VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANALÝZA AKTIVNÍCH LÁTEK OBSAŽENÝCH V EXTRAKTECH LEVANDULE A TYMIÁNU

ANALYSIS OF ACTIVE SUBSTANCES CONTAINED IN LAVENDER AND THYME EXTRACTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE — **Milada Vašíčková**
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**
SUPERVISOR

BRNO 2019

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání bakalářské práce

Číslo práce:	FCH-BAK1288/2017
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka:	**Milada Vašíčková**
Studijní program:	Chemie a technologie potravin
Studijní obor:	Potravinářská chemie
Vedoucí práce:	**Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**
Akademický rok:	2018/19

Název bakalářské práce:

Analýza aktivních látek obsažených v extraktech levandule a tymiánu

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

1) Zpracování literární rešerše na téma: Přehled obsahu aktivních látek levandule lékařské a tymiánu obecného včetně popisu jejich vlastností a možného využití v potravinářském průmyslu

2) Zpracování literární rešerše na téma: Možnosti stanovení aktivních látek v bylinných extraktech

3) Stanovení a vyhodnocení obsahu aktivních látek v extraktech levandule a tymiánu

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

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

Milada Vašíčková student(ka)	Ing. Petra Matoušková, Ph.D. vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce je zaměřena na aktivní látky obsažené v extraktech levandule lékařské a tymiánu obecného, zejména jejich možné antimikrobiální a antioxidační účinky. Teoretická část popisuje vybrané rostliny, sloučeniny vykazující antimikrobiální a antioxidační účinky, metody, jak tyto sloučeniny extrahovat a stanovit.

V praktické části byly nejprve připraveny extrakty zvolených bylin, vodné, ethanolové a olejové. Všechny extrakty byly spektrofotometricky charakterizovány na obsah celkových polyfenolů, celkových flavonoidů a antioxidační aktivitu. Na závěr bylo diskutováno jejich možné použití v potravinářském průmyslu namísto syntetických konzervantů a při fortifikaci potravin.

ABSTRACT

The presented bachelor thesis is focued on active substances contained in lavandula officinalis and common thyme extracts, mainly their possible antimicrobial and antioxidant effects. The theoretical part desrcibes chosen plants, compounds with antimicrobial and antioxidant effects, methods how to obtain and identify said compounds.

In the experimental part, aquenous, ethanolic and oil extracts were prepared. Mentioned extracts were spectrophotometrically characterised for total content of polyphenols, total content of flavonoids and antioxidant activity. In conclusion possible applications of extracts in food industry instead of synthetic preservatives and their fotification were discussed.

KLÍČOVÁ SLOVA

levandule, tymián, rostlinné extrakty, antimikrobiální aktivita, antioxidační aktivita

KEYWORDS

lavender, thyme, plant extracts, antimicrobial activity, antioxidant activity

VAŠÍČKOVÁ, Milada. *Analýza aktivních látek obsažených v extraktech levandule a tymiánu.* Brno, 2019. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. 49 s Vedoucí práce Ing. Petra Matoušková, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

…….

podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za veškerou pomoc, ochotu a cenné rady, které mi věnovala.

OBSAH

1 ÚVOD 7
2 TEORETICKÁ ČÁST 8
2.1 Aktivní látky bylin 8
2.1.1 Antimikrobiální látky 8
2.1.2 Antioxidační látky 8
2.2 Charakteristika aktivních látek 9
2.2.1 Polyfenolické sloučeniny 9
2.2.1.1 Fenolové kyseliny 9
2.2.1.2 Flavonoidy 9
2.2.1.3 Stilbeny 9
2.2.1.4 Lignany 9
2.2.2 Třísloviny (taniny) 10
2.2.3 Alkaloidy 11
2.2.4 Terpeny 11
2.3 Vybrané byliny 12
2.3.1 Levandule lékařská 12
2.3.2 Tymián obecný 13
2.4 Metody získávání extraktů 14
2.4.1 Konvenční metody 15
2.4.1.1 Extrakce v Soxhletově extraktoru 15
2.4.1.2 Macerace 15
2.4.1.3 Hydrodestilace 15
2.4.1.4 Odvar 15
2.4.1.5 Nálev 16
2.4.2 Nekonvenční metody 16
2.4.2.1 Ultrazvuková extrakce 16
2.4.2.2 Mikrovlnná extrakce 16
2.4.2.3 Extrakce nadkritickými tekutinami 16
2.4.2.4 Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem 16
2.4.2.5 Extrakce pulzním elektrickým polem 17
2.4.2.6 Enzymaticky asistovaná extrakce 17
2.5 Metody stanovení aktivních látek 17
2.5.1 Plynová chromatografie 18
2.5.1.1 Instrumentace plynové chromatografie 18
2.5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 18
2.5.2.1 Instrumentace HPLC 19

2.5.3 Tenkovrstvá chromatografie 19
2.5.4 Fytochemický screening 20
2.5.4.1 Stanovení alkaloidů 20
2.5.4.2 Stanovení flavonoidů 20
2.5.4.3 Stanovení fenolických sloučenin 20
2.5.4.4 Stanovení terpenoidů 20
2.5.4.5 Stanovení tříslovin 20
2.5.5 Spektrofotometrie 20
2.5.5.1 Molekulární absorpční spektrofotometrie v UV-VIS 21
2.6 Aplikace přírodních aktivních látek v potravinářském průmyslu 21
2.6.1 Využití antimikrobiální aktivity 21
2.6.2 Využití antioxidační aktivity 22
3 CÍLE PRÁCE 23
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 24
4.1 Použité chemikálie 24
4.2 Použité přístroje a pomůcky 24
4.3 Použité byliny 24
4.4 Příprava extraktů 25
4.4.1 Vodné a ethanolové extrakty 25
4.4.2 Olejové extrakty podle Soxhleta 25
4.5 Charakterizace extraktů 26
4.5.1 Stanovení celkových polyfenolů 26
4.5.2 Stanovení celkových flavonoidů 26
4.5.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity 27
5 VÝSLEDKY A DISKUZE 28
5.1 Charakterizace extraktů 28
5.1.1 Stanovení celkových polyfenolů 28
5.1.2 Stanovení celkových flavonoidů 32
5.1.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity 36
6 ZÁVĚR 41
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ 43
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 49

1 ÚVOD

S rostoucím zájmem společnosti o zdravější přístup k životu věnují lidé větší důraz na složení a původ potravin, kriticky nahlížejí na látky přidané, které mohou mít negativní vliv na zdraví. Stále větší pozornost se věnuje možnostem, které nabízí příroda, jsou člověku bližší a s rostoucí rezistencí mikroorganismů vůči antibiotikům také velice reálnou a obnovitelnou možností, jak s nimi bojovat. Neustále se objevují nové formy, ve kterých jsou látky nacházející se v přírodě využívány ve prospěch lidí.

Proto bylo jedním z cílů práce zjistit, zda by lidem známé byliny mohly sloužit jako konzervanty a antioxidanty potravin. V jaké formě by byly vhodné a nezávadné k aplikaci. Důležitá je také extrakce aktivních látek, čím účinnější extrakt, tím menší je potřebné množství a klesá tak i riziko možného podráždění či nežádoucí reakce. Pro použití přírodních látek ve velkém měřítku je důležitá i ekonomická náročnost extrakce, která s novodobými metodami klesá.

V této práci je věnována pozornost polyfenolickým látkám a flavonoidům, u kterých již byla prokázána antimikrobiální a antioxidační aktivita, cílem je tedy najít optimální formu, ve které by bylo možné extrakty používat.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Aktivní látky bylin

Lidstvo má dlouhou historii používání bylin a koření v každodenním životě. Ve starověkém Egyptě a Asii byly byliny a koření používány jako léčiva, ve starověkém Řecku a Římě jako konzervanty potravin. V průběhu středověku byly byliny nadále používány pro konzervaci potravin a léčení, dále pak pro ochucování jídel [1].

Protože je koření široce používáno v řadě potravin, je důležité znát, jaký má vliv na udržení jejich kvality. Mnoho studií bylo provedeno pro jeho baktericidní a bakteriostatické vlastnosti, jeho efektivitu v prevenci a zpomalení kažení způsobeného mikroorganismy. Pozornost je věnována i jejich schopnosti zpomalovat další druhy kažení, včetně žluknutí, způsobeného oxidací tuků. Byliny mají mnoho fytochemikálií, které jsou potencionálními zdroji přírodních antioxidantů, například fenolických diterpenů, flavonoidů, alkaloidů, třís lovin (taninů) a fenolických kyselin. Bylo experimentálně dokázáno, že koření, byliny a jejich extrakty mají antimikrobiální, antioxidační, protizánětlivé, antirevmatické, anti mutagenní, protirakovinné a tuky snižující vlastnosti [1][2].

2.1.1 Antimikrobiální látky

Antimikrobiální látky prodlužují údržnost potravin tím, že je brání útokům nežádoucích bakterií, používají se jako varianta namísto termických zákroků, které někdy mohou ovlivnit jejich organoleptické a nutriční vlastnosti. Tyto látky mění propustnost mikrobiálních buněčných membrán, a tím umožní uvolnění biomolekul z jejich buněk. Aditivní antimikrobiální látky mohou být rozděleny do čtyř skupin:

- kyseliny a jejich deriváty (kyselina benzoová, sorbová, parabeny)
- další organické látky (antibiotika, lysozym, bifenyl a jeho deriváty, thiabendazol, dialkyl-dikarbonáty, alkylenoxid)
- anorganické sloučeniny (oxid siřičitý a siřičitany, dusitany, chlorid sodný, kyselina boritá a její soli)
- přírodní antimikrobiální látky (isoflavony, stilbeny, terpenoidy, indoly) [11][12].

2.1.2 Antioxidační látky

Antioxidanty jsou látky schopné zpomalit, či zabránit žluknutí nebo jiné chuť ovlivňující oxidace. Antioxidanty prodlužují indukční čas, a tím oddalují vznik látek negativně ovlivňujících chuť. Přídavek antioxidantů po uplynutí indukčního času však nebývá účinný ve zpomalení žluknutí [13].

Antioxidanty mohou ovlivnit oxidaci dvěma způsoby, zhášením volných radikálů, tak se chovají antioxidanty primární. Sekundární antioxidanty používají řadu mechanismů, jako je vázání kovových iontů do komplexů, eliminace přítomného kyslíku, přeměny hydroxyperoxidů na neradikálové formy, absorbce UV radiace nebo deaktivace kyslíkového singletu. Sekundární antioxidanty projevují antioxidační aktivitu jen v přítomnosti další minoritní složky, například kyselina askorbová je efektivní v přítomnosti tokoferolů nebo jiného primárního antioxidantu [11][13].

Dalším možné dělení antioxidantů je podle jejich původu:

- Přírodní (extrakty bylin a koření, velmi časté jsou šalvěj a rozmarýn)
- Syntetické (butylhydroxyanisol, butylhydroxytoluen, 2-*terc*-butylhydrochinon, estery gallové kyseliny) [11].

2.2 Charakteristika aktivních látek

2.2.1 Polyfenolické sloučeniny

Rostliny mají téměř nekonečnou schopnost syntetizovat aromatické sloučeniny, z nichž je velká část fenolického charakteru. Většina z nich jsou sekundárními metabolity, v mnoha případech slouží jako obranný mechanismus proti mikroorganismům, radiaci a ultrafialovému záření. Polyfenolické sloučeniny vyskytující se v pletivu rostlin, se podílejí na zbarvení, chuti, vůni, kyselosti a oxidační stabilitě rostlin, samy jsou nenutriční. Polyfenoly mohou být rozděleny do skupin, podle počtu aromatických kruhů nebo podle struktury vazeb mezi těmito kruhy. Hlavními skupinami fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany [3][4][5][6].

2.2.1.1 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny nacházející se v potravinách, většinou ve vázané formě, se dělí do dvou skupin, jako deriváty kyseliny benzoové a kyseliny skořicové. Obecně je vyšší koncentrace derivátů kyseliny skořicové, výjimkou jsou červené ovocné plody a byliny, kdy je vyšší koncentrace derivátů kyseliny benzoové. Nejběžnějšími zástupci derivátů kyseliny skořicové jsou p-kumarová, kávová, ferulová a sinapová kyselina. Zástupci derivátů kyseliny benzoové jsou p-hydroxybenzoová, protokatechová, vanillová a syringová kyselina [4][7].

