonu, které se zkoumají, jsou schopnosti působit antimikrobiálně, gastroprotektivně, hepatoprotektivně a kardioprotektivně prostřednictvím úpravy hladiny cholesterolu, triglyceridů, LDL a HDL (Ramadan, 2007).

Stanovením množství tymochinonu (TQ) v rostlině *Nigella sativa* se zabývala studie Belete and Dagne (2014). Výtěžnost oleje (silice) ze semen lisováním se uvádí 36 - 38 % a výtěžnost parou destilované silice z oleje se pohybuje v rozmezí 0,4 - 2,5 %. Studie porovnává množství TQ získané z komerčně dostupného oleje a semen. Stanovení zastoupení

TQ se provedlo pomocí HPTLC (high performance thin-layer chromatography). Jeho obsah v semenech byl 1 % a v čerstvě lisovaném oleji 1,3 %. Vzhledem k velkým rozdílům v ceně kmínového oleje a semen, a podobnému obsahu TQ, se nabízí jako zdroj TQ komodita s nižší cenou, tedy kmínová semena.

#### 3.2.4.1 Antioxidační aktivita tymochinonu

Složení a antioxidační potenciál silice a acetonového extraktu ze semen kmínu černého zkoumali Singh et al. (2005). Složení vzorků bylo stanoveno pomocí GC. Tymochinon tvořil v silici 11,27 % a po p-cymenu, který představoval 36,2 % silice, byl druhou majoritní složkou. Hlavní složkou extraktu byla kyselina linolová a TQ tvořil 11,8 %. Antioxidační aktivita byla zkoumána na základě změny peroxidového čísla, kdy vykazoval jak extrakt, tak silice srovnatelně silné hodnoty s kontrolními vzorky BHA a BHT. Silné antioxidační účinky zkoumané vzorky vykazovaly i v metodě DPPH.

Stanovením obsahu tymochinonu a AA silice z *Nigella sativa* se zabývali i Lutterodt et al. (2010). Pomocí GC stanovili obsah TQ v šesti různých šaržích zastudena lisované kmínové silice. Množství TQ se pohybovalo v rozmezí od 3,48 do 8,73 mg/g. Jako možnost příčiny nízkého obsahu TQ byl uváděn způsob skladování pod dusíkem a fakt, že se jednalo o olej za studena lisovaný. Extrakt i silice vykazovaly v metodě DPPH dobré antioxidační schopnosti.

AA silice *Nigella sativa* zkoumá i studie Burits and Bucar (2000). Výtěžnost silice Soxhletovou extrakcí a hydrodestilací byla 0,41 - 0,44 % a obsah TQ se pohyboval od 28 - 57 % a byl majoritní složkou všech testovaných vzorků silic. DPPH metodou stanovené hodnoty  $IC_{50}$  byly u silice 460,0  $\mu\text{g/ml}$  a u tymochinonu 211,0  $\mu\text{g/ml}$ .

Další studií řešící AA a množství TQ v silici je Solati et al. (2014). Studie porovnává dvě metody extrakce silice ze semen černého kmínu, Soxhletovu extrakci a superkritickou fluidní extrakci oxidem uhličitým (SC-CO<sub>2</sub>). Zisk TQ Soxhletovou extrakcí byl 1,06 mg/g silice a  $IC_{50}$  silice činila 8,26 mg/ml. Oproti tomu SC-CO<sub>2</sub> extrakcí se získalo 4,07 mg/g silice a tudíž byla i lepší hodnota  $IC_{50}$  (2,59 mg/ml).

#### 3.2.5 Eugenol

Eugenol je methoxyfenol s krátkým uhlovodíkovým řetězcem, který je složkou silice rostliny *Eugenia caryophyllata* (hřebíčkovce kořený). S 80 - 95 % tvoří hlavní složku silice (Gülcin, 2011). Eugenol je bezbarvá až světle nažloutlá tekutina, která se mimo hřebíček

nachází i v řadě dalších koření, ve skořici, bobkovém listu, muškátovém oříšku či v bazalce (Chatterjee and Bhattacharjee, 2013). Pro svoji charakteristickou vůni a chuť se používá v kosmetickém a potravinářském průmyslu. Své využití má také v zubním lékařství, kde má uplatnění jako sedativum a společně s oxidem zinečnatým se používá jako cement (Atsumi et al. 2005). Má antifugální, antibakteriální, antioxidační a protizánětlivé účinky (Chatterjee and Bhattacharjee, 2013).

Stanovením chemického složení dvou různých komerčně prodávaných značek hřebíčku (*Syzygium caryophyllatum*), Guzal a Shahi, se zabývali Hossain et al. (2012). Obsah silice ve vzorcích byl 1,2 a 0,79 %. Zastoupení jednotlivých složek se stanovovalo pomocí GC. Eugenol byl hlavní složkou obou zkoumaných značek, ve vzorku značky Guzal zastupoval 51,52 % silice a v Shahi 46,53 %.

### 3.2.5.1 Antioxidační aktivita eugenolu

Silice hřebíčku patří mezi antioxidačně nejaktivnější sloučeniny a je i jednou z nejlépe prozkoumaných silic používaných pro potraviny či jako potravinový doplněk. Hřebíček a jeho hlavní složka eugenol vykazují silnou AA, která je srovnatelná s BHA. Časté je jeho použití hřebíčku v tradiční medicíně (Mittal et al., 2014).

Bioaktivita hřebíčkové silice byla hodnocena ve studii Khunkitti et al. (2012). Plynovou chromatografií byl stanoven obsah eugenolu na 99,16 % silice. AA silice byla hodnocena metodou DPPH.  $IC_{50}$  hřebíčkové silice byla 132,2  $\mu\text{g/ml}$  a samotného eugenolu 145,2  $\mu\text{g/ml}$ . Studie zkoumala silici kvůli možnosti využití v přípravcích pečujících o pleť a vzhledem k cytotoxicitě eugenolu doporučuje jeho velmi nízké koncentrace a další klinické studie.

Antioxidační aktivita eugenolu byla zkoumána ve studii Gülcin (2011). Byl hodnocen vliv eugenolu na peroxidaci kyseliny linolové a jeho schopnosti reagovat s radikály DPPH. V emulzním systému kyseliny linolové vykazoval vysokou antioxidační aktivitu. 15  $\mu\text{g/ml}$  inhibovalo z 96,7 % peroxidaci kyseliny linolové. Tyto výsledky byly srovnatelné se syntetickými BHA a BHT. Hodnota  $IC_{50}$  eugenolu byla nejnižší z porovnávaných sloučenin, 16,06  $\mu\text{g/ml}$ . Pro srovnání  $IC_{50}$  BHA a BHT byla 25,51 a 34,01  $\mu\text{g/ml}$ .

Antioxidační aktivita eugenolu *in vivo* a *in vitro* byla zkoumána ve výzkumu Nagababu et al. (2010). *In vitro* AA hodnotila peroxidaci lipidů na mitochondriích. Inhibiční aktivita eugenolu byla asi pětikrát vyšší než u  $\alpha$ -tokoferolu a desetkrát nižší než u BHA. *In vivo* AA byla hodnocena stanovením určitých biochemických parametrů, peroxidačních

produktů a histopatologickým vyšetření u testovaných krys. Eugenol výrazně inhiboval zvyšování sérové aspartátaminotransferázy, která je laboratorním ukazatelem poškození jaterních buněk. Eugenol působil jako sekundární antioxidant, spíše reagoval s již vzniklými volnými radikály, než aby zabraňoval jejich vzniku.

### 3.2.6 Allylisothiokyanát

Allylisothiokyanát (AITC) je alifatický isothiokyanát odvozený od glukosinolátu sinigrinu. Jeho bohatým zdrojem je brukvovitá zelenina (Sávio, 2015). Jedná se o bezbarvou nebo světle žlutou kapalinu se štiplavým pachem. Je hlavní složkou hořčičného oleje a taktéž se nachází v křenu, v semenech černé brukve nebo ve vařeném zelí. Používá se v potravinářství jako přídatná látka upravující chuť a vůni. Má i široké medicínské využití jako rubefacient, adjuvans (prostředek podporující či doplňující zesilující účinek léku) nebo jako fumigant, dále se přidává do mastí či hořčičných náplastí (Allyl isothiocyanate, 1999). AITC je obecně považován za bezpečnou látku s příznivými účinky na lidský organismus. Působí antimikrobiálně a antioxidantně (Wang et al., 2010).

Peng et al. (2014) zkoumali chemické složení rostliny *Sinapis alba* (hořčice setá). Výtěžnost silice ze semen hořčice seté byla 1,7 %. Zastoupení jednotlivých biologicky aktivních látek se stanovilo pomocí GC. AITC byl hlavní složkou silice a tvořil 71,06 %.

#### 3.2.6.1 Antioxidační aktivita allylisothiokyanátu

Schopnost AITC zachytávat volné radikály, omezit kažení ovoce a vliv na jiné antioxidanty zkoumali Wang et al. (2010). Tyto účinky byly testovány na borůvkách, které jsou samy o sobě bohatým zdrojem přírodních antioxidantů. Výsledky studie ukázaly pozitivní vliv AICT na skladovatelnost oddálením jejich kažení. Avšak co se týče samotné antioxidační aktivity, tak vliv AITC nebyl příliš pozitivní. Ve vzorcích, na kterých byl aplikován, byly detekovány nižší hladiny celkových fenolů a anthokyanů než v kontrolním vzorku bez AITC. Proto měly vzorky s AICT horší i výsledky v testu DPPH. Výsledky této studie naznačují, že AITC nemusí podporovat antioxidační vlastnosti. Paradoxně působil prooxidačně a vysoké množství reaktivních forem kyslíku inhibovalo růst a proliferaci mikrobiálních buněk. Za zvážení tak stojí použití AITC jako fungicidu na ošetření některých na antioxidanty bohatých plodin. Další studie by měly ukázat, zda nemůže mít tento způsob ošetření vliv na senzoryckou kvalitu plodů.

### 3.2.7 Allyldisulfid

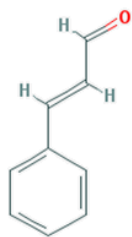
Allyldisulfid (diallyl disulfid) je bioaktivní látka, organická sirná sloučenina, nacházející se v česneku. Jedná se o kapalinu s ostrou vůní a chutí česneku. Má antimutagenní, antikarcinogenní, spermatocidní či antihypertenzní účinky (National Center for Biotechnology Information, 2014). Jsou zkoumány jeho antioxidační účinky (Chung, 2006). Za přítomnosti peroxidu vodíku nebo kyseliny peroctové oxiduje na allicin. Allicin zase může hydrolyzovat na diallyl disulfid nebo diallyl trisulfid (Yi and Su, 2013). Allyldisulfid vzniká při rozkladu allicinu, který se uvolňuje při mechanickém zpracování česneku a dalších rostlin z čeledi *Alliaceae*. Kromě svých zdravotně prospěšných vlastností je také alergenem (Yun et al., 2014).

Lee et al. (2003) zkoumali zastoupení aromatických složek v korejském česneku. Stanovení složek probíhalo na GC. Hlavní složky tvořily allyldisulfid (57,88 %), allyl sulfid (23,59 %) a diallyl trisulfid (11,40 %). Allicin, vzhledem ke své nestabilitě, nebyl detekován vůbec.

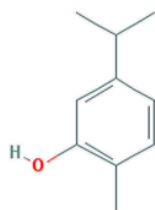
#### 3.2.7.1 Antioxidační aktivita allyldisulfidu

Antioxidační schopnosti česneku hodnotili Lawrence and Lawrence (2011). Zkoumali AA silice izolované z čerstvých odděnků česneku. Výtěžnost silice byla 0,2 %. AA hodnotili metodou DPPH. Výsledky ukázaly, že s rostoucí koncentrací rostla i inhibice volných radikálů. Hodnota  $IC_{50}$  silice česneku byla stanovena na 0,5 mg/ml. Dobrou AA vykazovala silice i v testu BCB.