2.2.1.2 Flavonoidy

Flavonoidy se nacházejí uvnitř buněk rostlinného pletiva nebo na površích organel, mají strukturu skládající se ze dvou aromatických jader spojených třemi uhlíkatými atomy, které tvoří okysličený heterocyklus. Bylo identifikováno více než 4 000 jednotlivých flavonoidů, zodpovědných za zbarvení květů, plodů a listů. Projevují inhibující efekt vůči několika virům, včetně HIV. Podle charakteru heterocyklu se flavonoidy dělí do šesti kategorií:

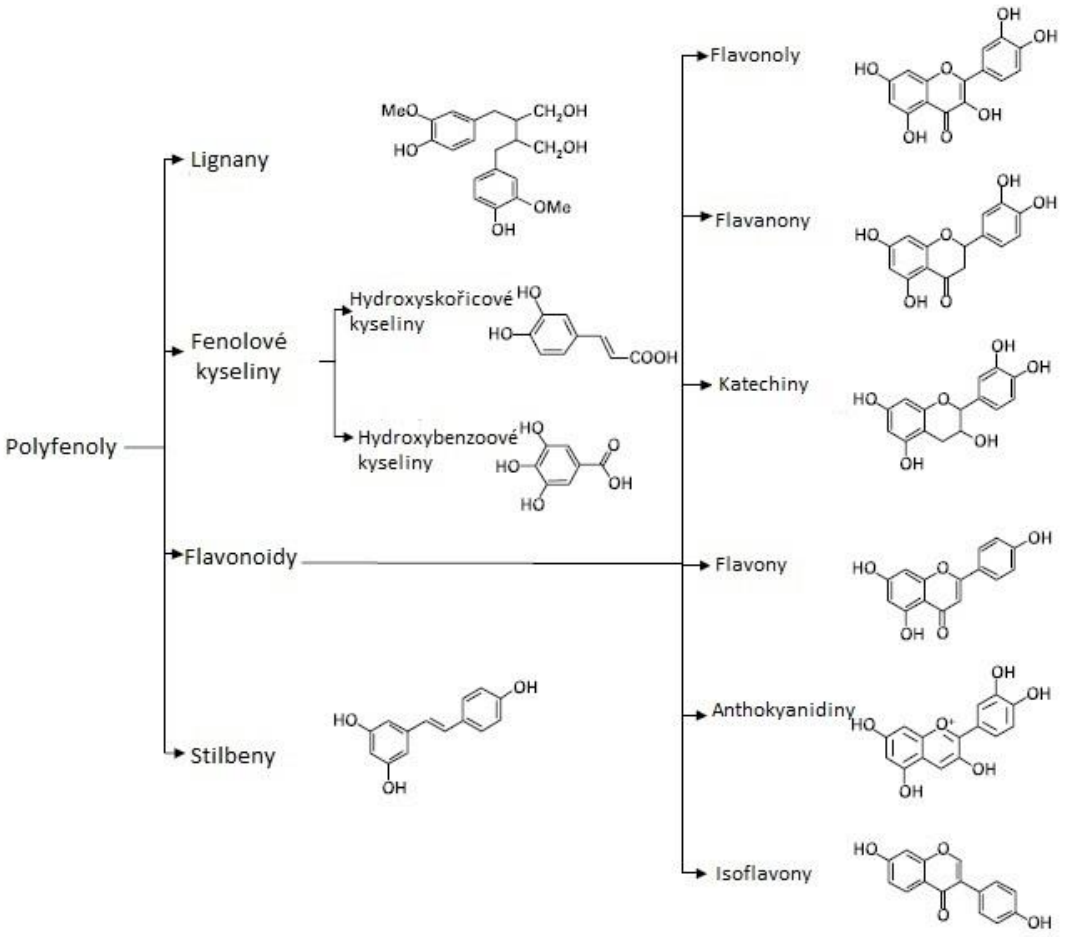
- flavonoly
- flavony
- flavanony
- katechiny
- anthokyanidiny
- isoflavony [3][4][6][8].

2.2.1.3 Stilbeny

Stilbeny obsahují 1,2-diarylethenové struktury. Jejich obsah v lidské stravě je nízký. V rostlinách jsou vytvářeny v reakci na infekci nebo útok. Resveratrol je jeden z nejzkoumanějších stilbenů, jeho hlavním zdrojem jsou hrozny a výrobky z nich. Stovky studií referují o schopnosti resveratolu předejít nebo zpomalit postup široké škály nemocí, včetně rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění [4][6][9].

2.2.1.4 Lignany

Lignany jsou charakteristické 1,4-diarylbutanovou strukturou, která vznikla dimerizací dvou zbytků kyseliny skořicové. Jsou obsaženy v ořeších, semenech, zrnech, zelenině, kávě, čaji, víně, nejvyšší koncentrace je ve lněném semínku [4][6][10].

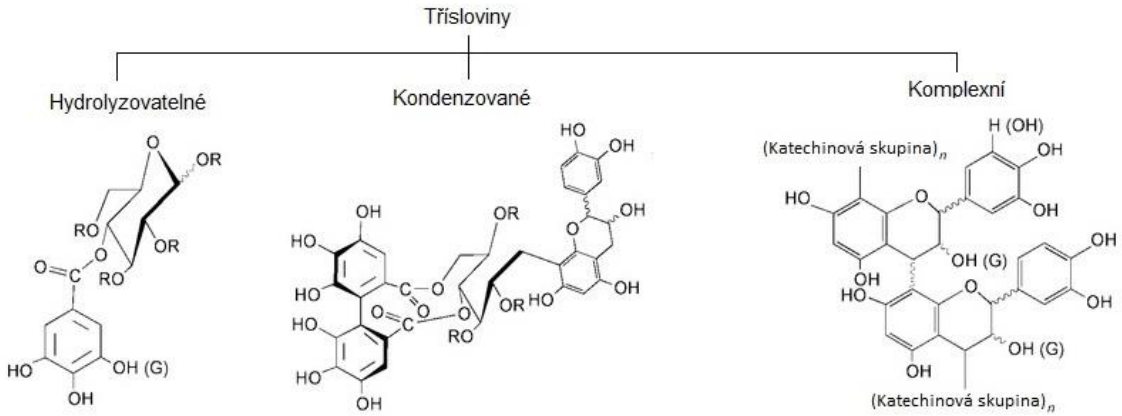


Obrázek 1: Klasifikace a chemická struktura hlavních skupin polyfenolů (upraveno) [6]

2.2.2 Třísloviny (taniny)

Taniny jsou skupina polymerních fenolických sloučenin vyskytujících se v široké škále rostlin. Ve vysokých koncentracích se nacházejí téměř ve všech částech rostlin, jako je kůra, dřevo, listy, plody, kořeny a semena. Jejich zvýšená produkce může být asociována s některými onemocněními, předpokládá se tedy, že jejich biologickou funkcí je ochrana proti infekcím, hmyzu nebo býložravcům. Jsou zodpovědné za trpkou chuť potravin, která je následkem jejich denaturační reakce s proteiny, obdobně reagují s enzymy. Tato inaktivační reakce je zodpovědná za antimikrobiální vlastnosti taninů. Třísloviny mohou být toxické pro vláknité houby, kvasinky a bakterie. Jsou schopné srážet těžké kovy a alkaloidy, kromě morfinu, proto mohou být použity při otravách těmito látkami. Používají se jako čiřidla při výrobě ovocných šťáv, vín a piva. Určité třísloviny jsou schopné selektivně inhibovat replikaci HIV. Dělí se do tří skupin:

- Hydrolyzovatelné (polymery esteru kyseliny gallové)
- Kondenzované (flavolany, polymery některých flavonoidních látek)
- Komplexní (kombinace hydrolyzovatelných a kondenzovaných taninů) [3][11][17][47].



Obrázek 2: Klasifikace a chemická struktura tříslovin (upraveno) [47]

2.2.3 Alkaloidy

Alkaloidy jsou heterocyklické dusíkaté sloučeniny, které vznikají jako sekundární metabolity a v závislosti na konzumovaném množství vykazují antimikrobiální a mikrobicidní účinky. Jsou skupinou zahrnující více než 10 000 sloučenin různých struktur. Některé jsou považovány za produkty detoxikace, regulátory růstu, rezervní formy dusíku, rostlinná antibiotika, přírodní toxické aminokyseliny, biogenní aminy a přírodní barviva [3][11].

Alkaloidy se nacházejí v různých částech cévnatých rostlin, ale také u určitých druhů mechů, hub, bakterií a některých bezobratlých živočichů a obratlovců [11].

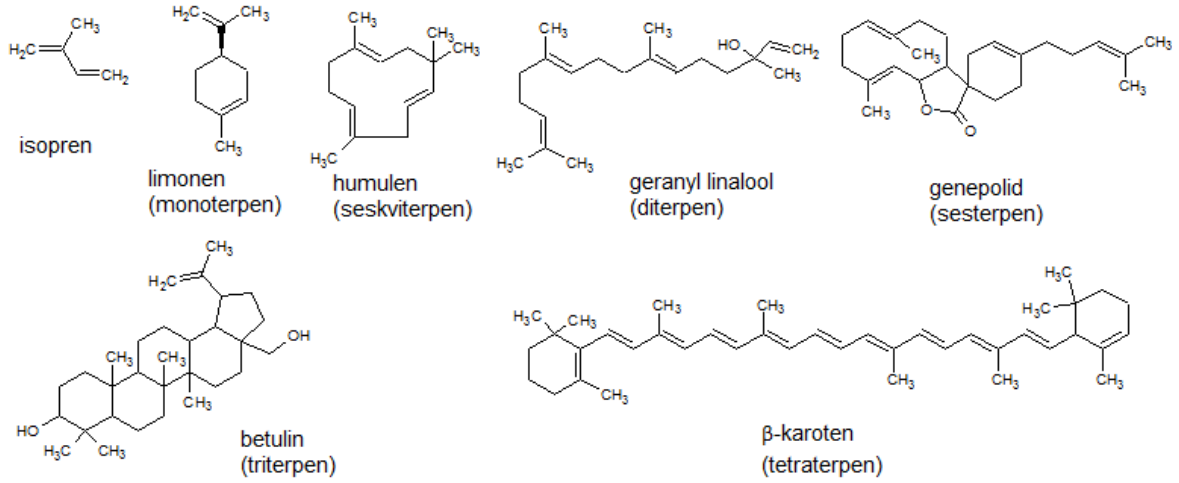
2.2.4 Terpeny

Terpeny se řadí k primárním vonným látkám, spolu s terpenoidy, estery, alkoholy, ethery, aldehydy, ketony, laktony, fenoly a fenolovými ethery tvoří esenciální oleje rostlin, které patří mezi sekundární metabolity. Jejich základní stavební jednotkou je isopren. Nejčastěji vyskytujícími jsou monoterpeny, seskviterpeny a diterpeny, které slouží jako stavební jednotky pro další metabolity jako jsou hormony, steroly, karotenoidy. Terpenoidy a isoprenoidy vznikají přesmykem nebo oxidací terpenů, obsahují tedy navíc atom kyslíku. Terpenoidy tvoří největší skupinu metabolitů v rostlinách a tvoří 90 % esenciálních olejů [11][14][15][16].

Terpeny a terpenoidy jsou aktivní proti bakteriím, houbám a virům, triterpenoidní kyselina betulinová inhibuje virus HIV. V rostlinách hrají roli atraktantů, repelentů, toxinů a antibiotik [3][15].

Dělí se podle počtu izoprenových jednotek:

- Hemiterpeny (C_5)
- Monoterpeny (C_{10})
- Seskviterpeny (C_{15})
- Diterpeny (C_{20})
- Sesterterpeny (C_{25})
- Triterpeny (C_{30})
- Tetraterpeny (C_{40})
- Polyterpeny (více než 40 atomů uhlíku v molekule) [11].



Obrázek 3: Chemické struktury skupin terpenů

2.3 Vybrané byliny

2.3.1 Levandule lékařská

Levandule lékařská (*Lavandula officinalis*), v evropských zemích běžně pěstovaná po staletí známá léčivá rostlina, již Římané ji používali pro její aromatické vlastnosti. Pochází z oblasti Středozemního moře, odkud se rozšířila po celém světě, mezi nejvýznamnější producenty patří Francie, Španělsko a Austrálie. Nať levandule je typická osobitou příjemnou vůní, na chuť je hořká a štiplavá. Levandule má řadu vlastností, působí proti plynatosti, migrénám, nespavosti, stresu, úzkosti, nachlazení a vyčerpání, ulevuje od svalových křečí, je antidepresivní, antiseptická, antibakteriální a stimuluje prokrvení [1][18][19].