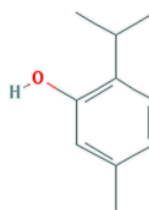
Antioxidačními vlastnostmi sloučenin česneku se věnuje práce Chung (2006). Studie zkoumá způsoby AA allyldisulfidu, allicinu, alliinu a allylcysteinu. Se superoxydy reagoval aliin, zatímco allyl cystein a allyldisulfid se na této reakci nepodílely vůbec. Allicin pro změnu potlačoval vznik superoxidů v xantinoxidázovém systému. Sloučeniny alliin, allylcystein a allyldisulfid reagovaly s hydroxylovými radikály a působily tedy jako sekundární antioxidanty. Allyldisulfid se jevil jako terminátor peroxidace lipidů. Každá z látek tedy vykazovala odlišné možnosti v působení proti volným radikálům.



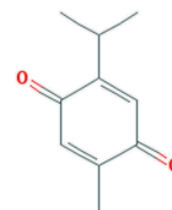
cinnamaldehyd



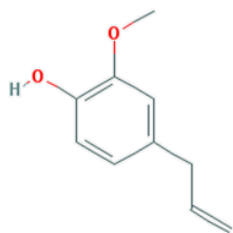
karvakrol



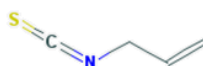
thymol



tymochinon



eugenol



allyl isothiokyanát



allyl disulfid

Obrázek 3 Chemická struktura vybraných antioxidantů

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiály

#### 4.1.1 Sádlo

Vepřové škvařené sádlo bez přísad Lando. Prodávající: Kaufland Česká republika, v.o.s., Pod Višňovkou 25, CZ-140 00 Praha 4. Země původu: Rakousko. L4444/26630

#### 4.1.2 MCM-41

MCM-41 pro experimentální část připravila a poskytla Andrea Bernardos, Ph.D. Materiál byl taktéž použit ve výzkumu Bernardos et al. (2014), kde je konkrétně popsán postup syntézy MCM-41 a navázání antioxidačních látek. Poměr antioxidantu a MCM-41 byl po navázání 1:1.

#### 4.1.3 Antioxidanty

Cinnamaldehyd (99%), Sigma-Aldrich, UK

Karvakrol (98%), Sigma-Aldrich, UK

Thymol (99%), Sigma-Aldrich, UK

Tymochinon (99%), Sigma-Aldrich, UK

Eugenol (99%), Sigma-Aldrich, UK

Allylisothiokyanát (98%), Sigma-Aldrich, UK

Allyldisulfid (80%), Sigma-Aldrich, UK

BHA, Sigma-Aldrich, USA

#### 4.1.4 Činidla potřebná pro stanovení peroxidového čísla

Chloroform, Penta, Česká republika

Kyselina octová, Penta, Česká republika

Jodid draselný, Lachema, Česká republika

Thiosíran sodný, Lachner, Česká republika

Škrob rozpustný, Lachema, Česká republika

#### 4.1.5 Přístroje

Analytické váhy AND, max.= 180 g, d= 0,1 mg, Japonsko

Laboratorní termostat POL-EKO, Polsko

## 4.2 Metody

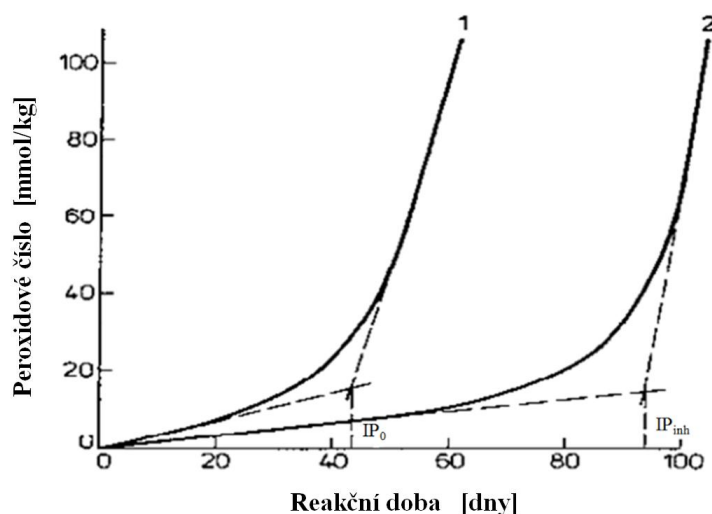
### 4.2.1 Stanovení antioxidační aktivity dle Schaala

Princip Schaalova testu je založen na sledování průběhu oxidace tuků měřením přírůstkem hmotnosti nebo na základě změny peroxidového čísla (PČ). Tuk je skladován za přístupu kyslíku ve tmě při teplotě 60 °C. Nárůst hmotnosti je dán absorbovaným kyslíkem během skladování. Nárůst množství peroxidicky vázaného kyslíku, v podobě primárních produktů oxidace, v tuku se poté promítá v hodnotách naměřeného peroxidového čísla.

Pro vyhodnocení testu na základě hmotnostní změny je nutné stanovení relativní změny hmotnosti (RZH), která se počítá dle vzorce  $RZH = \frac{m_x - m_p}{m_p}$ , kde  $m_x$  je hmotnost sádla s antioxidantem v jednotlivých dnech měření a  $m_p$  je hmotnost sádla s antioxidantem v první den měření.

PČ se stanovilo dle vzorce  $PC\check{r} = \frac{(V_1 - V_0) \cdot c}{m}$ , kde  $V_1$  je objem roztoku thiosíranu sodného použitého při titraci vzorku [ml],  $V_0$  představuje objem roztoku thiosíranu sodného použitého při titraci slepého pokusu [ml],  $c$  je koncentrace použitého roztoku thiosíranu sodného [mmol/l] a  $m$  je navážka vzorku [g].

Stabilita tuku je hodnocena na základě indukční periody (IP). Její hodnota se stanoví na základě závislosti relativních změn hmotnosti či PČ na čase viz Obrázek 4. Měřítkem antioxidační aktivity je protekční faktor (PF), který se vypočítá dle vzorce  $PF = \frac{IP_{inh}}{IP_0}$ , kde  $IP_{inh}$  je indukční perioda vzorku s inhibítorem (antioxidantem) a  $IP_0$  je indukční perioda vzorku bez inhibítora.



Obrázek 4 Grafické stanovení indukční periody ze závislosti změny peroxidového čísla na čase



#### 4.2.1.1 Postup Schaalova testu

Do předem zvážených 100 ml kádinek o průměru 50 mm bylo naváženo různé množství antioxidantu či antioxidantu vázaného na MCM-41 a 25 g sádla. Koncentrace antioxidantu byla 0,01; 0,02; 0,04; 0,06 či 0,08 % (m/m). Jako kontrolní vzorek bylo do kádinek naváženo i sádlo samotné. Všechny vzorky byly naváženy ve třech opakováních a byly skladovány v termostatu při teplotě 60 °C. Poté byly váženy nebo bylo stanovováno jejich PČ v různých intervalech, zpravidla se jednalo o tři nebo v pozdější fázi pokusu dvě měření v týdnu.

Test byl proveden 6x s různými změnami. Přírodně identické antioxidanty byly vždy porovnávány ve formě volné a ve formě vázané na křemičitý materiál MCM-41. Zároveň byl vždy hodnocen kontrolní vzorek samostatného sádla.

##### Schaalův test č. 1

V úvodním testu byly testovány všechny vybrané antioxidantní látky, tedy cinnamaldehyd, karvakrol, thymol, tymochinon, eugenol, allylthiokyanát a allyldisulfid. Byly testovány v koncentraci 0,01 a 0,02 %. Schaalův test byl vyhodnocen na základě relativní změny hmotnosti.

##### Schaalův test č. 2

V druhém testu byla hodnocena AA všech testovaných antioxidantních látek při koncentraci 0,04 %. Taktéž se testovala možná AA samotného MCM-41, jehož koncentrace byla 0,01; 0,02 a 0,04 %. Vyhodnocení bylo na základě relativní změny hmotnosti.

##### Schaalův test č. 3

V třetím testu se hodnotila AA přírodních antioxidantů o koncentraci 0,08 %. Vyhodnocení testu se provádělo na základě relativní změny hmotnosti.

##### Schaalův test č. 4

Ve čtvrtém testu byl zkoumán z přírodně identických antioxidantů jen eugenol, byla testována jeho AA při koncentraci 0,02 a 0,08 %. Koncentrace 0,02 % byla hodnocena i u syntetického antioxidantu BHA a koncentrace 0,08 % byla testována také u samotného MCM-41. Tento test byl vyhodnocen na základě relativní změny hmotnosti i změny PČ. Stanovení PČ probíhalo dle ČSN EN ISO 3960 následujícím postupem:

Do Erlenmayerovy baňky byl navážen 1 g vzorku. Vzorek byl rozpuštěn ve 30 ml chloroformu a kyseliny octové (v poměru 1:1). Po rozpuštění vzorku byl přidán 1 ml

nasyčeného jodidu draselného. Baňka byla uzavřena a 1 minutu byl její obsah promícháván třepáním. Poté se baňka nechala stát ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Následně bylo přidáno 50 ml destilované vody. Po promíchání roztoku bylo přidáno několik kapek škrobového mazu jako indikátoru. Nakonec byl roztok titrován odměrným roztokem thiosíranu sodného o koncentraci 0,01 mmol/l do odbarvení. Stejným postupem se provedl i slepý pokus. Výsledné PČ se stanovilo podle vzorce uvedeného v kapitole 4.2.1.

Z důvodu nerovnoměrného vzestupu PČ nebylo možné stanovení IP dle Obrázku č. 4 (viz výše). IP byla tedy stanovena u všech vzorků při nárůstu PČ na hodnotu 0,01 mmol aktivního kyslíku na gram tuku.

#### Schaalův test č. 5

V pátém testu byl hodnocen pouze eugenol o koncentraci 0,02; 0,04; 0,06 a 0,08 % hmotnosti sádla. Byly nastaveny alternativní podmínky testu. Do předem zvážených Petriho misek o průměru 40 mm bylo navaženo dané množství eugenolu a 2,5 g sádla. Kontrolní vzorek sádla bez antioxidantu byl taktéž v množství 2,5 g. Takto připravené vzorky byly skladovány v termostatu za přístupu vzuchu při teplotě 40 °C. Konečné vyhodnocení AA probíhalo na základě relativní změny hmotnosti.

#### Schaalův test č. 6

V posledním testu byla hodnocena AA vybraných antioxidantů při koncentraci 0,02; 0,04 a 0,08 % opět za standardních podmínek, tzn. 25 g sádla skladovaného při teplotě 60 °C. Testován byl eugenol, karvakrol a tymochinon. Byla hodnocena i AA syntetického BHA o koncentraci 0,02 %.

## 5 Výsledky

Výsledky jednotlivých testů jsou uvedeny v tabulkové podobě. V případě, kdy byl rozdíl hodnot IP antioxidantu vázaného a nevázaného na křemičitý materiál nižší než 1, byla hodnocena stabilita tuku a tedy i AA jako srovnatelná.

### 5.1 Schaalův test č. 1

Tabulka 4 uvádí souhrn indukčních period a protekčních faktorů všech zkoumaných antioxidantů v koncentraci 0,01 %. Ve čtyřech případech byla AA antioxidantů vázaných na MCM-41 vyšší než v případě jejich volné formy. Konkrétně se jednalo o vzorky tymochinonu, eugenolu, allylisothiokyanátu a allyldisulfidu. Srovnatelnou AA vykazovaly vzorky thymolu a karvakrolu. Protekční faktor nižší než 1 měl cinnamaldehyd v obou formách, allylisothiokyanát a allyldisulfid, tudíž v těchto případech nebyla zaznamenána žádná AA.