Levandule je vytrvalý, bohatě rozvětvený polokeř. V dolní části větviček vyrůstají protistojné, přisedlé čárkovité až úzce kopinaté, bělavě plstnaté a na kraji podvinuté listy. Levandule je po staletí využívána jako bylinný lék. Obsahuje vysoce efektivní silice s velmi sladkým podtextem a může být použita v balzámech, parfémech, kosmetice [18][19][20].

Levandulový esenciální olej, také nazývaný jako silice se získává z květů *Lavandula angustifolia, Lavandula hybridia* a *Lavandula latifolia*, je hlavní aktivní složkou rostlinného materiálu a vyskytuje se v množství od 1,13 do 9,25 %. Levandulová silice je charakteristická obsahem linaloolu, linalyl acetátu, limonenu, α-pinenu, lavandulyl acetátu, terpinen-4-olu, (E)-ocimenu, (Z)-ocimenu, 3-oktanonu, lavandulolu, eukalyptolu neboli 1,8-cineolu, borneolu a kafru. Toto složení je ovšem zjednodušené, protože LEO se obvykle sestává z více než sta individuálních komponent, které se podílejí na jeho senzorických vlastnostech, složení LEO je ovlivněno druhem rostliny a prostředím, ve kterém roste [22][23][27].

Hlavními flavonoidy v listech levandule jsou flavonové glykosidy, konkrétně apigenin, luteolin. Ve květech se vyskytují anthokyanidinová barviva, která jsou strukturou založena na delfinidinu a malvidinu. Veškerá barviva bez výjimky obsahují zbytek p-kumarové kyseliny. Estery hydroxyskořicové kyseliny (m-kumarové) se běžně vyskytují v druzích levandule, jedná se o kyselinu rosmarinovou a chlorogenovou. Ester kávové kyseliny, který je v množství 1 μg toxický pro plísňový patogen *Cladosporium herbarum* byl v nízkém množství zaznamenán v levanduli lékařské [41].

Antimikrobiální aktivitu LEO nelze zcela přisoudit jedné určité látce, antivirová aktivita proti *Herpes simplex* byla prokázána díky linaloolu, linalool oxidu a linalool esteru, borneolu a eugenolu. Antioxidační aktivita levandule je spojována a obsahem linaloolu, fenolických sloučenin, jako jsou fenolové kyseliny, méně s flavonoidy a tanniny [27].

Obrázek 4: Levandule lékařská [21]

2.3.2 Tymián obecný

Tymián obecný (*Thymus vulgaris)*, také nazývaný jako mateřídouška obecná, je původně jihoevropskou rostlinou, kterou lze s úspěchem pěstovat i v našich podmínkách. Je aromatická, medonosná rostlina používaná v lidové medicíně odpradávna pro vykašlávání, pro antitusické a anthelmintické vlastnosti, proti broncholytice a nadýmání. Nať tymiánu má příjemnou vůni, zejména při rozemnutí, a osobitou chuť, která je lehce pálivá a nahořklá [19][24][28].

Tymián je vytrvalý, nízký, stálezelený keř dorůstající výšky 10–30 cm, který příjemně voní. Má protilehlé, šedo-zelené, aromatické listy, květy jsou světle fialové s chlupatým gladulárním kalichem [1][19][24][29].

Chemický charakter tymiánu je reprezentován dvěma hlavními skupinami sekundárních metabolitů, těkavým esenciálním olejem a polyfenoly, obsah těchto složek se liší podle vnitřních (sezónní a ontogenetické variace) a vnějších (půda, klima, světlo) faktorů. Esenciální olej je zodpovědný za typické aroma tymiánu, usušený rostlinný materiál obsahuje podle druhu 1–2,5 % TEO. Složení TEO je až z 50 % thymol, dále karvakrol, geraniol, p-cymen, α-pinen, linalool až 13 %, borneol až 15 %, 1,8-cineol, kamfen, limonen, α-tepineol, terpinen-4-ol, γ-terpinen, Kyselina rosmarinová je hlavním zástupcem třís lovin v tymiánu obecném, její množství se podle literatury pohybuje v rozmezí 0,15 a 4 %. Volné fenolové kyseliny jsou zastoupeny hlavně kávovou kyselinou, gentisovou kys., p-kumarovou kys., syringovou kys., ferulovou kys., a p-hydroxybenzoovou kyselinou. Mezi obsažené

flavonoidy patří apigenin, luteolin, 6-hydroxyluteolin, cirsilineol, 8-methoxycirsilineol, cirsimaritin, 5-desmethylnobiletin, 5-desmethylsinensetin, gardenin B, genkvanin, salvigenin, 7-methoxyluteolin,, sideritoflavone, thymonin, thymusin, xanthomikrol. Nejvýznamnějšími jsou apigenin a luteolin. Flavonoly a flavanony mají menší význam. Bifenyly tymiánu přilákaly pozornost pro svou antioxidační aktivitu a jako deodoranty.

Thymol, karvakrol a fenolické sloučeniny jsou zodpovědné za antimikrobiální vlastnosti, zejména proti bakteriálním patogenům. Antioxidační vlastnosti jsou přisuzovány fenolickým složkám [1][19][25][28][29][30].

Thymus vulgaris je polymorfní druh a v současnosti existuje 7 chemotypů, které jsou pojmenovány podle dominantního monoterpenu v esenciálním oleji, komerčně zajímavý je jen thymolový druh [29].

Obrázek 5: Tymián obecný [26]

2.4 Metody získávání extraktů

Efektivní extrakce a purifikace jsou kritické pro izolaci a aplikaci přírodních antimikrobiálních látek určených pro aplikaci spojenou s potravinami. Tyto sloučeniny byly extrahovány klasickými metodami, dokud nebyly nové a vysoce účinné metody přejaty v průmyslu. Nové metody mají mnoho výhod týkajících se extrakční doby, kvality a výtěžku. Chemické a termální zákroky extrakčních metod mohou ovlivnit výtěžek aktivních ingrediencí, nebo přirozených vlastností nebo mohou produkovat nebezpečné sloučeniny. Řada extrakčních metod byla vyvinuta pro získávání bioaktivních sloučenin s antimikrobiálními vlastnostmi, selektivita těchto metod je pro extrakci konkrétní sloučeniny nedostatečná. V současnosti je důraz kladen na minimální extrakty s vysokým antimikrobiálním efektem a na maximalizaci vlivu na zdraví konzumentů [12].

2.4.1 Konvenční metody

Většina těchto metod je založena na extrakční kapacitě rozpouštědla v kombinaci s teplem a/nebo mícháním. Polarita extrahované složky je nejdůležitějším faktorem pro volbu rozpouštědla, vliv pro volbu mají molekulární afinita rozpouštědla a extrahované směsi, přenos hmoty, výběr spolurozpouštědla, environmentální bezpečnost, toxicita pro člověka a finanční dostupnost. Pro tyto extrakční metody jsou používána organická rozpouštědla, jako jsou hexan, aceton, methanol, ethanol nebo voda a probíhají většinou za atmosférického tlaku [31][32][36].

2.4.1.1 Extrakce v Soxhletově extraktoru

Původně byla navrhnuta pro extrakci lipidů, v současnosti se používá pro extrakci cenných bioaktivních látek z řady přírodních zdrojů. Vzorek je navážen do patrony, která je umístěna v Soxhletově extraktoru, do patrony neustále kondenzuje rozpouštědlo a vymývá rozpustné komponenty ze vzorku. Rozpouštědlo obsahující analyty je vraceno do varné baňky, tento proces je opakovan do vyextrahování požadovaných komponent v dostatečném množství. Vzorek je vždy extrahován čistým rozpouštědlem, zatímco vyextrahované, netěkavé látky jsou koncentrovány ve varné baňce. Izolované látky musí být stabilní při teplotě varu extrakčního činidla [32][34].

2.4.1.2 Macerace

Macerace je stará, široce uplatnitelná a nízkonákladová technika. Fytochemikálie jsou extrahovány louhováním rostlinného materiálu v rozpouštědle po určitý čas. Jako první je rostlinný materiál rozmělněn, tím se zvětší plocha povrchu pro dobré mísení s rozpouštědlem. Po rozmělnění je přidáno rozpouštědlo, nádoba je uzavřena a ponechána při laboratorní teplotě stát minimálně tři dny s častým mícháním, někdy je použito třepací zařízení. Následně je směs scezena a vlhký materiál je lisován pro co nejvyšší výtěžek. Největší nevýhodou macerace je extrakční doba, která někdy může trvat i týdny [32][35].

2.4.1.3 Hydrodestilace

Hydrodestilace je tradiční metoda, která nevyužívá organických rozpouštědel. Existují tři typy, destilace vodou, destilace vodou a vodní parou, přímá destilace vodní párou. Při destilaci vodou je rostlinný materiál zcela ponořen ve vodě a celá směs je přivedena k varu. Úplná extrakce není možná a je nutné použít více aparatur. Při destilace vodou a vodní parou je pára generována mimo nebo v destilačním přístroji, vždy odděleně od rostlinného materiálu. Přímá destilace vodní parou generuje páru mimo aparaturu, pára je vstřikována do materiálu, ten tedy nedosáhne teploty vyšší než 100 °C, a neměl by podlehnout termální degradaci. Parní destilace je široce přijímaná metoda pro produkci esenciálních olejů ve velkém měřítku [32][35].

2.4.1.4 Odvar

Vhodná metoda pro extrakci tepelně stabilních složek rozpustných ve vodě. Rostlinný materiál je zalit specifickým množstvím destilované vody a přiveden k varu, tato směs se vaří po definovaný čas. Objem je zmenšen na jednu čtvrtinu původního objemu vařením v průběhu extrakce. Následuje ochlazení a filtrace koncentrovaného extraktu [32][35].

2.4.1.5 Nálev

Extrakce založena na máčení pevného rostlinného prášku ve studené nebo vařící vodě po krátkou dobu [32].

2.4.2 Nekonvenční metody

Nekonvenční metody se snaží snížit limitace tradičních metod, redukovat spotřebované množství energie, zkrátit extrakční dobu, použít alternativní rozpouštědla k drahým a vysoce čistým. Zajistit bezpečné a vysoce kvalitní extrakty [31][32][36].

2.4.2.1 Ultrazvuková extrakce

Ultrazvuk o frekvenci od 20 kHz do 2000 kHz je používán k rozrušení buněčných stěn rostlin, což pomáhá zlepšit prostupnost rozpouštědla do buněk a získat tak větší výtěžek. Pří ultrazvukové extrakci může být použita nízká provozní teplota, tím se udrží vysoká kvalita extraktů. Jedná se o jednoduchou metodu, protože většina laboratoří je vybavena ultrazvukovou lázní. Vzorek je smísen s vhodným rozpouštědlem a je aplikována ultrazvuková energie, po skončení extrakce je zbytek tuhého vzorku odstraněn filtrací nebo centrifugací [33][34][35].

V některých případech byla pozorována deteriorace aktivních složek extraktů vlivem ultrazvuku skrze tvorbu volných radikálů [35].

2.4.2.2 Mikrovlnná extrakce

Metoda používaná k extrakci rozpustných produktů do kapaliny aplikací mikrovlnné energie ve formě elektromagnetického záření při frekvencích od 300 MHz do 300 GHz, tyto elektromagnetické vlny se skládají z elektrického a magnetického pole. Mikrovlny pronikají do biomateriálu a generují teplo interakcí s polárními molekulami v materiálu. Hloubka pronikání mikrovln do rostlinné matrice závisí na relativní permitivitě, obsahu vlhkosti, teplotě, frekvenci elektrického pole. Absorpce mikrovlnné energie, za kterou je zodpovědná obsažená voda, vede k vnitřnímu přehřátí a narušení struktury buňky. Okolní extrakční činidlo může zůstat chladné, pokud je hodnota relativní permitivity nízká, je tedy možné použití pro tepelně citlivé sloučeniny [32][33].

2.4.2.3 Extrakce nadkritickými tekutinami

Nadkritické tekutiny se vyskytují při teplotě a tlaku vyšším, než je jejich kritická hodnota, tvoří přechod mezi plynem a kapalinou. Mají vysokou hustotu jako kapaliny, nízkou viskozitu jako plyny. Nejčastěji používaným rozpouštědlem je oxid uhličitý, který není drahý je bezpečný a dostupný, dále může být použit hexan, pentan, butan, oxid dusný. Oxid uhličitý je nepolární, neselektivní rozpouštědlo, jeho kapacita a selektivita mohou být upraveny přídavkem jiného rozpouštědla, jako je methanol nebo ethanol, které je po extrakci snadno odstraněno. Tato metoda je vhodná pro termicky labilní sloučeniny, protože probíhá za laboratorní teploty. Díky recyklaci nadkritické kapaliny je metoda šetrná k přírodnímu prostředí. Nevýhodou je vysoká cena oproti tradičním extrakčním metodám [31][32][34].