Tabulka 4 IP a PF vzorků s antioxidantem (0,01 %) vázaným a nevázaným na MCM-41

Vzorek	IP [dny]				PF
	1.	2.	3.	průměr	
Kontrola	13,5	12,8	12,5	12,9	1,00
CN	12,5	12,0	12,0	12,2	0,94
CNSi	13,5	12,0	12,0	12,5	0,97
CAR	15,5	14,5	13,5	14,5	1,12
CARSi	15,0	14,0	14,5	14,5	1,12
THL	16,0	14,5	13,5	14,7	1,14
THLSi	14,5	14,0	13,5	14,0	1,08
TQ	19,0	17,5	16,5	17,7	1,37
TQSi	20,0	20,0	20,0	20,0	1,55
EU	15,0	14,0	15,0	14,7	1,14
EUSi	18,0	19,5	19,0	18,8	1,46
AITC	10,0	9,0	10,0	9,7	0,75
AITCSi	16,5	17,0	17,0	16,8	1,30
ADS	10,0	12,0	13,0	11,7	0,90
ADSSi	17,5	17,5	17,0	17,3	1,34

CN- cinnamaldehyd; CNSi- cinnamaldehyd vázaný na MCM-41; CAR- karvakrol; CARSi- karvakrol vázaný na MCM-41; THL- thymol; THLSi- thymol vázaný na MCM-41; TQ- tymochinon; TQSi- tymochinon vázaný na MCM-41; EU- eugenol; EUSi- eugenol vázaný na MCM-41; AITC- allylisothiokyanát; AITCSi- allylisothiokyanát vázaný na MCM-41; ADS- allyldisulfid; ADSSi- allyldisulfid vázaný na MCM-41

Tabulka 5 uvádí výsledné IP a PF při aplikaci antioxidantu o koncentraci 0,02 %. Při této koncentraci byla AA ve všech případech vyšší u látek samostatných, tedy nevázaných na křemičitý materiál.

**Tabulka 5 IP a PF vzorků s antioxidantem (0,02 %) vázaným a nevázaným na MCM-41**

Vzorek	IP [dny]				PF
	1.	2.	3.	průměr	
<b>Kontrola</b>	13,5	12,8	12,5	12,9	1,00
<b>CN</b>	22,5	23,5	22,0	22,7	1,75
<b>CNSi</b>	11,5	12,0	12,5	12,0	0,93
<b>CAR</b>	22,0	21,8	22,0	21,9	1,70
<b>CARSi</b>	15,0	15,5	15,0	15,2	1,17
<b>THL</b>	21,5	21,5	21,3	21,4	1,66
<b>THLSi</b>	16,0	17,0	16,0	16,3	1,26
<b>TQ</b>	28,3	30,5	30,5	29,8	2,30
<b>TQSi</b>	20,0	21,0	20,0	20,3	1,57
<b>EU</b>	23,0	23,8	23,8	23,5	1,82
<b>EUSi</b>	17,5	15,5	17,3	16,8	1,30
<b>AITC</b>	22,5	22,5	22,5	22,5	1,74
<b>AITCSi</b>	15,5	15,5	15,0	15,3	1,19
<b>ADS</b>	21,0	22,0	21,0	21,3	1,65
<b>ADSSi</b>	16,0	15,0	16,0	15,7	1,21

## 5.2 Schaalův test č. 2

Následující tabulka uvádí IP a PF antioxidantů o koncentraci 0,04 %. Tymochinon a eugenol dosáhly srovnatelné AA ve formě vázané na křemičitý materiál a ve formě volné. PF u zbylých sloučenin dosahoval v obou formách hodnot v rozmezí od 0,57 do 1,03, vzorky tedy nevykazovaly téměř žádnou AA.

Tabulka 6 IP a PF vzorků s antioxidantem (0,04 %) vázaným a nevázaným na MCM-41

Vzorek	IP [dny]				PF
	1.	2.	3.	průměr	
Kontrola	9,0	9,6	-	9,8	1,00
CN	10,8	9,0	10,5	10,1	1,03
CNSi	7,0	5,0	7,0	6,3	0,65
CAR	9,5	9,0	8,5	9,0	0,92
CARSi	9,5	9,6	8,5	9,2	0,94
THL	6,3	7,0	6,2	6,5	0,66
THLSi	10,0	10,0	9,3	9,8	1,00
TQ	14,2	15,2	13,1	14,2	1,45
TQSi	15,0	13,8	12,7	13,8	1,41
EU	13,2	9,2	9,8	10,7	1,10
EUSi	10,3	11,5	11,0	10,9	1,12
AITC	5,8	5,8	5,3	5,6	0,57
AITCSi	-	6,0	6,0	6,0	0,61
ADS	5,7	5,5	7,3	6,2	0,63
ADSSi	6,4	7,2	7,5	7,0	0,72

V Tabulce 7 jsou uvedeny výsledky IP a PF samostatného MCM-41. Při koncentraci 0,01 a 0,04 % nevykazoval žádnou AA.

Tabulka 7 IP a PF vzorků s různým množstvím MCM-41

Vzorek	IP [dny]				PF
	1.	2.	3.	průměr	
Kontrola	9,0	9,6	-	9,8	1,00
MCM-41 (0,01 % hm.)	9,0	10,6	10,6	10,1	1,03
MCM-41 (0,02 % hm.)	10,0	9,0	13,7	10,9	1,11
MCM-41 (0,04 % hm.)	6,3	7,1	7,1	6,8	0,70

### 5.3 Schaalův test č. 3

Ve třetím z testů byla hodnocena stabilita tuku a AA při koncentraci antioxidantu 0,08 %. V této koncentraci vykazovaly AA již všechny sloučeniny. Srovnatelná AA u formy volné a vázané na MCM-41 byla u karvakrolu a allylithiokyanátu. Vyšší AA ve formě vázané na křemičitém materiálu vykazoval cinnamaldehyd, thymol, tymochinon a eugenol. Naopak nižší AA oproti volé formě vykazoval allyldisulfid vázaný na MCM-41.

**Tabulka 8 IP a PF vzorků s antioxidantem (0,08 %) vázaným a nevázaným na MCM-41**

Vzorek	IP [dny]				PF
	1.	2.	3.	průměr	
Kontrola	4,0	4,0	4,0	4,0	1,00
CN	7,0	6,5	7,0	6,8	1,71
CNSi	9,0	9,0	8,5	8,8	2,21
CAR	7,5	7,5	8,0	7,7	1,92
CARSi	8,5	8,0	8,0	8,2	2,04
THL	9,0	9,0	8,0	8,7	2,17
THLSi	9,5	10,0	10,0	9,8	2,46
TQ	11,0	8,5	9,0	9,5	2,38
TQSi	12,5	10,0	9,0	10,5	2,63
EU	11,0	12,0	12,0	11,7	2,92
EUSi	13,5	13,5	12,5	13,2	3,29
AITC	6,0	5,0	7,0	6,0	1,50
AITCSi	6,0	6,0	6,0	6,0	1,50
ADS	9,0	9,0	7,5	8,5	2,13
ADSSi	6,5	6,5	4,0	5,7	1,42

## 5.4 Schaalův test č. 4

Tabulky 9 a 10 shrnují výsledky IP a PF stanovených na základě RZH a změny PČ. Testován byl syntetický BHA při koncentraci 0,02 % a MCM-41 o koncentraci 0,08 %. Hodnocena byla také AA eugenolu v koncentraci 0,02 % a 0,08 %.

Vzhledem k nestejnému postupu stanovení IP u hodnocení AA na základě RZH a změny PČ, jsou rozdíly mezi výslednými PF. Vzájemné vztahy mezi vzorky jsou však obdobné.

Hodnoty AA obou forem eugenolu při koncentraci 0,02 % stanovené na základě RZH i na základě změny PČ byly srovnatelné. Při koncentraci 0,08 % byl PF vyšší v obou typech stanovení u eugenolu, který nebyl vázán na MCM-41.

**Tabulka 9 IP a PF eugenolu, BHA a MCM-41 v různé koncentraci (stanoveno na základě RZH)**

Vzorek	IP [dny]				PF
	1.	2.	3.	průměr	
Kontrola	3,8	4,0	3,1	3,6	1,00
EU (0,02 %)	5,5	5,8	5,5	5,6	1,54
EUSi (0,02 %)	5,5	5,5	6,0	5,7	1,56
BHA (0,02 %)	> 20	> 20	> 20	> 20	> 5
EU (0,08 %)	8,5	8,2	8,5	8,4	2,31
EUSi (0,08 %)	-	9,5	9,7	6,4	1,76
MCM-41 (0,08 %)	4,2	4,1	4,1	4,1	1,14

**Tabulka 10 IP a PF eugenolu, BHA a MCM-41 v různé koncentraci (stanoveno na základě změny PČ)**

Vzorek	IP [dny]				PF
	1.	2.	3.	průměr	
Kontrola	11,8	11,8	12,2	11,9	1,00
EU (0,02 %)	11,6	14,8	14,8	13,7	1,15
EUSi (0,02 %)	14,4	15,1	14,4	14,6	1,23
BHA (0,02 %)	25,5	24,7	27	25,7	2,16
EU (0,08 %)	12,9	12,6	13,3	12,9	1,08
EUSi (0,08 %)	12	11,3	-	11,7	0,98
MCM-41 (0,08 %)	11,3	11,3	11,3	11,3	0,95

\*Z důvodu nerovnoměrného nárůstu PČ byla IP stanovena u všech vzorků při nárůstu PČ na hodnotu 0,01 mmol/l.

## 5.5 Schaalův test č. 5

Výsledky Schaalova testu č. 5 shrnuje Tabulka 11. V tomto testu byla porovnávána AA eugenolu o různé koncentraci. Ve všech případech byla AA eugenolu vázaného na MCM-41 nižší než v případě látky aplikované ve volné formě.

Tabulka 11 IP a PF eugenolu vázaného a nevázaného na MCM-41 v různém koncentraci

Vzorek	IP [dny]				PF
	1.	2.	3.	průměr	
Kontrola	25,5	27,3	24	25,6	1,00
EU (0,02 %)	30,2	30,5	30,0	30,2	1,18
EUSi (0,02 %)	27,5	29,0	27,8	28,1	1,10
EU (0,04 %)	34,2	32,8	33,2	33,4	1,30
EUSi (0,04 %)	25,5	28,2	26,0	26,6	1,04
EU (0,06 %)	35,7	32,7	32,5	33,6	1,31
EUSi (0,06 %)	29,7	29,3	29,4	29,5	1,15
EU (0,08 %)	36,0	35,2	31,6	34,3	1,34
EUSi (0,08 %)	29,5	31,3	33,3	31,4	1,23

\*alternativní podmínky testu- množství sádla 2,5 g a skladování při teplotě 40 °C



## 5.6 Schaalův test č. 6

V závěrečném testu se porovnávala stabilita tuku a AA eugenolu, tymochinonu a karvakrolu vázaného a nevázaného na křemičitý materiál.

Tabulka 12 ukazuje, že AA eugenolu v obou formách byla ve všech případech srovnatelná.

Tabulka 12 IP a PF eugenolu vázaného a nevázaného na MCM-41 v různém množství

Vzorek	IP [dny]				PF
	1.	2.	3.	průměr	
<b>Kontrola</b>	8,7	9,5	8,7	9,0	1,00
<b>EU (0,02 %)</b>	8,5	8,4	8,4	8,4	0,94
<b>EUSi (0,02 %)</b>	8,8	8,4	8,8	8,7	0,97
<b>EU (0,04 %)</b>	7,8	9,2	9,0	8,7	0,97
<b>EUSi (0,04 %)</b>	9,5	9,5	8,8	9,3	1,03
<b>EU (0,08 %)</b>	12,6	13,5	11,7	12,6	1,41
<b>EUSi (0,08 %)</b>	12,5	12,5	12,6	12,5	1,40

Z Tabulky 13, ve které jsou shrnuty výsledky IP a PF tymochinonu, vyplývá, že AA tymochinonu byla v tomto testu vždy vyšší při použití jeho volné formy.

Tabulka 13 IP a PF tymochinonu vázaného a nevázaného na MCM-41 v různém množství

Vzorek	IP [dny]				PF
	1.	2.	3.	průměr	
<b>Kontrola</b>	8,7	9,5	8,7	9,0	1,00
<b>TQ (0,02 %)</b>	20,2	21,6	24,0	21,9	2,45
<b>TQSi (0,02 %)</b>	15,0	13,0	12,7	13,6	1,51
<b>TQ (0,04 %)</b>	25,0	30,0	31,8	28,9	3,23
<b>TQSi (0,04 %)</b>	13,0	14,0	13,4	13,5	1,50
<b>TQ (0,08 %)</b>	28,3	31,5	35,5	31,8	3,54
<b>TQSi (0,08 %)</b>	22,0	19,2	17,8	19,7	2,19

AA karvakrolu byla při koncentraci 0,02 a 0,04 % v obou formách srovnatelná. Při koncentraci 0,08 % vykazoval vyšší AA karvakrol vázaný na MCM-41. Hodnoty IP a PF shrnuje Tabulka 14.

**Tabulka 14 IP a PF karvakrolu vázaného a nevázaného na MCM-41 v různém množství**

Vzorek	IP [dny]				PF
	1.	2.	3.	průměr	
<b>Kontrola</b>	8,7	9,5	8,7	9,0	1,00
<b>CAR (0,02 %)</b>	9,7	8,7	9,0	9,1	1,02
<b>CARSi (0,02 %)</b>	10,9	10,7	9,3	10,3	1,15
<b>CAR (0,04 %)</b>	9,5	9,6	9,5	9,5	1,06
<b>CARSi (0,04 %)</b>	9,7	10,5	10,0	10,1	1,12
<b>CAR (0,08 %)</b>	12,0	10,0	10,0	10,7	1,19
<b>CARSi (0,08 %)</b>	12,5	11,7	11,5	11,9	1,33

V posledním testu byla znovu hodnocena i AA syntetického antioxidantu BHA o koncentraci 0,02 %. Indukční perioda byla stanovena na 35,9 dní. Oproti samostatnému sádlu s hodnotou indukční periody necelých 9 dní, lze hodnotit stabilitu tuku s BHA jako vysokou.

**Tabulka 15 IP a PF syntetického BHA v množství 0,02 % hm.**

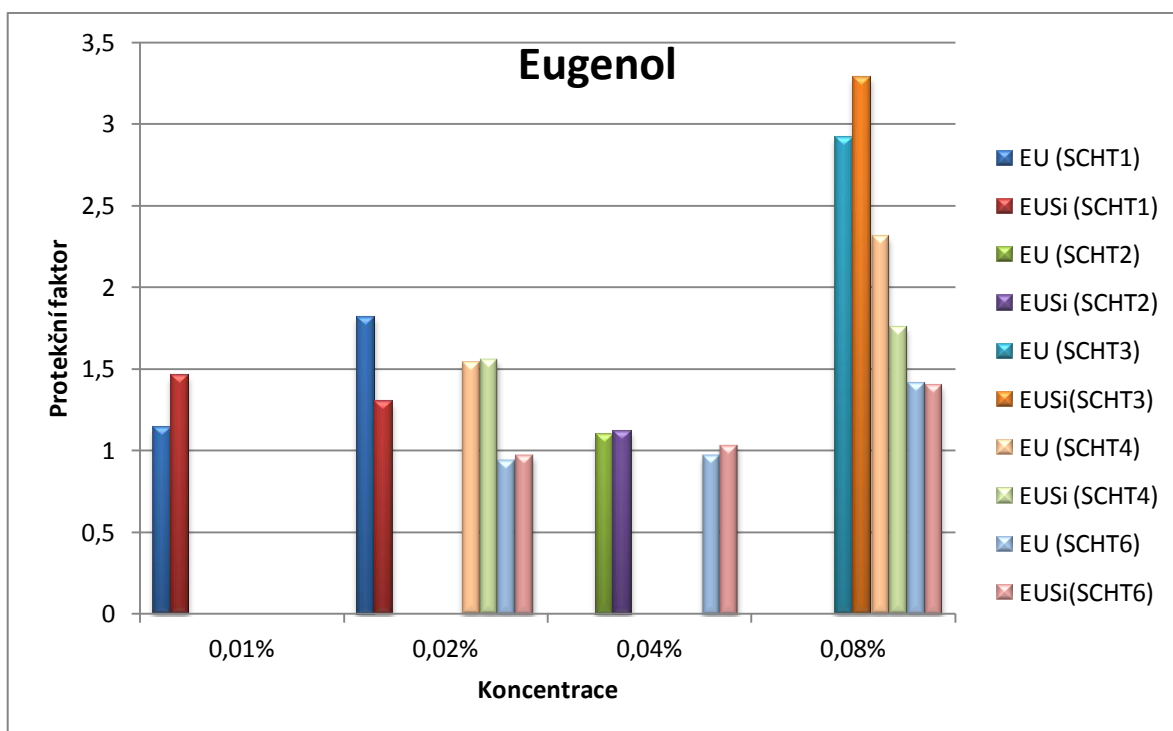
Vzorek	IP [dny]				PF
	1.	2.	3.	průměr	
<b>Kontrola</b>	8,7	9,5	8,7	9,0	1,00
<b>BHA (0,02 %)</b>	36,7	35,0	36,0	35,9	4,00

## 5.7 Grafické srovnání výsledků antioxidační aktivity

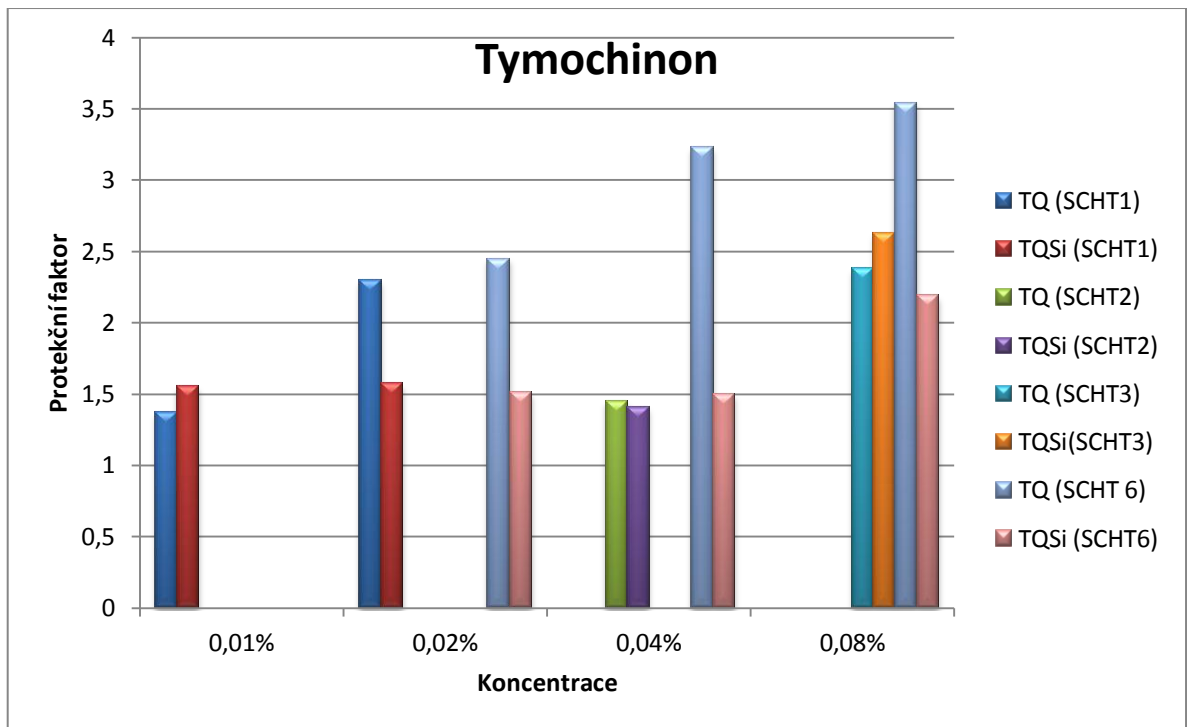
Pro názornost jsou vybrané výsledky AA zobrazeny taktéž grafickou formou. Graf 1 zobrazuje výsledky eugenolu, Graf 2 tymochinonu a Graf 3 karvakrolu. Jednotlivé Schaalovy testy jsou označeny zkratkami SCHAT1 až SCHAT6. Vzhledem k odlišným podmínkám testu č. 5 nejsou jeho výsledky v grafickém srovnání zahrnuty.

Grafy 4-6 zobrazují závislost relativních změn hmotnosti v čase při testování tymochinonu v různých koncentracích při Schaalově testu č. 6. IP byla v případě tymochinonu vázaného na MCM-41 ve všech třech testovaných koncentracích znatelně kratší než u jeho volné formy. Přítomnost volného tymochinonu tedy zajistila vyšší stabilitu tuku v čase ve srovnání s jeho formou vázanou na křemičitý materiál. Graf 7 pak zobrazuje průběh relativních změn sádla bez antioxidantu v témže testu.