2.4.2.4 Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem

Nová extrakční technika užívající organická rozpouštědla za zvýšené teploty a tlaku, tím je proces rychlejší s nižší spotřebou rozpouštědla. Používanými rozpouštědly jsou methanol, acetonitril, aceton, hexan. Rozpouštědlo je vlivem tlaku udržováno v kapalném stavu při

teplotách nad atmosférickým bodem varu. Vyšší extrakční teplota zvyšuje rozpustnost a rychlost přenosu hmoty, také snižuje viskozitu a povrchové napětí rozpouštědla, zvyšuje tedy rychlost extrakce. Nízkou spotřebou rozpouštědla se řadí mezi zelené metody extrakce [31][34][36].

2.4.2.5 Extrakce pulzním elektrickým polem

Principem extrakce je zničení struktury membrány buňky. Elektrický potenciál projde skrze membránu buňky, zatímco je v elektrickém poli. Na základě dipólového charakteru molekul membrány je elektrický potenciál rozdělí podle jejich náboje, tím se drasticky zvýší permeabilita. Efektivita zcela závisí na parametrech procesu, včetně síly pole, specifického energetického vstupu, počtu pulsů, teploty a vlastnostech materiálu. PEF je schopná minimalizovat degradaci teplotně citlivých sloučenin, protože v jejím průběhu není potřeba vysoké teploty. Extrakci je možné použít i jako krok před konvenční extrakční metodou a snížit tak její náročnost [36].

2.4.2.6 Enzymaticky asistovaná extrakce

Některé fotochemikálie jsou v rostlinné matrici uloženy v buněčné cytoplazmě, některé jsou vázané v síti z polysacharidů a ligninu. Takto vázané sloučeniny je nemožné extrahovat klasickými metodami za použití rozpouštědla. Použití enzymů před konvenčními extrakcemi je považováno jako efektivní způsob k uvolnění vázaných sloučenin a zvýšení celkové výtěžnosti. Adice specifických enzymů v průběhu extrakce zvyšuje výtěžek rozbitím buněčných stěn a hydrolýzou strukturních polysacharidů a lipidů. EAE je považována za ekologicky přívětivou, protože k extrakci bioaktivních složek a olejů využívá vodu namísto organických rozpouštědel [36].

2.5 Metody stanovení aktivních látek

Sekundární metabolity se v rostlinách obvykle vyskytují v komplexních matricích o nízkých koncentracích. Pro separaci jednotlivých sloučenin se používají chromatografické a nechromatografické metody [32].

Chromatografické metody jsou separační metody využívající k dělení složek směsi mnohonásobného opakovaného vytváření rovnovážných stavů složek mezi dvěmi fyzikálně odlišnými fázemi. Jedna fáze je nepohyblivá (stacionární), druhá je pohyblivá (mobilní). Rovnovážné stavy se vytvářejí na základě různých fyzikálně – chemických interakcí mezi složkou a mobilní fází, složkou a stacionární fází, také mezi mobilní a stacionární fází. Může jít o adsorpci, rozpouštění, chemisorpci, srážení, tvorbu komplexů, sítový efekt, pro chromatografické separace je typické, že výsledná interakce je kombinací těchto procesů, často na jejich rozhraní. Podle převažujícího mechanismu interakcí rozlišujeme adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou permeační a afinitní chromatografii. Podle pohyblivé fáze rozlišujeme plynovou, kapalinovou a superkritická fluidní chromatografii. Chromatografické separace umožňují vedle separace komponent jejich současnou identifikaci a stanovení s použitím standardů. Chromatogram je záznam odezvy detektoru v čase, protože detektory poskytují odezvu úměrnou koncentraci analytu, jsou zóny separovaných látek procházejících detektorem zaznamenány jako píky neboli koncentrační profily s maximem [37][38].

Fytochemický screening je metoda, kdy pomocí chemických testů můžeme detekovat sekundární metabolity. Tyto testy jsou jednoduché, rychlé a nenákladné. Zkoumajícímu dají

rychlý přehled o druzích fotochemikálií obsažených v extraktu. Na základě výsledků těchto testů je možné spektrofotometricky stanovit celkové koncentrace skupin sekundárních metabolitů [32].

2.5.1 Plynová chromatografie

Metoda vhodná pro analýzu těkavých látek, i ve stopovém množství, které jsou převeditelné do plynné fáze. Analyzovaná směs je zplyněna a unášena plynnou mobilní fází kolonou. Složky vzorku jsou separovány na základě rozdílných interakcí se stacionární fází a postupně vymývány inertním nosným plynem [32][37].

2.5.1.1 Instrumentace plynové chromatografie

Zařízení se skládá ze zdroje nosného plynu (mobilní fáze), ten je veden přes redukční ventil do dávkovače, chromatografické kolony umístěné v termostatu kolon a detektoru [37][38].

2.5.1.1.1 Mobilní fáze, zdroje nosného plynu

Používá se inertní plyn, jeho úlohou je transportovat složky vzorku kolonou. Používají se vodík, dusík, helium, argon. Volba nosného plynu má vliv na separační účinnost [37].

2.5.1.1.2 *Injektory*

Slouží k dávkování vzorku a jeho převedení do plynného stavu, teplota injektoru tedy musí přesahovat teplotu varu nejméně těkavé analyzované složky alespoň o 50 °C. V případech vzorků obsahujících velké množství složek se používá dávkování s děličem toku, kdy se vzorek po odpaření a smíchání s nosným plynem rozdělí na dvě části, pro vlastní analýzu je použito obvykle 0,1 – 10 %, zbytek je oddělen do odpadu. Dávkování bez děliče se používá pro zředěné vzorky. Dávkování přímo do kolony se provádí u vzorků, jejichž složky se těsně nad bodem varu rozkládají. Dávkování s programově zvyšovanou teplotou vypařování vzorku minimalizuje diskriminaci složek podle bodů varu [37][38].

2.5.1.1.3 Kolony

Používají se náplňové nebo kapilární kolony. Kapilární kolony jsou skleněné, křemenné, plastové nebo kovové. Stacionární fáze je zakotvena na vnitřní straně kapiláry nebo je jí kapilára zaplněna. Náplňové kapiláry jsou kovové nebo skleněné trubice naplněné stacionární fází na bázi silikagelu, aktivního uhlí nebo molekulových sít [37][38].

2.5.1.1.4 Detektory

Detektory jsou zařízení reagující na změny složení protékající mobilní fáze, které převádí na elektricky měřitelné veličiny. V plynové chromatografii jsou používané detektory univerzální, použitelné pro detekci širokého spektra sloučenin nebo selektivní, které detekují sloučeniny z hlediska principu specifických vlastností [37][38].

2.5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

V současné době má v analytické chemii dominantní postavení. Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC – High Performace Liquid Chromatography) je dosahováno vysoké účinnosti separačního procesu použitím kolon naplněných stacionární fází o malé velikosti částic, které vytvářejí homogenní chromatografická lože. Vysoká hustota a homogenita

částic stacionární fáze je důvodem velkého hydrodynamického odporu, pro dosažení dostatečného průtoku mobilní fáze je nutno aplikovat přetlak [38].

2.5.2.1 Instrumentace HPLC

Zařízení se skládá ze zásobníku mobilní fáze, čerpadla mobilní fáze, dávkovacího ventilu, kolony a detektoru [38].

2.5.2.1.1 Čerpadlo mobilní fáze

Zajišťuje tok mobilní fáze v HPLC. Lineární čerpadlo se skládá z pístu, který se pohybuje v pracovním válci a vytlačuje z něj mobilní fázi. Reciproční čerpadlo, v současnosti nejčastěji používané, obsahuje píst ve válci, který periodicky nasává a vytlačuje mobilní fázi, je možné v průběhu měnit složení mobilní fáze [38].

2.5.2.1.2 Dávkovací zařízení

Přesně definovaný objem vzorku je nastříknut do proudu mobilní fáze protlačované kolonou pod velkým tlakem. Běžně se používá šesticestný ventil s dávkovací smyčkou definovaného objemu od 0,5 µl do 2 ml [38].

2.5.2.1.3 Kolony

Separační kolony pro HPLC musí odolat vysokému tlaku mobilní fáze, proto jsou většinou vyrobeny z ocelové nebo tlustostěnné skleněné trubice. Kolony jsou naplněny stacionární fází, obvykle oxidem křemičitým o vhodné zrnitosti, který je chemicky modifikován navázáním vhodných funkčních skupin [38].

2.5.2.1.4 Detektory

K detekci se využívá mnoha instrumentálních metod, na rozdíl od speciálních detektorů v plynovém chromatografu. Nejběžněji používaný je fotometrický detektor, který umožňuje sledovat absorbanci látek vystupujících z chromatografické kolony. Přes kyvetu prochází paprsek ze zdroje na disperzní mřížku a vhodný detektor dopadajícího záření. Fluorimetrický detektor je vhodný pro látky vykazující fluorescenci. Hmotnostní detektor umožňuje přímou identifikaci jednotlivých separovaných látek vycházejících z kolony [38].

2.5.3 Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC – Thin Layer Chromatography) je planárním druhem chromatografie, dochází k adsorpci vlivem interakcí mezi povrchem pevné fáze v tenké vrstvě a složkami ve směsi roztoku. Rozhodují jsou různé adsorpční koeficienty látek v rozdělované směsi [37][38].

Chromatogram se vyvíjí při průchodu směsi rozpouštědel různé polarity, rozpouštědla se testují od nejméně polárních k nejpolárnějším. Stacionární fáze je tvořena tenkou vrstvou silikagelu, mikrocelulózy, polyamidu nebo oxidu hlinitého o vhodné zrnitosti na skleněné desce. Často se využívají komerčně dostupné varianty, které mají nalévanou vrstvu silikagelu, celulózy nebo oxidu hlinitého na hliníkové fólii. Zpravidla se používá vzestupná varianta vyvíjení, protože má větší rozlišovací schopnost a snadno dochází k odměšování rozpouštědel ze směsi. TLC umožňuje rychlý a jednoduchý test organických látek, příměsí, nečistot. Nevýhodou TLC je nízká citlivost a špatná detekce stopových složek [32][37][38].

2.5.4 Fytochemický screening

2.5.4.1 Stanovení alkaloidů

Extrakt je rozpuštěn v kyselině chlorovodíkové o nízké koncentraci, k roztoku je přidáno činidlo. Pro Wagnerovo činidlo je pozitivním výsledkem červenohnědá sraženina, pro Mayerovo činidlo žlutavě bílá sraženina, pro Bouchardat a Dragendorffovo činidlo červenooranžová sraženina [39].

2.5.4.2 Stanovení flavonoidů

Shinodův test, ethanolový extrakt je smíchán s koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a kouskem pevného hořčíku, v přítomnosti flavonoidů se vytvoří oranžové až červené zbarvení.

Smícháním hydroxidu sodného s extraktem rozpuštěném v isopropylalkoholu se vytvoří žlutočervené zbarvení v přítomnosti flavonů, kávově oranžové pro flavonoly, purpurově červené pro chalkony, modré pro anthokyanidiny [39].

Žluté zbarvení po smíchání extraktu s hydroxidem sodným znamená přítomnost flavonoidů [40].

2.5.4.3 Stanovení fenolických sloučenin

Extrakt smíchaný s destilovanou vodou a chloridem železitým vytvoří modré nebo zelené zbarvení [40].

2.5.4.4 Stanovení terpenoidů

Chloroformový extrakt je smíchán s koncentrovanou kyselinou sírovou, vytvoří se dvě fáze, hnědé zbarvení znamená přítomnost terpenoidů [39].

Anhydrid kyseliny octové s koncentrovanou kyselinou sírovou a extraktem vytvoří v přítomnosti triterpenoidů zelené zbarvení [40].

2.5.4.5 Stanovení tříslovin

Vodný extrakt je smíchán s chloridem železitým, v přítomnosti tříslovin se vytvoří modročerná sraženina.

Smícháním extraktu s hydroxidem draselným se v přítomnosti tříslovin vytvoří špinavě bílá sraženina [40].