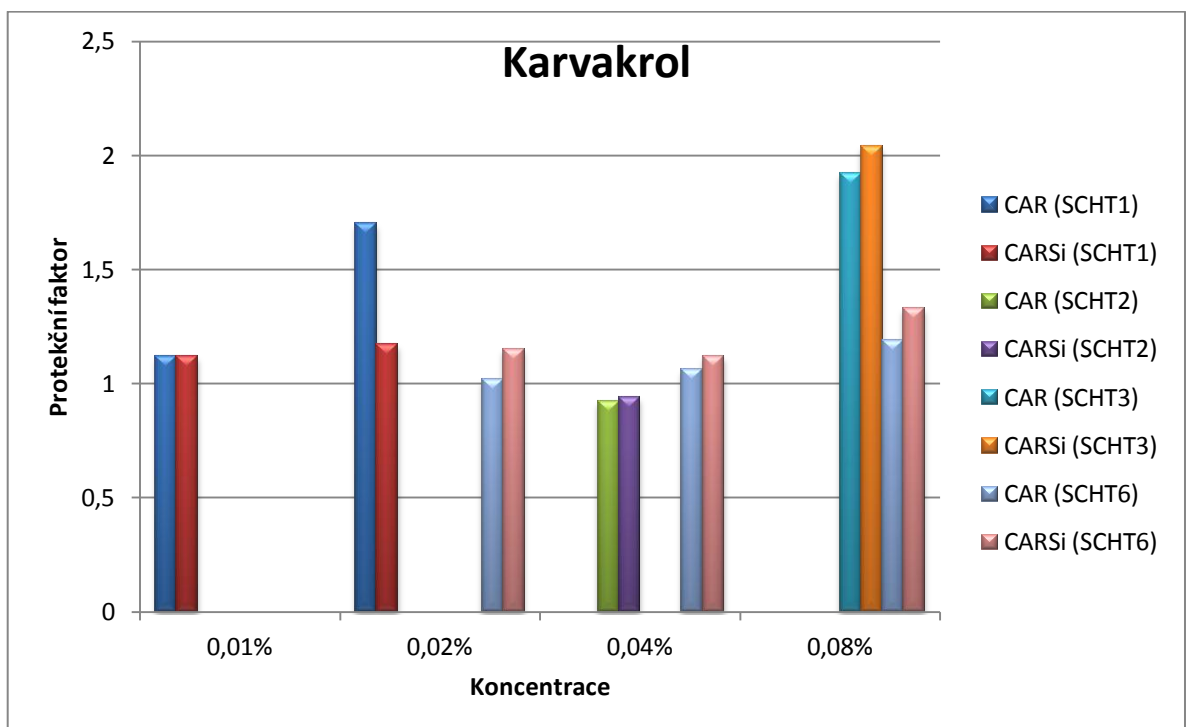
Graf 1 Protekční faktory eugenolu



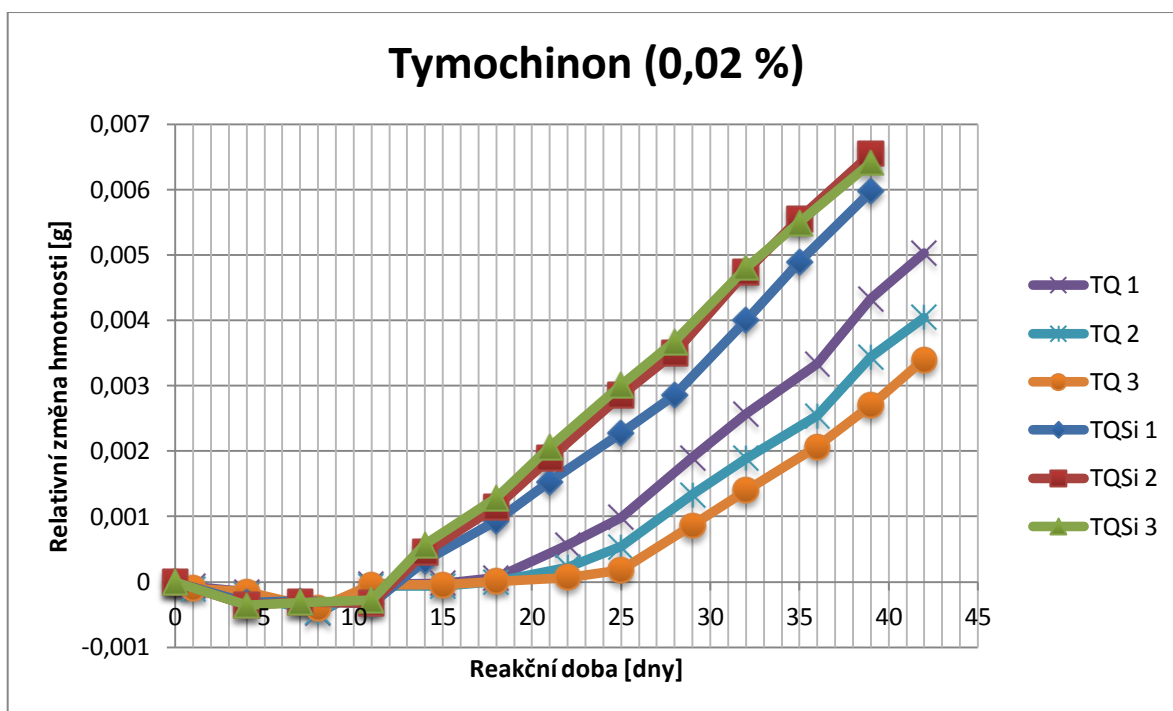
Graf 2 Protekční faktory tymochinonu



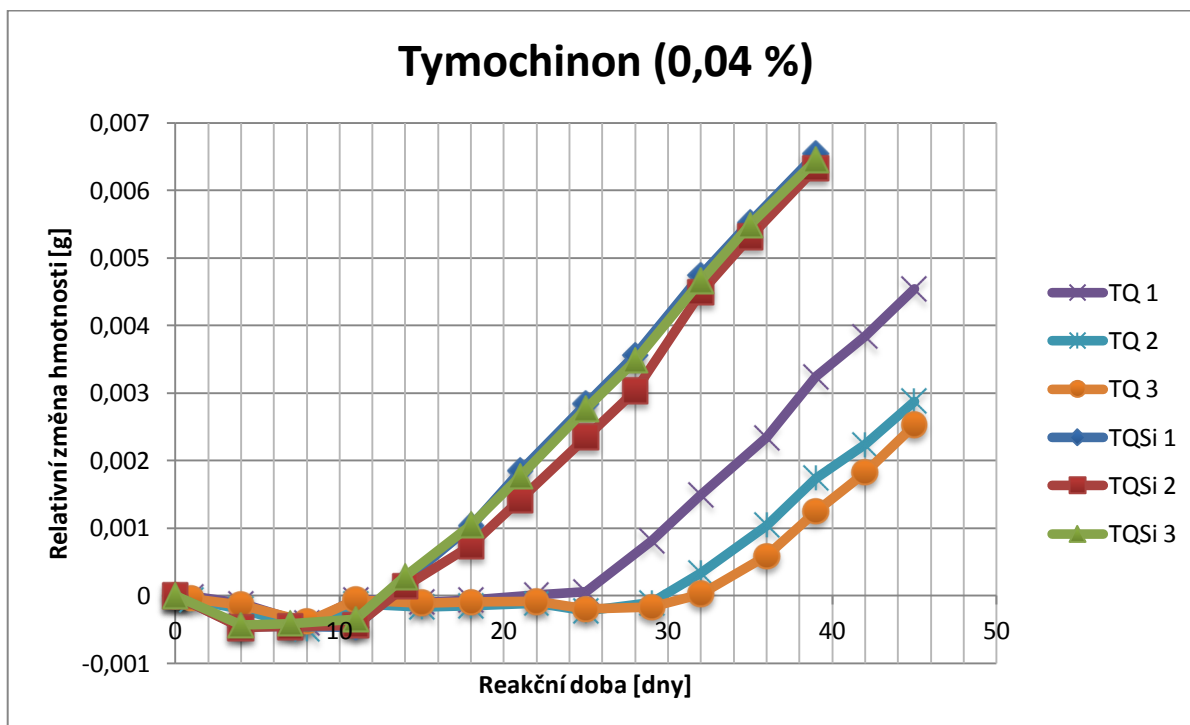
Graf 3 Protekční faktory karvakrolu



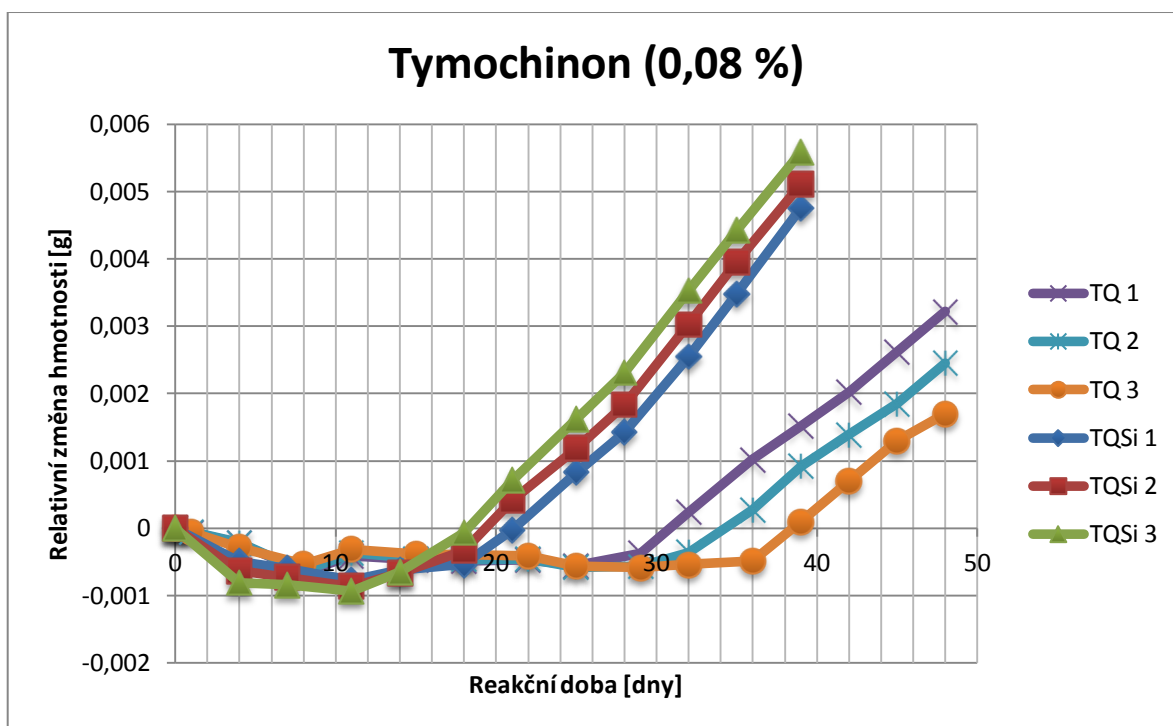
Graf 4 Průběh oxidace sádla s tymochinonem (0,02 %)



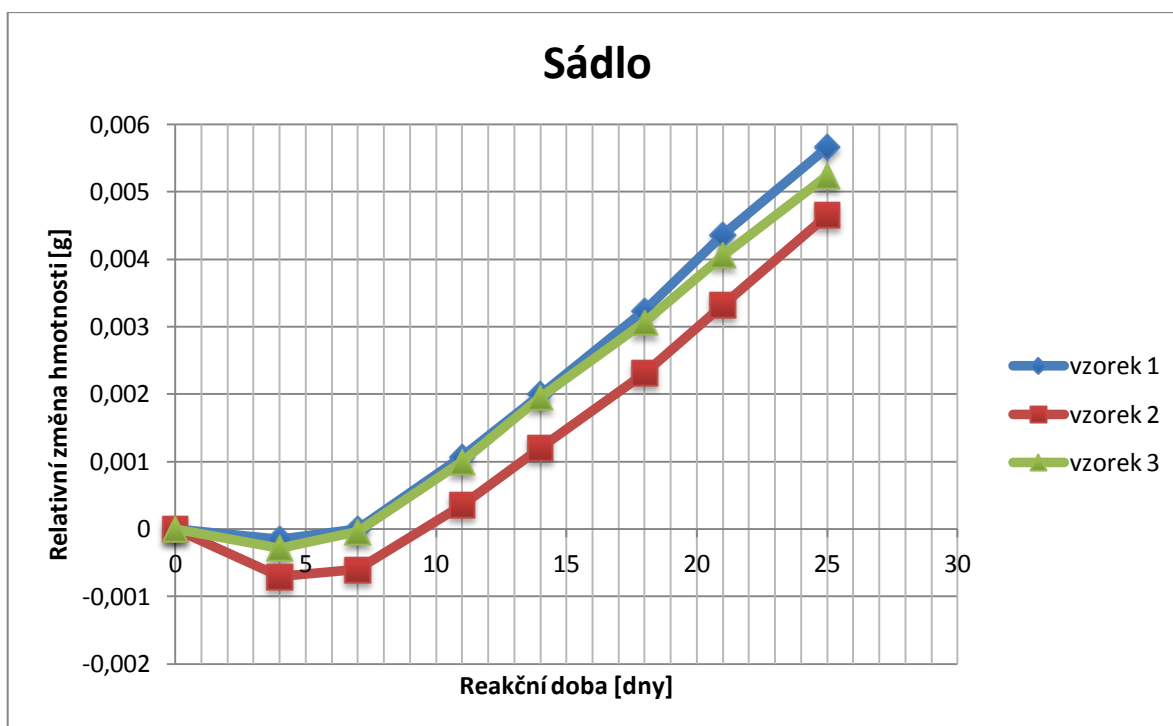
Graf 5 Průběh oxidace sádla s tymochinonem (0,04 %)



Graf 6 Průběh oxidace sádla s tymochinonem (0,08 %)



Graf 7 Průběh oxidace samotného sádla



## 6 Diskuze

Současná odborná literatura neuvádí porovnání AA sloučenin ve formě volné a vázané na křemičitý materiál. Porovnáním účinku sloučeniny v těchto dvou formách se nicméně zabývají Bernardos et al. (2014) a Janatova et al. (2015). Konkrétně se dané práce zabývají hodnocením inhibičního účinku vybraných sloučenin na *Aspergillus Niger*. Bernardos et al. (2014) testovali antifugální účinek karvakrolu, thymolu, cinnamaldehydu a eugenolu. Významně vyšší antifugální aktivita u formy vázané v porovnání s formou volnou byla sledována u karvakrolu a thymolu. Janatova et al. (2015) hodnotili širší škálu sloučenin. Testována byla antifugální aktivita stejných sloučenin, u nichž byla v našem případě stanovována AA, tedy thymolu, tymochinonu, eugenolu, karvakrolu, cinnamaldehydu, allyldisulfidu a allylthiokyanátu. Antifugální aktivitu vykazovaly thymol, tymochinon, eugenol, karvakrol a cinnamaldehyd. Statisticky významně vyšší byla tato aktivita u forem vázaných na křemičitý materiál MCM-41. Zapouzdření sloučenin způsobilo omezení jejich těkání a tudíž prodloužení jejich účinku. Výjimkou byly pouze sloučeniny obsahující síru (allyldisulfid a allylthiokyanát). Na základě těchto výsledků bylo možné předpokládat podobný efekt sloučenin při hodnocení jejich antioxidačních účinků.