2.5.5 Spektrofotometrie

Pro kvantitativní stanovení aktivních látek existuje řada ověřených metod, stanovení celkových polyfenolů lze provést reakcí s Folin-Ciocalteuovým činidlem, celkový obsah alkaloidů s bromkresolovou zelení, celkový obsah flavonoidů je možné určit reakcí s chloridem hlinitým, obsah tříslovin lze určit Folin-Denisovou metodou. Všechny zmíněné metody podléhají Bouguer-Lambert-Bearovu zákonu, měří se absorbance záření molekulami a obsah látek se pomocí kalibrační křivky standardu převádí na koncentraci miligram na 1 gram rostliny [37][48][49][50].

2.5.5.1 Molekulární absorpční spektrofotometrie v UV-VIS

Optická metoda probíhající ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra (200–780 nm) související s absorpcí záření a přechodem elektronu mezi energetickými hladinami v molekule, nejprve je částice excitována do vyšších hladin energie a následně navrácena na nižší hladinu energie. UV-VIS spektrofotometrie se řídí Bouguer-Lambert-Beerovým zákonem, který vyjadřuje vztah mezi intenzitou dopadajícího a prošlého záření, délkou absorbující vrstvy a koncentrací analytu. B.L.B. platí pro zředěné roztoky a přísně monochromatické záření [37].

Spektrofotometr se skládá ze zdroje záření, kterým může být wolframová nebo deuteriová lampa. Ze zdroje záření pokračuje přes monochromátor, který šířkou štěrbiny určuje spektrální interval. Monochromatické záření prochází vzorkem ve skleněné kyvetě o známé délce do detektoru, kterým může být fotobuňka, fotonásobič, Si-fotodioda. Detektor má mít vysokou citlivost, vysoký poměr signál ku šumu a konstantní odezvu pro široký obor vlnových délek. Počítač se speciálním softwarem převede signál z detektoru [37].

2.6 Aplikace přírodních aktivních látek v potravinářském průmyslu

Potraviny přirozeně podléhají kažení a vyžadují tak ochranu, během výroby, skladování a distribuce, aby bylo dosáhnuto požadované trvanlivosti. Potraviny mohou být kontaminovány bakteriemi a houbami, tyto mikroorganismy mohou způsobit nežádoucí reakce, které kazí chuť, vůni, barvu, senzorické a texturní vlastnosti, některé mikroorganismy mohou způsobit onemocnění. K prevence růstu mikroorganismů způsobujících kažení a patogenních mikroorganismů se využívá řada technik, jako je nasolování, okyselení, sušení a tepelné zákroky, velká snaha je věnována naleznutí přírodních alternativ těchto zákroků, k tomu přispívá i velký zájem konzumentů [42].

2.6.1 Využití antimikrobiální aktivity

Přírodní antimikrobiální látky by měly ideálně splňovat několik kritérií, široký záběr, baktericidní a fungicidní vlastnosti namísto pouhé mikrobiální inhibice, měly by být aktivní i při nízkých koncentracích, tepelně stabilní, neovlivnitelné hodnotou pH, neovlivnit barvu ani chuť, nebýt toxické, snadno změřitelné, nebýt náchylné k rezistenci kontaminanty a měly by být cenově dostupné. K inhibici růstu nežádoucích organismů mohou být antimikrobiální látky přidány přímo do potravin, aplikovány na povrch nebo zakomponovány do obalového materiálu. Přímá aplikace do potraviny znamená okamžitý, ale krátkodobý účinek v redukci bakteriální populace, zatímco film těchto látek na povrchu může být aktivní po delší časový interval, aktivní obaly jsou jedny z nejrelevantnějších možností přístupu ke zlepšení ochrany a prodloužení trvanlivosti potravin. Aktivní obaly jsou schopné antimikrobiální, případně antioxidační látky uvolňovat do potravin během uchovávání. [42][43][44].

Hlavními přírodními sloučeninami jsou esenciální oleje rostlin, enzymy živočišného původu (lysozym), bakteriociny mikrobiálního původu (nisin), organické kyseliny (sorbová) a přirozeně se vyskytující polymery (chitosan). Esenciální oleje rostlin získávají mnoho pozornosti, protože jsou uznány jako bezpečné a jejich aktivní složky mají široké spektrum antimikrobiální aktivity. Antimikrobiální aktivita esenciálních olejů je kvůli jejich struktuře, zejména díky hydrofilním funkčním skupinám na fenolických sloučeninách anebo lipofilnosti některých složek. Esenciální oleje jsou účinnější v inhibici gram-pozitivních než gram-negativních bakterií, používají se k prodloužení trvanlivosti masa, ryb, mléčných výrobků, zeleniny, rýže, ovoce. Thymol a karvakrol, oba jsou obsaženy v TEO, jsou jedny

z nejvýznamnějších aktivních látek esenciálních olejů, thymol působí proti druhům *Salmonella, Escherichia, pseudomonas, Listeria, Bacillus*. Při použití LEO na mleté hovězí maso byla prokázána efektivní ochrana proti růstu *Escherichia coli* a ještě vyšší účinnost proti *S. aureus*, pro některá použití je vhodnější použít LEO jako inkorporovanou část filmu. Použitím LEO na sklizeň byla prokázána efektivní kontrola plísňové infekce, potencionální původců bílé a šedé plísně by mohly významně snížit ztrátu sklizených potravin [42][43][44][45][46].

Limitujícím faktorem při použití esenciálních olejů, jak přímo na potravinu, tak jako bioaktivní film, je jejich vliv na senzorické vlastnosti ošetřené potraviny, vysoká těkavost a lipofilní charakter. Enkapsulace je možnost, jak zvýšit rozpustnost esenciálních olejů ve vodných roztocích [51][52].

2.6.2 Využití antioxidační aktivity

Antioxidanty v potravinách slouží k zabránění změny chuti vlivem oxidace tuků, tedy zastavují peroxidaci ve fázi iniciace nebo propagace. Antioxidanty se nejhojněji používají při uchovávání masa, olejů, smažených pokrmů, dresingů, mléčných produktů, pečiva a extrudovaných potravin [43].

Polyfenolické sloučeniny jsou jedny z nejzajímavějších přírodních sloučenin pro jejich vysokou antioxidační kapacitu a jejich vliv na lidské zdraví. Díky jejich vysoké účinnosti v konzervaci potravin a přijatelnosti od veřejnosti je žádoucí aplikovat je v potravinářství. Mohou být přidávány jako kompaktní extrakt nebo lze po purifikaci přidávat do potravin pouze individuální nejaktivnější molekuly [43].

Thymol obsažený v TEO má antioxidační účinky, také zvyšuje antioxidační aktivitu endogenních antioxidačních enzymů, byly provedeny studie navrhující možnost použití proti oxidativnímu zhoršení lipidů oxidací, je také možné použít jej do aktivních obalů jako antioxidační agent [45].

Přítomnost antioxidantů udržuje kvalitu potravin po delší dobu, LEO použitý na mletém hovězím mase snížil oxidaci lipidů, ale také prodloužil udržitelnost vůně o tři dny [46].

Přídavek esenciálních olejů do olejů prokazatelně zlepšuje oxidativní a termální stabilitu, zároveň prodlužuje použitelnost při smažení, i při 200 °C [51].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem práce je získání přehledu o obsahu aktivních látek v extraktech levandule lékařské a tymiánu obecného pro jejich potenciální aplikace při fortifikaci potravinářských výrobků.

V rámci práce byly řešeny dílčí úkoly:

1. Zpracování rešerše zaměřené na aktivní látky levandule lékařské a tymiánu obecného
2. Zpracování rešerše o možnostech extrakce a stanovení aktivních látek
3. Příprava a charakterizace extraktů levandule lékařské a tymiánu obecného

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Ethanol, LachNer (Česká republika)
Folin-Ciocalteau činidlo, Penta (Česká republika)
Chlorid hlinitý hexahydrát, LachNer (Česká republika)
Hydroxid sodný, LachNer (Česká republika)
Uhličitan sodný, LachNer (Česká republika)
Dusitan sodný, LachNer (Česká republika)
Ethanol pro UV/VIS, Penta (Česká republika)
ABTS, Sigma-Aldrich (Německo)
Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (Německo)
Katechin, Sigma-Aldrich (Německo)
Trolox, Sigma-Aldrich (Německo)
n-hexan, Penta (Česká republika)

4.2 Použité přístroje a pomůcky

Spektrofotometr, Implen (Německo)
Předvážky, Ohaus (USA)
Analytické váhy, Boeco (Německo)
Extrakční zařízení, Soxtherm (Německo)
Rotační vakuová odparka, Heidolph (Německo)
Automatické pipety v různém rozsahu objemu, Discovery (Německo), Sartorius (Německo)

4.3 Použité byliny

Vybranými bylinami byly levandule lékařská, použit byl její sušený květ a tymián obecný, nať.

Obrázek 6: Použitý materiál

4.4 Příprava extraktů

4.4.1 Vodné a ethanolové extrakty

Do zkumavek bylo odváženo po 1 g vzorku. Navážka byla louhována v roztocích, jejichž složení je popsáno v tabulce 1. Byly připraveny dvě varianty extraktů, louhované po dobu 15 minut a po dobu 24 hodin. Vzniklé extrakty byly zfiltrovány přes filtrační papír Whatman.

Tabulka 1: Roztoky pro přípravu vodných a ethanolových extraktů

EtOH [ml]	H_2O [ml]
0	10
2	8
4	6
6	4
8	2
10	0

4.4.2 Olejové extrakty podle Soxhleta

Extrakční celulózové patrony byly naplněny 5 g bylin a umístěny do extrakčních zkumavek. Zkumavky byly po rysku naplněny hexanem a umístěny do přístroje. Extrakty z extrakčních zkumavek byly převedeny do varných baněk s kulatým dnem a odpařeny v rotační vakuové odparce při 40 °C. Vyextrahované oleje byly převedeny do zvážených vialek s víčkem a před měřením rozpuštěny ve 4 ml ethanolu.

Tabulka 2: Parametry Soxhletova extraktoru

Teplota extrakce:	170 °C
Maximální teplota:	200 °C
Délka horké extrakce:	1 hodina a 30 minut
Redukční interval	3 minuty a 30 sekund
Redukční pulz	3 sekundy
Odpařovací čas	1 hodina
Celková doba extrakce:	3 hodiny a 4 minuty

Obrázek 7: Extrakce podle Soxhleta v automatickém extraktoru

4.5 Charakterizace extraktů

4.5.1 Stanovení celkových polyfenolů

Do zkumavek bylo napipetováno vždy 1 ml zředěného Folin-Ciocaltauova činidla, 1 ml destilované vody a 50 µl extraktu vzorku. Roztoky ve zkumavkách byly promíchány a nechány 5 minut stát, poté byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného a vzorky byly opět dobře promíchány. Po 15 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm proti blanku, kde byla místo vzorku extraktu přidána destilovaná voda. Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních.

Pro kalibrační křivku byl použit stejný postup, místo vzorku byl použit roztok kyseliny gallové o koncentracích v rozmezí 0,1–0,7 mg/ml.

4.5.2 Stanovení celkových flavonoidů

Do zkumavek bylo napipetováno vždy 0,5 ml extraktu vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného. Roztok byl promíchán a nechán 5 minut stát. Poté bylo přidáno 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého, obsah byl opět promíchán a ponechán 5 minut stát. Bylo přidáno 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody, obsah byl promíchán a ponechán 15 minut stát, následně byla změřena absorbance proti blanku, kde byla namísto vzorku pipetována destilovaná voda, při vlnové délce 510 nm. Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních.

Pro kalibrační křivku byl použit stejný postup, místo vzorku byl použit roztok katechinu rozpuštěný v ethanolu o koncentracích v rozmezí 0,05–0,3 mg/ml.

4.5.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity

ABTS byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci 7 mmol/l. Radikálový kationt se z ABTS získá reakcí s 2,45 mmol/l peroxosíranem draselným. Roztok byl ponechán za laboratorní teploty ve tmě déle než 12 hodin. Zásobní roztok ABTS•+ byl zředěn ethanolem na absorbanci přibližně 0,7 při vlnové délce 734 nm.

Do zúžené kyvety byl napipetován 1 ml zředěného ABTS•+ a 10 µl destilované vody, byla změřena absorbance (A0). Do další kyvety byl napipetován 1 ml zředěného ABTS•+ a 10 µl extraktu vzorku, kyveta byla uchována ve tmě. V čase 10 minut byla změřena absorbance (A10). Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních.

Pro kalibrační křivku byl použit roztok Troloxu, připravený rozpuštěním standardního roztoku v 60% ethanolu, v koncentracích od 50–400 µg/ml.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

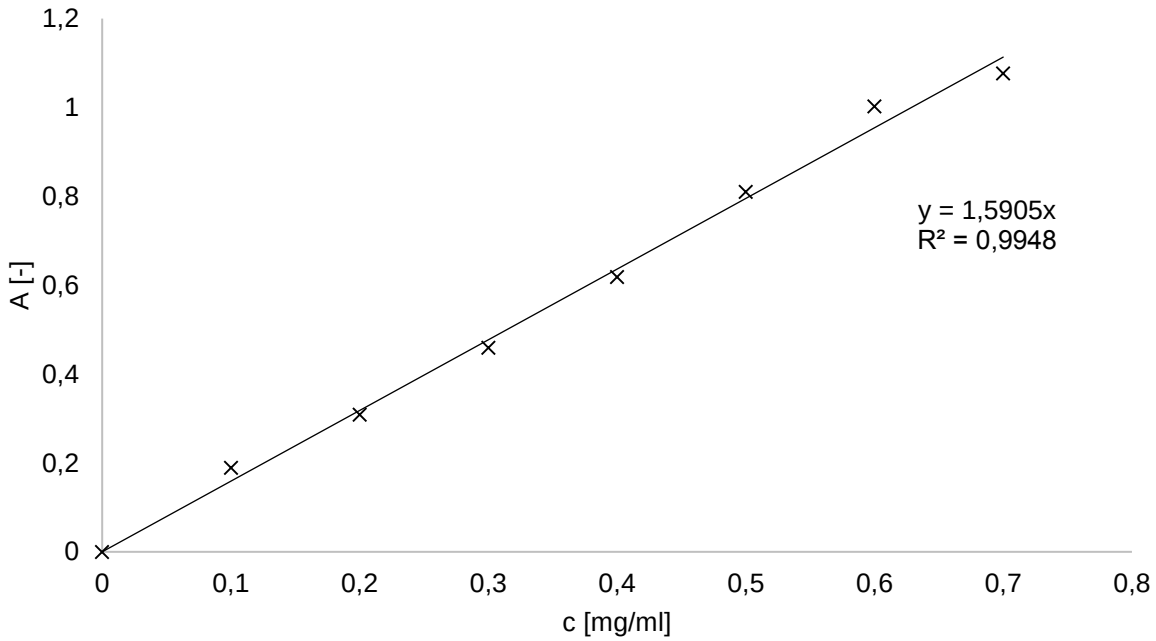
Předložená bakalářská práce byla zaměřena na aktivní látky bylin a možnosti jejich využití v potravinářství. Byly připraveny extrakty z květů levandule lékařské a natě tymiánu obecného, extrakty byly charakterizovány podle jejich obsahu polyfenolů, flavonoidů a antioxidační aktivity.

5.1 Charakterizace extraktů

Extrakty byly připraveny dle postupů uvedených v kapitole 4.4 a charakterizovány na obsah celkových polyfenolů, celkových flavonoidů a antioxidační aktivity podle návodů uvedených v kapitole 4.5.

5.1.1 Stanovení celkových polyfenolů

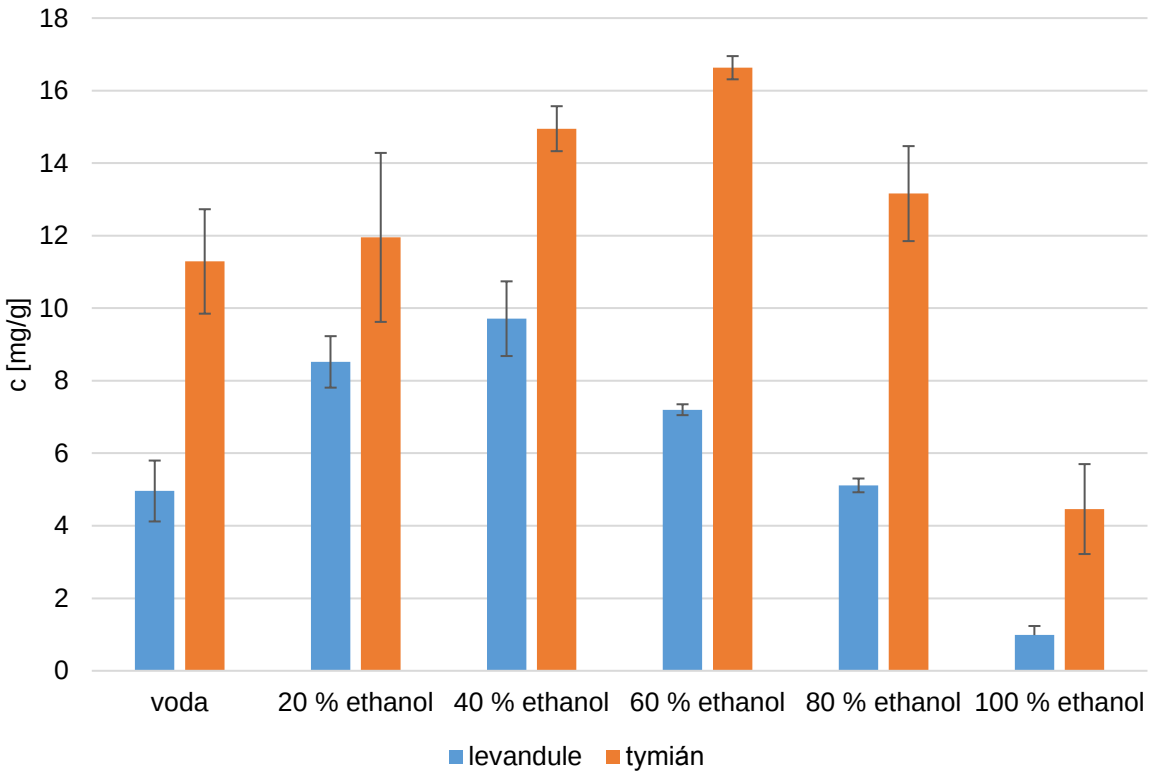
Obsah celkových polyfenolů v extraktech byl spektrofotometricky stanoven podle postupu popsaného v kapitole 4.5.1. Pomocí rovnice lineární regrese z grafu kalibrační křivky kyseliny gallové (Obrázek 8) byla vypočtena celková koncentrace polyfenolů v jednotlivých extraktech a přepočtena na miligramy polyfenolů na gram rostliny. V tabulce 3 jsou uvedené vypočtené koncentrace v extraktech, přičemž každý z extraktů byl analyzován ve třech opakováních a výsledkem je tak průměrná hodnota a směrodatná odchylka.



Obrázek 8: Kalibrační křivka kyseliny gallové

Tabulka 3: Výsledné koncentrace polyfenolů v extraktech

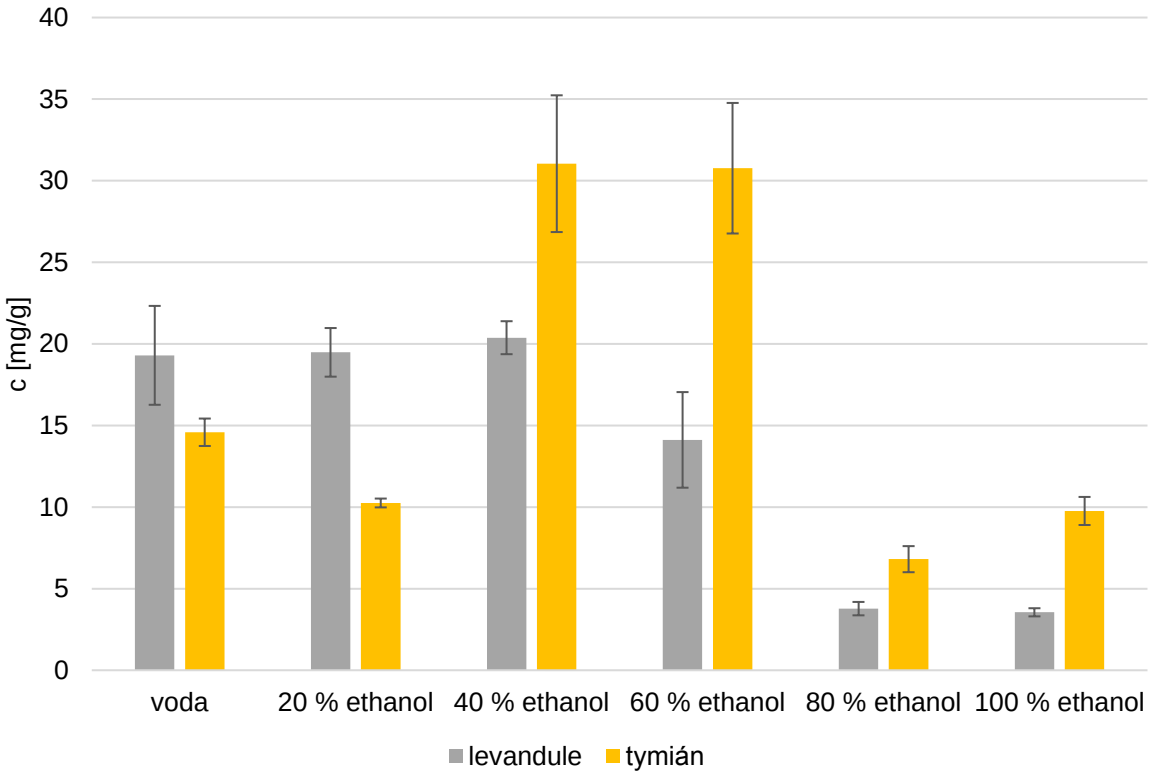
	Levandule lékařská	Tymián obecný
Extrakt	c [mg/g]	c [mg/g]
vodný 15 minut	4,96±0,84	11,29±1,44
20 % ethanol 15 minut	8,52±0,71	11,95±2,33
40 % ethanol 15 minut	9,71±1,03	14,95±0,62
60 % ethanol 15 minut	7,20±0,15	16,63±0,32
80 % ethanol 15 minut	5,11±0,19	13,16±1,31
100 % ethanol 15 minut	0,99±0,25	4,46±1,24
vodný 24 hodin	19,30±3,03	14,58±0,84
20 % ethanol 24 hodin	19,48±1,49	10,25±0,27
40 % ethanol 24 hodin	20,38±1,01	31,05±4,19
60 % ethanol 24 hodin	14,12±2,93	30,77±4,00
80 % ethanol 24 hodin	3,78±0,41	6,81±0,80
100 % ethanol 24 hodin	3,55±0,25	9,76±0,86
olejový	11,17±0,63	21,83±0,91



Obrázek 9: Obsah celkových polyfenolů v extraktech – 15 minutové výluhy

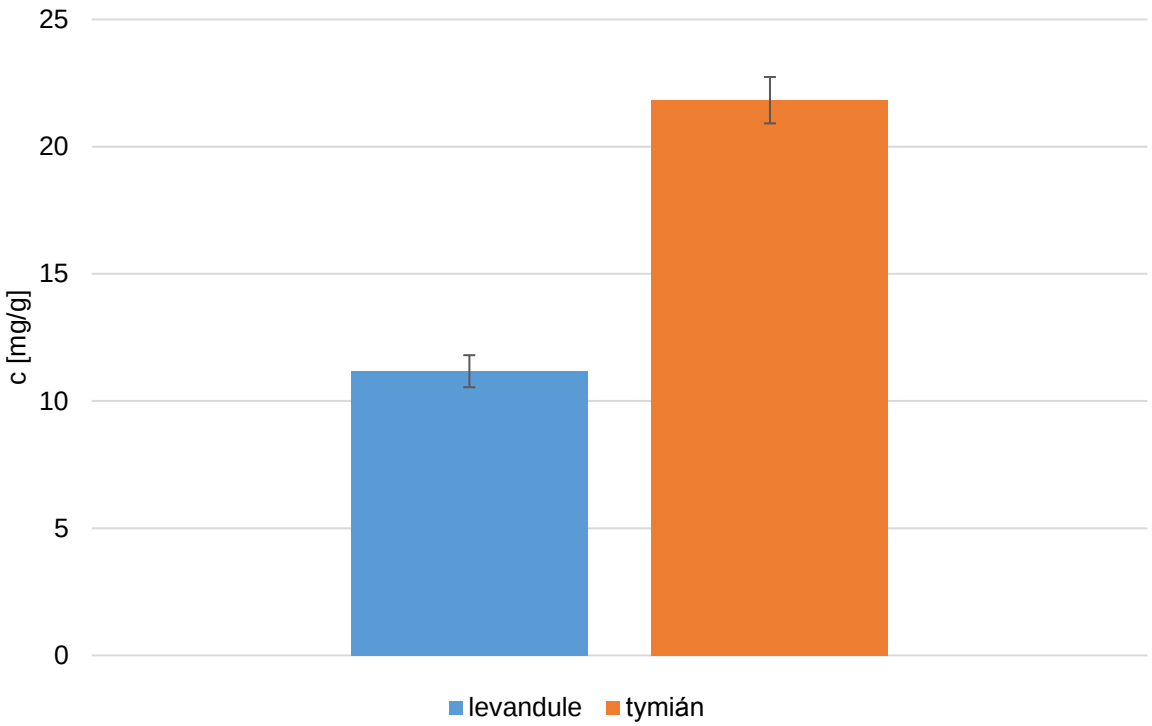
Z grafu (Obrázek 9) je možné vyčíst, že vyšší koncentrace polyfenolů byla v případě 15 minutových výluhů v extraktech připravených z tymiánu. V některých případech, jako například u extraktu připraveného pomocí 60% ethanolu byla koncentrace polyfenolů u tymiánu v porovnání s levandulí více než dvojnásobná, stejně tak tomu bylo i u extraktu obsahujícím 100% ethanol, nebo u vodného extraktu. Nejvíce polyfenolů bylo detekováno u tymiánového extraktu o obsahu 60 % ethanolu, 16,63±0,32 mg/g. Polyfenolické látky

levandule byly nejlépe vyextrahovány v 40% roztoku ethanolu, 9,71±1,03 mg/g. Nejhorším extrakčním činidlem s nejnižším obsahem polyfenolů byl pro obě bylinky 100% ethanol (levandule 0,99±0,25 mg/g, tymián 4,46±1,24 mg/g).