Vzhledem k tomu, že nejsou dostupné žádné informace o porovnání AA látek volných a vázaných na křemičitý materiál, byla provedena řada šesti Schaalových testů, které na sebe logicky navazují.

V Schaalově testu č. 1 byla hodnocena AA při koncentraci sloučenin 0,01 a 0,02 %. Při koncentraci 0,01 % vykazovaly vyšší stabilitu vzorky tymochinonu, eugenolu, allylthiokyanátu a allyldisulfidu, jež byly navázány na MCM-41. Výsledky zbylých vzorků byly v obou formách srovnatelné. Při koncentraci antioxidantu 0,02 % byla AA vždy vyšší za přítomnosti sloučeniny ve volné formě. Kromě vzorků EUSi a ADSSi, byl ve všech případech s vyšší koncentrací i vyšší výsledný PF.

Schaalovy testy č. 2 a 3 měly za úkol doplnit první test o výsledky při vyšší koncentraci antioxidantu. Schaalův test č. 2 testoval vzorky s koncentrací 0,04 %. Pouze tymochinon a eugenol v této koncentraci vykazovaly nějakou AA a ta byla ve formě vázané i volné srovnatelná. Tento test zároveň hodnotil, zda samotné MCM-41 nemůže vykazovat AA. Materiál MCM-41 byl hodnocen při koncentraci 0,01; 0,02 a 0,04 % a u žádného ze vzorků nebyla významná AA. Nejvyšší PF měl v tomto případě MCM-41 o koncentraci 0,02 %, jehož hodnota byla 1,11. Test č. 3 doplňoval hodnocení o nejvyšší z koncentrací, tedy 0,08 %. V této poměrně vysoké koncentraci vykazovaly vyšší AA opět, jako v testu č. 1 při

koncentraci 0,01 % vzorky eugenolu a tymochinonu, které byly vázané na MCM-41. Obdobných výsledků, avšak rozdílných vůči testu č. 1 a koncentraci 0,01 % dosáhly tentokrát cinnamaldehyd a thymol. Allyldisulfid v této koncentraci dosahoval lepších výsledků ve formě volné.

Takto odlišné výsledky mohou být dány rozdílnými podmínkami testů. Základní nastavení testu bylo sice stejné, ale testy probíhaly v různém čase a tudíž sádlo, které bylo použito, nemuselo být naprosto shodné. Svědčí o tom i IP kontroly, tedy samotného sádla. IP sádla v testech č. 1, 2 a 3 byly 12,9 dnů, 9,8 dne a 4 dny. Očekávaná hodnota byla kolem 10 dnů (při výpočtu na základě RZH). Můžeme tedy vyvodit, že sádlo použité v testu č. 3 mohlo být před zakoupením skladováno déle nebo za nevhodných podmínek.

Pro omezení rozdílnosti podmínek jednotlivých testů, byl do testu č. 4 vybrán pouze jeden z antioxidantů a byl testován ve dvou rozdílných koncentracích. Vzhledem k tomu, že tento postup byl již využit v testu č. 1, byly koncentrace zvolené s větším rozdílem a to 0,02 a 0,08 %. Vzhledem k tomu, že silice hřebíčku patří mezi antioxidantně nejaktivnější (viz kapitola 3.2.5), tak byla vybrána jeho hlavní složka, tedy eugenol, jako vzorový antioxidant pro tento a další testy. Při koncentraci 0,02 % byla AA v obou formách eugenolu shodná a při koncentraci 0,08 % byla AA vyšší u eugenolu volného. Je třeba však uvést, že IP sádla byla v tomto testu taktéž nízká jako u testu č. 3. Pro doplnění řady testovaných koncentrací u MCM-41, byla v tomto testu hodnocena jeho AA při koncentraci 0,08 %. Jeho PF byl 1,14 a jeho IP se od IP kontroly lišilo pouze o 0,5 dne.

V předchozích testech byly vždy stejné podmínky, tedy 25 g sádla skladovaných při 60 °C v kádinkách. Vzhledem k rozličným výsledkům lze předpokládat, že výsledky nebyly ovlivněny vyšší těkavostí vzorků, které byly ve formě volné. Proto byly v Schaalově testu č. 5 nastaveny ještě alternativní podmínky. Pro testování bylo použito pouze 2,5 g sádla, které bylo skladováno v Petriho miskách při 40 °C. Tímto způsobem se zvětšila možná plocha pro odpařování volného antioxidantu, ale zároveň byla snížena teplota skladování. Za těchto podmínek byl hodnocen opět eugenol. Tentokrát v koncentracích 0,02; 0,04; 0,06 a 0,08 %. Ve všech případech byla AA vyšší u formy volné, tudíž se nepotvrdilo, že při Schaalově testu může mít vliv na zpomalení oxidace navázání antioxidantu na křemičitý materiál, kterým se zpomalí jeho uvolňování a tak se i omezí jeho možný únik těkáním během skladování.

Pro potvrzení domněnky, že tedy AA není ovlivněna formou, ve které je antioxidant ve vzorku, byl proveden poslední test. Tentokrát se testoval eugenol, tymochinon a karvakrol při koncentraci 0,02; 0,04 a 0,08 %. Pouze eugenol a tymochinon vykazovaly v předchozích testech alespoň ve dvou koncentracích vyšší AA ve formě vázané na MCM-41. Jak již bylo



zmíněno, jednalo se o koncentraci 0,01 % v testu č. 1 a koncentraci 0,08 % v testu č. 3. Jako třetí testovaný antioxidant byl vybrán karvakrol, který v předchozích testech kromě testu č. 1 při koncentraci 0,02 %, nevykazoval rozdílnou AA ve formě vázané a nevázané na křemičitý materiál. Výsledné PF eugenolu v posledním z testů byly v obou formách ve všech testovaných koncentracích obdobné. Podobně dopadly i výsledky karvakrolu. Pouze při použití vázané formy při koncentraci 0,08 % byla AA vyšší oproti formě volné. Zajímavých výsledků však dosáhl tymochinon (viz Graf 4-6), který ve všech koncentracích dosahoval vyšších IP ve formě volné.

Pro zajímavost a porovnání AA byl navíc hodnocen v testu č. 4 a 6 syntetický BHA o koncentraci 0,02 %. Jeho PF byly  $> 5$  a  $4$ . Lze jej tedy zařadit dle těchto hodnot mezi silné antioxidanty. Tomuto PF s hodnotou 3,54 se nejvíce přiblížil pouze tymochinon ve volné formě, avšak při koncentraci čtyřnásobně vyšší. Testované antioxidanty je tedy možné označit jako slabé antioxidanty. Není nezajímavé, že silice obsahující sloučeniny testované v experimentální části jsou v řadě publikací označovány za antioxidanty se shodnou AA jako má BHA (Singh et al., 2005; El-Baroty et al., 2010; Mittal et al., 2014). Samotné sloučeniny tedy působí spíše méně efektivně než za přítomnosti sloučenin dalších, případně za přítomnosti jejich derivátů. Porovnáním AA eugenolu, thymolu a karvakrolu a jejich derivátů se zabývali Mastelić et al. (2008). AA derivátů byla vždy vyšší (v jednom případě až dvojnásobně vyšší).

Lepší AA silice oproti samotným sloučeninám lze vysvětlit také tím, že jednotlivé sloučeniny silice mohou působit s různými produkty oxidace, primárními či sekundárními, a tak se jejich AA ve vzájemném působení doplňuje. Takovéto doplňující účinky různých složek silice česneku popisuje Chung (2006) viz kapitola 3.2.7.1. Tento fakt může mít také vliv na výsledky tohoto experimentu. Pokud zkoumané sloučeniny reagují spíše s primárními produkty oxidace, tak je jejich postupné uvolňování, kdy s časem dochází k větší kumulaci sekundárních produktů, neúčinné.

Vzhledem k tomu, že bylo testováno více antioxidantů o různých koncentracích, kdy by byl honocený vzorek o stejné koncentraci příliš malý, tak není možné statistické zhodnocení. Testované sloučeniny spíše vykazovaly srovnatelnou AA jak ve formě vázané, tak ve formě nevázané na MCM-41.

## 7 Závěr

Byla porovnávána antioxidační aktivita sedmi sloučenin ve formě vázané na křemičitý materiál MCM-41 s formou volnou. Pro stanovení antioxidační aktivity byl vybrán Schaalův test. Bylo provedeno šest testů. Testy byly provedeny za stejných podmínek, kdy byly vzorky o hmotnosti 25 g skladovány za přístupu vzduchu v kádinkách při teplotě 60 °C. Výjimkou byl Schaalův test č. 4, ve kterém byly vzorky o hmotnosti 2,5 g skladovány v Petriho miskách při teplotě 40 °C. Závěry k jednotlivým testům jsou následující:

### 1. Schaalův test č. 1

Při koncentraci antioxidantu 0,01 % byla AA vyšší u sloučeniny vázané na křemičitý materiál oproti sloučenině ve volné formě ve čtyřech případech ze sedmi.

Při koncentraci 0,02 % byla AA vždy vyšší u formy volné.

### 2. Schaalův test č. 2

Při testování koncentrace 0,04 % nevykazovalo pět z testovaných téměř žádnou AA. Zbývající dvě sloučeniny měly v obou formách AA srovnatelnou.

### 3. Schaalův test č. 3

Při koncentraci 0,08 % byla AA vyšší u čtyř z testovaných sloučenin ve formě vázané na MCM-41. U dvou sloučenin byla AA srovnatelná v obou formách a v jednom byla AA vyšší u formy volné.

### 4. Schaalův test č. 4

Při koncentraci 0,02 % byla AA eugenolu srovnatelná v obou formách.

Při koncentraci 0,08 % byla AA vyšší u formy volné.

### 5. Schaalův test č. 5

U všech testovaných koncentrací eugenolu byla AA vyšší u formy volné.

### 6. Schaalův test č. 6

AA eugenolu byla ve všech případech srovnatelná v obou formách.

AA tymochinonu byla ve všech koncentracích vyšší u formy volné.

AA karvakrolu byla srovnatelná. Jen v koncentraci 0,08 % byla vyšší u formy vázané.

Souhrnné stanovisko k hypotéze:

Hypotézu nelze potvrdit. Antioxidační aktivitu látek vázaných na křemičitý materiál nelze z výsledků experimentu hodnotit jako vyšší než antioxidační aktivitu látek ve formě volné.

## 8 Sezam použité literatury

Agostini, A., Sancenón, F., Martínez-Mañez, R., Marcos, M. D., Soto, J., Amorós, P. 2012. A Photoactivated Molecular Gate. *Chemistry- A European Journal*. 18. 12218-12221.

Allyl isothiocyanate. 1999. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 73. 37-48.

Almeida, M. G., Serra, A., Silveira, C. M., Moura, J. J. G. 2010. Nitrite Biosensing via Selective Enzymes- A Long but Promising Route. *Sensors*. 10 (12). 11530-11555.