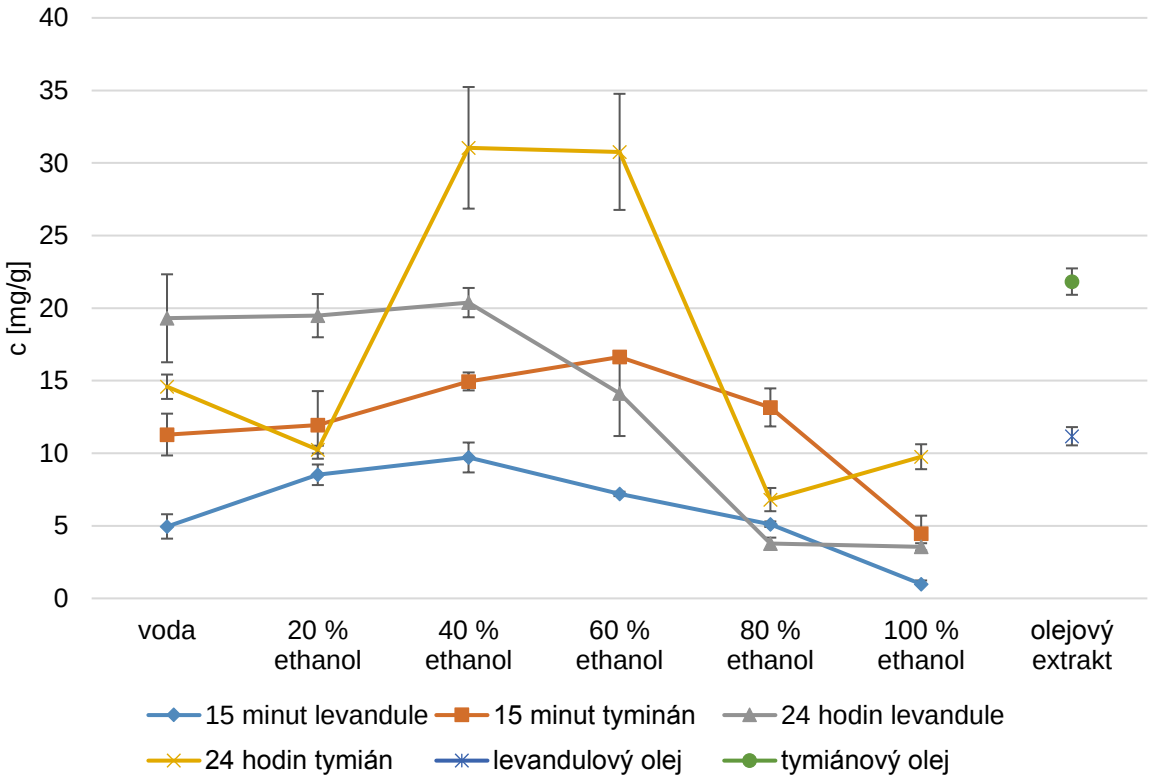
Obrázek 10: Obsah celkových polyfenolů v extraktech – 24hodinové výluhy

Z grafu (Obrázek 10) je viditelné, že v případě 24 hodinových výluhů byl nejvyšší obsah polyfenolů stanoven v extraktu tymiánu při koncentraci ethanolu 40 %, tedy 31,05±4,19 mg/g, těsně následuje tymiánový extrakt s 60 % ethanolu s 30,77±4,00 mg/g. Nejvyšší koncentraci polyfenolů z levandulových extraktů obsahoval také 40% ethanolový extrakt 20,38±1,01 mg/g. Nejlepším extrakčním činidlem pro extrakci po dobu 24 hodin byl tak stanoven 40% ethanol. Nejnižší koncentrace polyfenolů u levandulového extraktu byla detekována pro 100% ethanol 3,55±0,25 mg/g, pro tymián to byl extrakt s 80°% ethanolu, 6,81±0,80 mg/g.



Obrázek 11: Obsah celkových polyfenolů v extraktech – olejové extrakty

Z grafu (Obrázek 11) pro obsah polyfenolů v olejových extraktech je zřetelně viditelné, že vyšší koncentraci, téměř dvojnásobnou, vykazoval tymiánový extrakt s koncentrací celkových polyfenolů 21,83±0,91 mg/g.

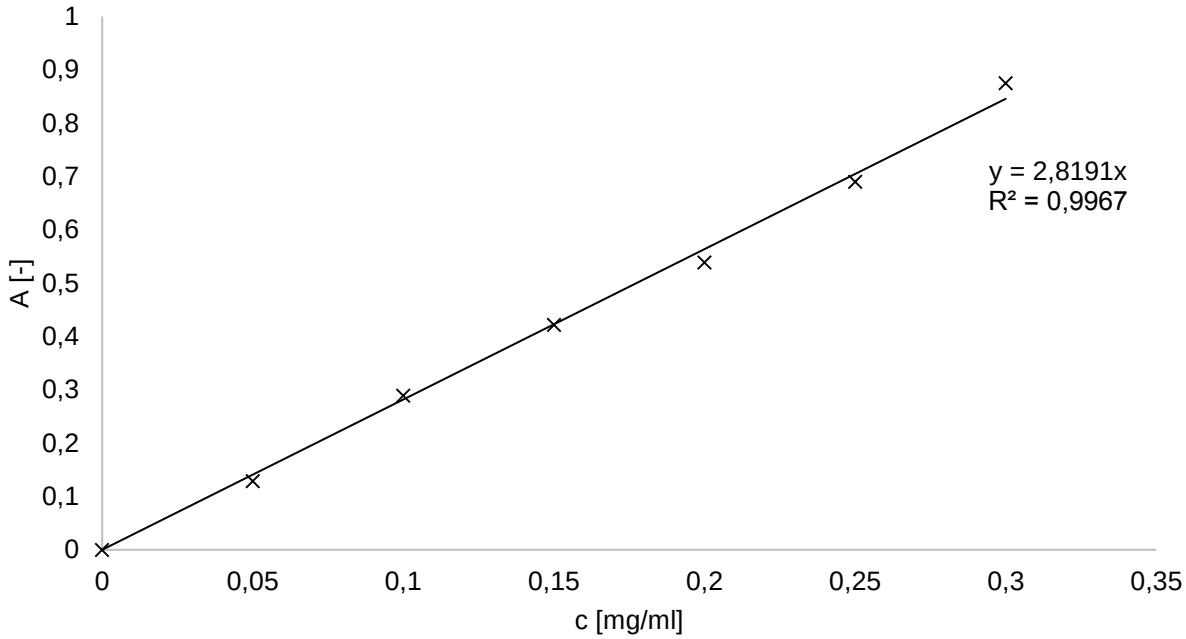


Obrázek 12: Srovnání obsahu celkových polyfenolů v extraktech

Podle grafu (Obrázek 12) srovnávajícím všechny připravené extrakty z hlediska koncentrace polyfenolů je možné pozorovat, že nejvyšší koncentrací disponovaly tymiánové extrakty, které byly louhovány 24 hodin v 40% a 60% ethanolovém roztoku, nutné ale podotknout, že u těchto extraktů byly zaznamenány výraznější rozdíly u vzorků v tripletu a vykazují tak větší chybu měření. Dalším nejvýnosnějším extraktem byl olejový extrakt z tymiánu. Naopak nejméně výnosné pro extrakci polyfenolů byly extrakty levandule připravené 15 minutovým louhováním, až na extrakt připravený v 80% ethanolu u nich totiž byla detekována jednoznačně nejnižší koncentrace polyfenolů. Pro izolace aktivních látek z levandule byla jako nejvhodnější stanovena 24 hodinová extrakce do vodného rozpouštědla, případně do ethanolového roztoku s koncentrací do 40 %. Díky velmi dobrému obsahu celkových polyfenolů je však velmi dobře využitelný i levandulový olejový extrakt (11,17±0,63 mg/g).

5.1.2 Stanovení celkových flavonoidů

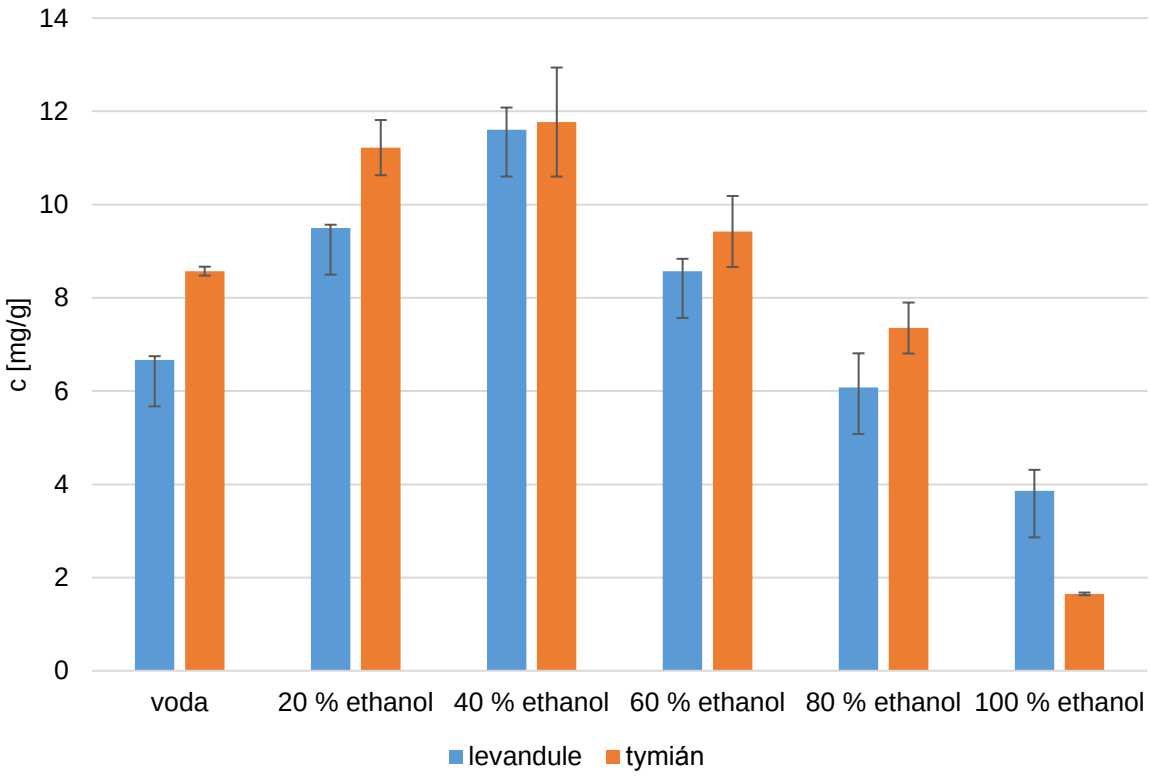
Obsah celkových flavonoidů v extraktech byl spektrofotometricky stanoven podle postupu popsaného v kapitole 4.4.2. Pomocí rovnice lineární regrese z grafu kalibrační křivky katchinu (Obrázek 13) byla vypočtena celková koncentrace flavonoidů v jednotlivých extraktech a přepočtena na miligramy flavonoidů na gram rostliny. V tabulce 4 jsou uvedené vypočtené koncentrace v extraktech, přičemž každý z extraktů byl analyzován ve třech opakováních a výsledkem je tak průměrná hodnota a směrodatná odchylka.