Atsumi, T., Fujisawa, S., Tonosaki, K. 2005. A comparative study of antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. *Toxicology in Vitro*. 19. 1025-1033.

Baghel, S. S., Shrivastava, N., Baghel, R. S., Agrawal, P., Rajput, S. 2012. A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 1. 146-160.

Baser, K., Buchbauer, G. 2010. Handbook of essential oil: science, technology, and applications. CRC Press. Boca Raton. p. 975. ISBN: 14-200-6315-4.

Belete, Y., Dagne, E. 2014. HPTLC assay of thymoquinone in black seed and black seed oil (*Nigella sativa* Linn) and identification of thymoquinone conversion with UV-VIS. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 4 (4). 1-5.

Berlier, G., Gastaldi, L., Sapino, S., Miletto, I., Bottinelli, E., Chirio, D., Ugazio, E. 2013a. MCM-41 as a useful vector for rutin topical formulations: Synthesis, characterization and testing. *International Journal of Pharmaceutics*. 457 (1). 177-186.

Berlier, G., Gastaldi, L., Ugazio, E., Miletto, I., Iliade, P., Sapino, S. 2013b. Stabilization of quercetin flavonoid in MCM-41 mesoporous silica: positive effect of surface functionalization. *Journal of Colloid and Interface Science*. 393. 109-118.

Bernardos, A., Aznar, E., Marcos, M. D., Martínez-Mañez R., Sancenon F., Soto J., Barat, J. M., Amorós, P. 2009. Enzyme-responsive controlled release using mesoporous silica supports capped with lactose. *Angewandte Chemie International Edition*. 48. 5884–5887.

Bernardos, A., Kouřimská, L. 2013. Applications of Mesoporous Silica Materials in Food: a Review. Czech Journal of Food Sciences. 31 (2). 99-107.

Bernardos, A., Marina, T., Žáček, P, Pérez-Esteve, É., Martínéz-Mañez, R., Lhotka, M., Kouřimská, L., Pulkrábek, J., Klouček, P. 2014. Antifungal effect of essential oil components against *Aspergillus niger* when loaded into silica mesoporous supports. Journal of the Science of Food and Agriculture.

Brady, R., Woonton, B., Gee, M. L., O'Connor, A. J. 2008. Hierarchical mesoporous silica materials for separation of functional food ingredients- A review. Innovative Food Science. 9 (2). 243-248.

Burits, M., Bucar, F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* Essential Oil. Phytotherapy Research. 14. 323-328.

Čavar, S., Maksimović, M., Šolić, M. E., Jerković-Mujkić, A., Bešta, R. 2008. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. Food Chemistry. 111. 648-653.

ČSN EN ISO 3960. Živočišné a rostlinné tuky a oleje- Stanovení peroxidového čísla. 2010. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a zkušebnictví. Praha. 20 s.

El-Baroty, G. S., El-Baky, H. H. A., Farag, R. S., Saleh, M. A. 2010. Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. African Journal of Biochemistry Research. 4 (6). 167-174.

Esmaeili, A., Khodadadi, A. 2012. Antioxidant Activity of a Solution of Thymol in Ethanol. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 14 (7). 14-18.

Farrokhfall, K., Khoshbaten, A., Zahediasl, S., Mehrani, H., Karbalaeei, N. 2014. Improved islet function is associated with anti-inflammatory, antioxidant and hypoglycemic potential of cinnamaldehyde on metabolic syndrome induced by high tail fat in rats. Journal of Funtional Foods. 10. 397-406.

Flora, G., Gupta, D., Tiwari, A. 2012. Toxicity of lead: A review with recent updates. Interdisciplinary Toxicology. 5 (2). 47-58.

Fruijtier-Poelloth, C. 2012. The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica- A nanostructured material. *Toxicology*. 294. 61–79.

Garcia-Acosta, B., Comes, M., Bricks, J. L., Kudinova, M. A., Kurdyukov, V. V., Tolmachev, A. I., Descalzo, A. B., Marcos, M. D., Martínez-Mañez, R., Moreno, A., Sancenon, F., Soto, J., Villaescusa, L. A., Rurack, K., Barat, J. M., Escriche, I., Amoros, P. 2006. Sensory hybrid host materials for the selective chromo-fluorogenic detection of biogenic amines. *Chemical Communications*. 2239–2241.

Gargiulo, N., Attianese, I., Buonocore, G. G., Caputo, D., Lavorgna, M., Mensitieri, G., Lavogna M. 2013.  $\alpha$ -tocopherol release from active polymer films loaded with functionalized SBA-15 mesoporous silica. *Microporous and Mesoporous Materials*. 167. 10-15.

Gowder, S. J. T., Deravaraj, H. 2006. Effect of the Flavour Cinnamaldehyde on the Antioxidant Status of Rat Kidney. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 99 (5). 379-382.

Guimarães, A. G., Oliveira, G. F., Mello, M. S., Cavalcanti, S. C. H., Antonioli, A. R., Bonjardim, L. R., Silva, F. A., Santos, J. P., Rocha, R. F., Moreira J. C. F., Araújo, A. A. S., Gelain, D. P., Quintans-Júnior, L. J. 2010. Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 107 (6). 949-957.

Gülcin, I. 2011. Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure-Activity Relationship Study. *Journal of Medicinal Food*. 14 (9). 975-985.

Heirlings, L., Siro, I., Devlieghere, F., Bavel van, E., Cool, P., de Meulenaer, B., Vansant, E. F., Debevere, J. 2004. Influence of polymer matrix and adsorption onto silica materials on the migration of  $\alpha$ -tocopherol into 95% ethanol from active packaging. *Food Additives and Contaminants*. 21. 1125–1136.

Hossain, M. A., Al-Hashmi, R. A., Weli, A. M., Al-Riyami, Q., Al-Sabahib, A. N. 2012. Constituents of essential oil from different brands of *Syzigium caryophyllatum* L by gas chromatography-mass spectrometry. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2 (3). S1446-S1449.

- Chatterjee, D., Bhattacharjee, P. 2012. Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: Shelf-life and frying stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering*. 117. 545-550.
- Chen, S. Y., Lao-Ubol, S., Mochizuki, T., Abe, Y., Toba, M., Yoshimura, Y. 2014. Transformation of non-edible vegetable oils into biodiesel fuels catalyzed by unconventional sulfonic acid-functionalized SBA-15. *Applied Catalysis A. General*. 485. 28-39.
- Chung, L. Y. 2006. The Antioxidant Properties of Garlic Compounds: Allyl Cysteine, Alliin, Allicin, and Allyl Disulfide. *Journal of Medicinal Food*. 9 (2). 205-213.
- Janatova, A., Bernardos, A., Smid, J., Frankova, A., Lhotka, M., Kourimska, L., Pulkrabek, J., Kloucek, P. 2015. Long-term antifungal activity of volatile essential oil components released from mesoporous silica materials. *Industrial Crops and Products*. 67. 216-220.
- Johnson-Ajinwo, O. R., Li, W. W. 2014. Stable Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Quantification of Thymoquinone in Black Cumin Seed Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62. 5466-5471.
- Khunkitti, W., Veerapan, P., Hahnvajanawong, Ch. 2012. In vitro bioactivities of clove buds oil (*Eugenia varyophyllata*) and its effect on dermal fibroblast. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4 (3). 556-560.
- Kisler, J. M., Dähler, A., Stevens, G. W., O'Connor, A. J. 2001. Separation of biological molecules using mesoporous molecular sieves. *Microporous and Mesoporous Materials*. 44-45. 769-774.
- Kisler, J. M., Gee, M. L., Stevens, G. W., O'Connor, A. J. 2003. Comparative study of silylation methods to improve the stability of silicate MCM-41 in aqueous solutions. *Chemistry of Materials*. 15. 619-624.
- Lawrence, R., Lawrence, K. 2011. Antioxidant activity of garlic essential oil (*Allium Sativum*) grown on north Indians plains. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1. S51-S54.

- Lee, S. N., Kim, N. S., Lee, D. S. 2003. Comparative study of extraction techniques for determination of garlic flavor components by gas chromatography- mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 377 (4). 749-756.
- Lin, Q., Huang, Q., Li, Ch., Bao, Ch., Liu, Z., Li, F., Zhu, L. 2010. Anticancer Drug Release from a Mesoporous Silica Nanophotocage Regulated by Either a One- or Two- Photon Process. *Journal of the American Chemical Society*. 132 (31). 10645-10647.
- Lutterodt, H., Luther, M., Slavin, M., Yin, J. J., Parry, J., Gao, J. M., Yu, L. 2010. Fatty acid profile, thymoquinone content, oxidative stability, and antioxidant properties of cold-pressed black cumin seed oils. *LWT- Food Science and Technology*. 43. 1409-1413.
- Manzano, M., Aina, V., Areán, C. O., Balas, F., Cauda, V., Colilla, M., Delgado, M. R., Vallet-Regí, M. 2008. Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery: Effect of particle morphology and amine functionalization. *Chemical Engineering Journal*. 137. 30-37.
- Marquez-Alvarez, C., Sastre, E., Perez-Pariente, J. 2004. Solid catalysts for the synthesis of fatty esters of glycerol, polyglycerols and sorbitol from renewable resources. *Topics in Catalysis*. 27. 105–117.
- Mastelić, J., Jerković, I., Blažević, I., Poljak-Blaži, M., Borović, S., Ivančić-Baće, I., Smrečki, V., Žarković, N., Brčić-Kostić, K., Vikić-Topić, D., Müller, N. 2008. Comparative Study on the Antioxidant and Biological Activities of Carvacrol, Thymol, and Eugenol Derivates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56. 3989-3996.
- Melero, J. A., Iglesias, J., Morales, G. 2009. Heterogeneous acid catalysts for biodiesel production: current status and future challenges. *Green Chemistry*, 11. 1285–1308.
- Mittal, M., Gupta, N., Parashar, P., Mehra, V., Khatri, M. 2014. Phytochemical evaluation and pharmacological activity of *Syzygium aromaticum*: a comprehensive review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6 (8). 67-72.
- Moelans, D., Cool, P., Baeyens, J., Vansant, E. F. 2005. Immobilisation behaviour of biomolecules in mesoporous silica materials. *Catalysis Communications*. 6. 591-595.
- Nababu, E., Rifkind, J. M., Sesikeran, B., Lakshmaiah, N. 2010. Assessment of antioxidant activity of eugenol in vitro and in vivo. *Methods in molecular biology*. 610. 165-180.

National Center for Biotechnology Information. 2014. CID 16590. PubChem Compound Database.[cit. 2014-12-31]. Dostupné z

<<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16590#section=Top>>

Naveena, B. M., Muthukumar, A. R., Sen, A. R., Praveen Kumar, Y., Kiran, M. 2013. Use of cinnamaldehyde as a potencial antioxidant in ground spent hen meat. *Journal of Food Processing and Preservation*. 38. 1911-1917.

Park, S. Y., Barton, M., Pendleton, P., 2011. Mesoporous silica as a natural antimicrobial carrier. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 385. 256-261.

Peng, Ch., Zhao, S. Q., Zhang, J., Huang, G. Y., Chen, L. Y., Zhao, F. Y. 2014. Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustar (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation. *Food Chemistry*. 165. 560-568.

Popova, M., Szegedi, A., Mavrodinova, V., Novak Tušar, N., Mihály, J., Klébert, S., Benbassat, N., Yoncheva, K. 2014a. Preparation of resveratrol-loaded nanoporous silica materials with different structures. *Journal of Solid State Chemistry*. 219. 37-42.

Popova, M., Szegedi, A., Yoncheva, K., Konstatinov, S., Petrova, G. P., Aleksandrov, H. A., Vayssilov, G. N., Shestakova, P. 2014b. New method of delivery systém of poorly soluble drugs on the basis of functionalized mesoporous MCM-41 nanoparticles. *Microporous and Mesoporous Materials*. 198. 247-255.

Qu, Q., Zhou, G., Ding, Y., Feng, S., Gu, Z. 2014. Adjustment of the morphology of MCM-41 silica in basic solution. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 405(2014). 104-115.

Quiroga, P. R., Asensio, C. M., Nepote, V. 2014. Antioxidant effect of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

Raina, A. P., Negi, K. S. 2014. Chemical diversity among different accessions of *Origanum vulgare* L. spp. *vulgare* collected from Central Himalayan region of Uttarakhand, India. *Journal of Essential Oil Research*. 26 (6). 420-426.



- Ramadan, M. F. 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.
- Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A. J. M., Garrigós, M. C. 2014a. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT- Food Science and Technology*. 58. 470-477.
- Ramos, M., Jimenéz, A., Peltzer, M., Garrigós, M. C. 2012. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of Food Engineering*. 109 (3). 513-519.
- Ramos, M., Jimenéz, A., Peltzer, M., Garrigós, M. C. 2014b. Development of novel nano-biocomposite antioxidant films based on poly (lactic acid) and thymol for active packaging. *Food Chemistry*. 162. 149-155.
- Raouf, J. B., Chekin, F., Ehsani, V. 2015. Palladium-doped mesoporous silica SBA-15 modified on carbon-paste electrode as a sensitive voltammetric sensor for detection of oxalic acid. *Sensors and Actuators B:Chemical*. 207. 291-296.
- Rathouský, J., Zupalová, M., Zupal, A. 1997. Supramolekulární templátování: Nová strategie syntézy mezoporézních molekulových sít. *Chemické listy*. 91. 413-420.
- Razzino, C. A., Sgobbi, L. F., Canevari, T. C., Cancino, J., Machado, S. A. S. 2015. Sensitive determination of carbendazim on orange juice by electrode modified with hybrid material. *Food Chemistry*. 170. 360-365.
- Sadeghi, O., Tavassoli, N., Amini, M. M., Ebrahimzadeh, H., Daei, N. 2011. Pyridine-functionalized mesoporous silica as an adsorbent material for the determination of nickel and lead in vegetables grown in close proximity by electrothermal atomic adsorption spectroscopy. *Food Chemistry*. 127. 364-368.
- Safaei-Ghomi, J., Ebrahimabadi, A. H., Djafari-Bidgoli, Z., Batooli, H. 2009. GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chemistry*. 115 (4). 1524-1528.

Santos-Figueroa, L. E., Giménez, C., Agostini, A., Aznar, E., Marcos, D. M., Sancenón, F., Martínez-Mañez, R., Amorós, P. 2013. Selective and Sensitive Chromofluorogenic Detection of the Sulfite Anion in Water Using Hydrophobic Hybrid Organic-Inorganic Silica Nanoparticles. *Angewandte Chemie- International Edition*. 52 (51). 13712-13716.

Sávio, A. L. V., Silva, G. N., Salvadori, D. M. F. 2015. Inhibition of bladder cancer cell proliferation by allyl isothiocyanate (mustard essential oil). *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 771. 29-35.

Sezões, F., Ribeiro Carrott, M. L. L., Mourão, P. A. M., Russo, P. A., Carrott, P. J. M. 2010. Ordered Mesoporous Silica Materials for Protein Adsorption. *Materials Science Forum*. 636-637. 54-59.

Singh, G., Marimuthu, P., Heluani, C. S., Catalan, C. 2005. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85. 2297-2306.

Singh, G., Maurya, S., deLapasona, M. P., Catalan, C. A. N. 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*. 45. 1650-1661.

Solati, Z., Baharin, B. S., Bagheri, H. 2014. Antioxidant Property, Thymoquinone Content and Chemical Characteristics of Different Extracts from *Nigella sativa* L. Seeds. *Journal of the American Oil Chemists'Society*. 91. 295-300.

Srinivas, D., Satyarthi J. K. 2011. Biodiesel production from vegetable oils and animal fat over solid acid double-metal cyanide catalysts. *Catalysis Surveys from Asia*. 15. 145-160.

Suntres, Z., Coccimiglio, J., Alipour, M. 2015. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 55 (3). 304-318.

Suwalsky, M., Villena, F., Gallardo, M. J. 2015. In vitro protective effects of resveratrol against oxidative damage in human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1848 (1A). 76-82.

Wang, P. 2009. Multi-scale features in recent development of enzymic biocatalyst systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 152. 343-352.

- Wang, Y. W., Chen, Ch. T., Yin, J. J. 2010. Effect of allyl isothiocyanate on antioxidants and fruit decay of blueberries. *Food Chemistry*. 120. 199-204.
- Wang, Y., Zhao, Q., Han, N., Bai, L., Li, J., Liu, J., Che, E., Hu, L., Zhang, Q., Wang, S. 2014. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. xx. 1-15.
- Wei, Q., Xin, X. D., Du, B., Wu, D., Han, Y. Y., Zhao, Y. F., Cai, Y. Y., Li, R., Yang, M. H., Li, H. 2010. Electrochemical immunosensor for norethisterone based on signal amplification strategy of graphene sheets and multienzyme functionalized mesoporous silica nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 26. 723–729.
- Xie, W., Qi, C., Wang, H., Liu, Y. 2013. Phenylsulfonic acid functionalized mesoporous SBA-15 silica: A heterogeneous catalyst for removal of free fatty acids in vegetable oil. *Fuel Processing Technology*. 119. 98-104.
- Yadav, G. D., Lande, S. V. 2006. Selective Claisen rearrangement of allyl-2,4-di-*tert*-butylphenyl ether to 6-allyl-2,4-di-*tert*-butylphenol catalysed by heteropolyacid supported on hexagonal mesoporous silica. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 243. 31–39.
- Yang, X., He, D. 2010. Rapid determination of banned Sudan I in foodstuffs using a mesoporous SiO<sub>2</sub> modified electrode. *Journal of AOAC International*, 93. 1537–1541.
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., Raneva, V. G. 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*. 64. 59-66.
- Yi, L., Su, Q. 2013. Molecular mechanism for the anti-cancer effects of diallyl disulfide. *Food and Chemical Toxicology*. 57. 362-370.
- Yun, H. M., Ban, J. O., Park, K. R., Lee, Ch. K., Jeong H. S., Han, S. B., Hong, J. T. 2014. Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolated from garlic. *Pharmacology & Therapeutics*. 142 (2). 183-195.
- Zhang, Y. W., Tiwari, M. K., Jeya, M., Lee, J. K. 2011. Covalent immobilization of recombinant *Rhizobium etli* CFN42 xylitol dehydrogenase onto modified silica nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90. 499–507.

## 9 Seznam zkratek

AA- antioxidační aktivita

ADS- allyldisulfid

ADSSi- allyldisulfid vázaný na MCM-41

AITC- Allylithiokyanát

AITC- allylithiokyanát

AITCSi- allylithiokyanát vázaný na MCM-41

BCB-  $\beta$ -karoten bleaching test

BHA- butyl hydroxyanisol

BHT- butylhydroxytoluen

CAR- karvakrol

CARSi- karvakrol vázaný na MCM-41

CN- cinnamaldehyd

CNSi- cinnamaldehyd vázaný na MCM-41

DPPH- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EU- eugenol

EUSi- eugenol vázaný na MCM-41

EVA- ethylen vinyl acetát

GC- plynová chromatografie

HDL- lipoproteiny o vysoké hustotě (z ang. high density lipoproteins)

HMDS- hexamethyldisilazan

HSM- hexagonální mezoporézní křemičitý materiál

IC<sub>50</sub>- účinná-inhibiční koncentrace, která je potřebná pro redukci 50 % radikálu DPPH

IP- indukční perioda

LDL- lipoproteiny o nízké hustotě (z angl. low density lipoproteins)

LPDE- nízkohustotní polyethylen

MCF- mezostrukturované buněčné pěny

MCM-41- mobil crystalline materials No. 41

MCM-48- mobil crystalline materials No. 48

MKM- mezoporézní křemičité materiály

MS- hmotnostní spektrometrie

MSN- mezoporézních křemičitých nanočástic

MSU-X- Michigan State University

OA- šťavelová kyselina  
Pb/SBA-15- SBA-15 funkcionalizované palladiem  
PČ- peroxidové číslo  
PF- protekční faktor  
ReXDH- xylitol dehydrogenáza produkovaná rekombinantní bakterií *Rhizobium etli* CFN42  
RL-SBA-15- Rod-like SBA-15  
SBA-15- Santa Barbara amorphous type material  
SC-CO<sub>2</sub>- superkritická fluidní extrakci oxidem uhličitým  
SMPS- mezoporézní křemičité nosiče  
syn.- synonymum  
THL- thymol  
THLSi- thymol vázaný na MCM-41  
TLC- chromatografie na tenké vrstvě  
TQ- tymochinon  
TQSi- tymochinon vázaný na MCM-41  
TRAP- Total Radical-Trapping Antioxidant Parametr  
XDH- xylitol dehydrogenáza  
β-CD- β-cyklodextrinem

## 10 Seznam obrázků

Obrázek 1 Shrnutí vlivu množství ethanolu na morfologii křemičitého materiálu (Qu et al. 2014).....	18
Obrázek 2 Reakce antioxidantu (AH) s volnými radikály a s antioxidantovým radikálem a tvorba komplexů (Flora et al., 2012).....	21
Obrázek 3 Chemická struktura vybraných antioxidantů .....	30
Obrázek 4 Grafické stanovení indukční periody ze závislosti změny peroxidového čísla na čase .....	32

## 11 Seznam tabulek

Tabulka 1 Mezoporézní křemičité materiály jako katalyzátory (Bernardos and Kouřimská, 2013).....	12
Tabulka 2 Mezoporézní křemičité materiály jako sensory (Bernardos and Kouřimská, 2013).....	15
Tabulka 3 Kontrolované uvolňování bioaktivních látek (Bernardos and Kouřimská, 2013).....	17
Tabulka 4 IP a PF vzorků s antioxidantem (0,01 %) vázaným a nevázaným na MCM-41 .....	35
Tabulka 5 IP a PF vzorků s antioxidantem (0,02 %) vázaným a nevázaným na MCM-41 .....	36
Tabulka 6 IP a PF vzorků s antioxidantem (0,04 %) vázaným a nevázaným na MCM-41 .....	37
Tabulka 7 IP a PF vzorků s různým množstvím MCM-41 .....	37
Tabulka 8 IP a PF vzorků s antioxidantem (0,08 %) vázaným a nevázaným na MCM-41 .....	38
Tabulka 9 IP a PF eugenolu, BHA a MCM-41 v různé koncentraci (stanoveno na základě RZH).....	39
Tabulka 10 IP a PF eugenolu, BHA a MCM-41 v různé koncentraci (stanoveno na základě změny PČ) .....	39
Tabulka 11 IP a PF eugenolu vázaného a nevázaného na MCM-41 v různé koncentraci .....	40
Tabulka 12 IP a PF eugenolu vázaného a nevázaného na MCM-41 v různém množství .....	41
Tabulka 13 IP a PF tymochinonu vázaného a nevázaného na MCM-41 v různém množství ..	41
Tabulka 14 IP a PF karvakrolu vázaného a nevázaného na MCM-41 v různém množství.....	42
Tabulka 15 IP a PF syntetického BHA v množství 0,02 % hm. ....	42

## 12 Seznam grafů

Graf 1 Protekční faktory eugenolu .....	43
Graf 2 Protekční faktory tymochinonu .....	44
Graf 3 Protekční faktory karvakrolu .....	44
Graf 4 Průběh oxidace sádla s tymochinonem (0,02 %) .....	45
Graf 5 Průběh oxidace sádla s tymochinonem (0,04 %) .....	45
Graf 6 Průběh oxidace sádla s tymochinonem (0,08 %) .....	46
Graf 7 Průběh oxidace samotného sádla.....	46