Obrázek 13: Kalibrační křivka katechinu

Tabulka 4: Výsledné koncentrace flavonoidů v extraktech

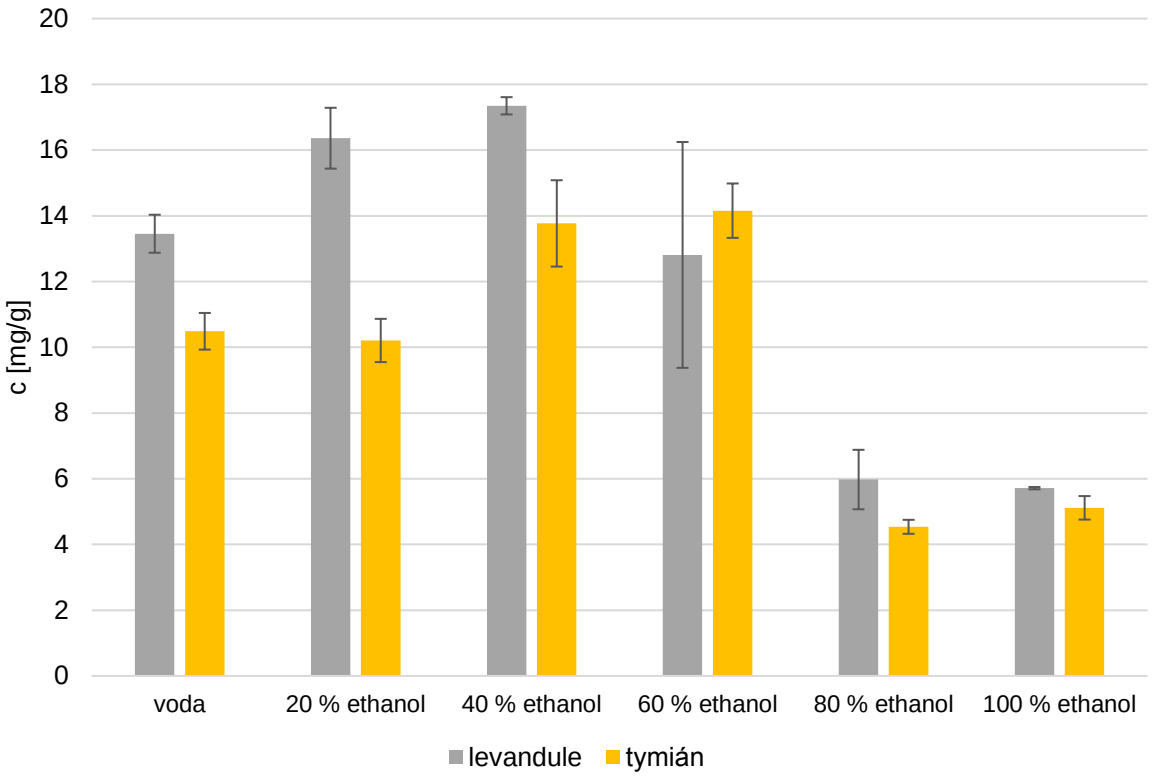
	Levandule lékařská	Tymián obecný
Extrakt	c [mg/g]	c [mg/g]
vodný 15 minut	6,67±0,08	8,57±0,10
20 % ethanol 15 minut	9,50±0,07	11,22±0,59
40 % ethanol 15 minut	11,60±0,48	11,77±1,17
60 % ethanol 15 minut	8,57±0,27	9,42±0,76
80 % ethanol 15 minut	6,08±0,73	7,35±0,55
100 % ethanol 15 minut	3,86±0,45	1,65±0,03
vodný 24 hodin	13,45±0,58	10,49±0,66
20 % ethanol 24 hodin	16,36±0,93	10,21±0,66
40 % ethanol 24 hodin	17,35±0,26	13,77±1,31
60 % ethanol 24 hodin	12,81±3,44	14,16±0,83
80 % ethanol 24 hodin	5,97±0,90	4,54±0,21
100 % ethanol 24 hodin	5,71±0,03	5,11±0,36
olejový	20,07±3,22	26,90±0,79



Obrázek 14: Obsah celkových flavonoidů v extraktech – 15 minutové extrakty

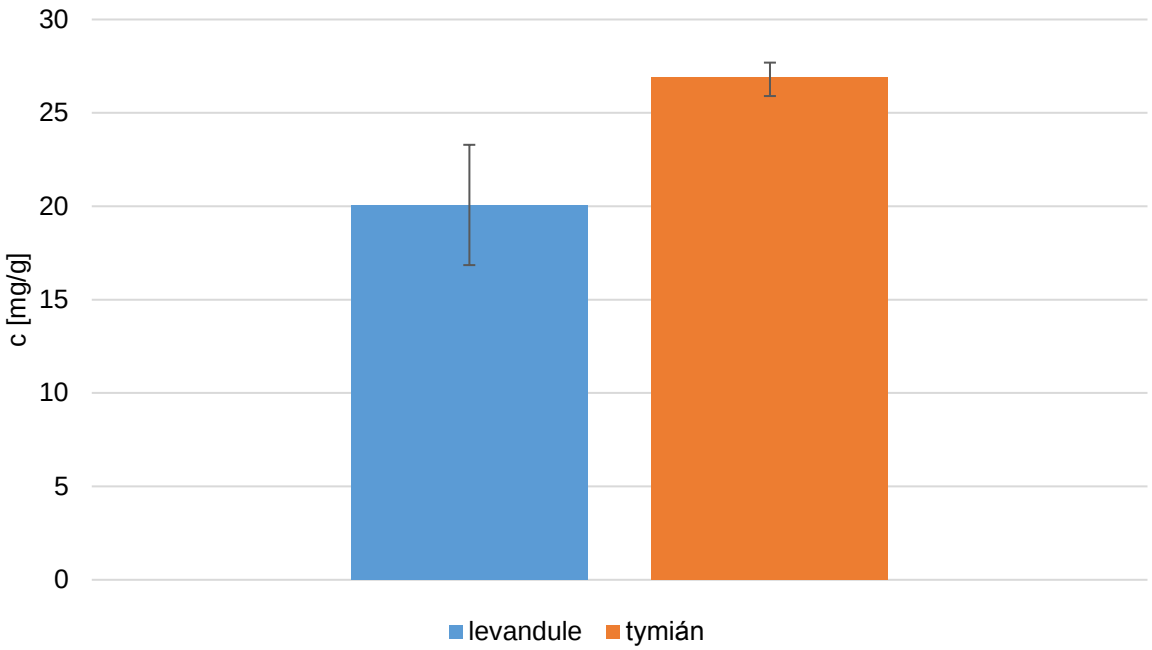
Podle grafu (Obrázek 14) zobrazujícího výsledky obsahu celkových flavonoidů u 15 minutových výluhů můžeme určit, že na flavonoidy nejbohatší extrakty byly připravené pomocí 40% ethanolu, a to jak pro levanduli s koncentrací 11,60±0,48 mg/g, tak tymián s°11,77±1,17 mg/g. Nejlépe byly flavonoidy extrahovány v roztocích s nižšími koncentracemi ethanolu, s maximem při 40 %, se vzrůstající koncentrací ethanolu dále obsah vyextrahovaných flavonoidů klesal. Tento trend byl pozorován u obou testovaných bylin.

Celkově nejnižší koncentrace flavonoidů tak byla určena v extraktech v 100% ethanolu, levandulový extrakt obsahoval 3,86±0,45 mg/g a tymiánový 1,65±0,03 mg/g, koncentrace v tomto extraktu tymiánu byla v porovnání s levandulí více než poloviční. U ostatních extraktů byl naopak v porovnání s levandulí vždy vyšší obsah flavonoidů stanoven ve vzorcích tymiánu.



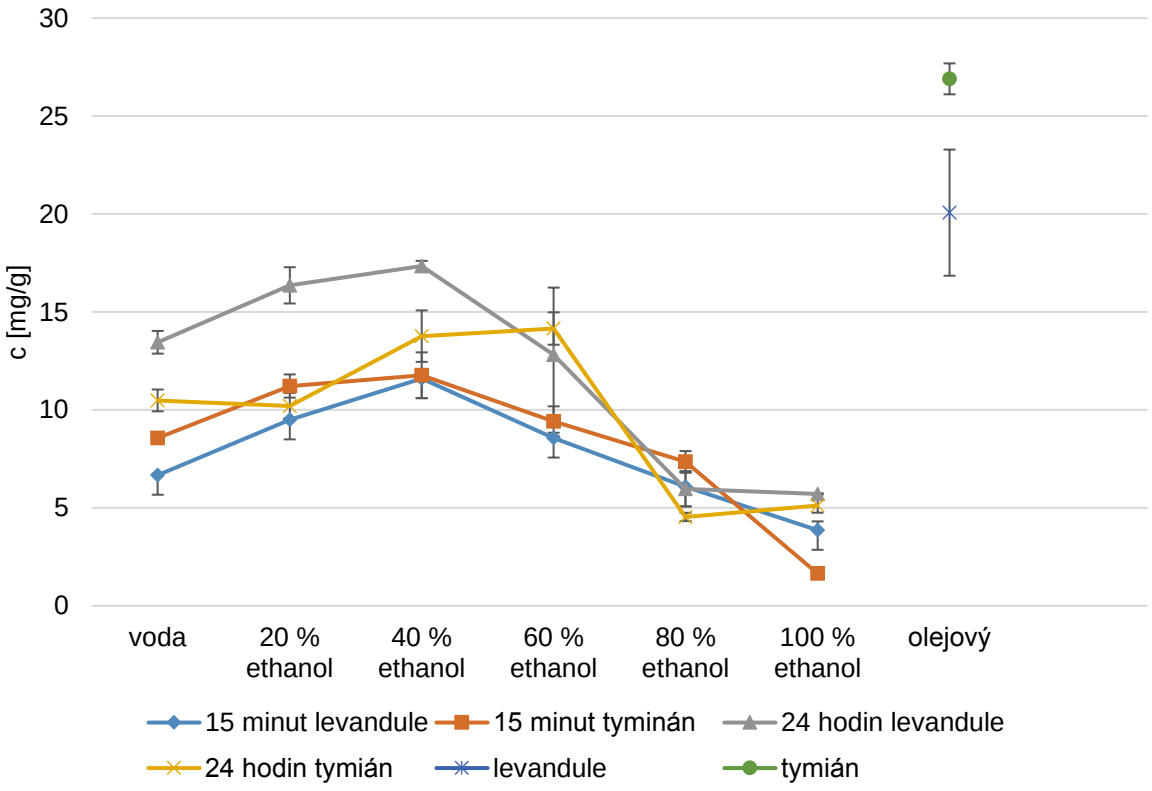
Obrázek 15: Obsah celkových flavonoidů v extraktech – 24 hodinové výluhy

Podle grafu (Obrázek 15) lze určit, že nejvyšší obsah celkových flavonoidů byl u 24 hodinových výluhů pro levandulové extrakty stanoven při koncentraci ethanolu 40 %, 17,35±0,26 mg/g. Pro tymián byl nejvyšší obsah flavonoidů detekován v extraktu s 60 % ethanolu tedy 14,16±0,83 mg/g. Naopak nejnižší koncentrace flavonoidů byly zaznamenány v extraktech s koncentracemi ethanolu 80 a 100 %. Obecně byl pak vyšší obsah flavonoidů naměřen v levandulových extraktech Z hlediska použité koncentrace ethanolu byly stejně jako v předchozím případě u 15 minutových výluhů nejvýnosnějšími roztoky s nižší koncentrací ethanolu, přesněji s koncentrací do 40%.



Obrázek 16: Obsah celkových flavonoidů v extraktech – olejové extrakty

V grafu (Obrázek 16) jsou porovnány obsahy flavonoidů v olejových extraktech, vyšší koncentrace byla stanovena v tymiánovém extraktu 26,90±0,79 mg/g, v levandulovém dosáhly flavonoidy koncentrace 20,07±3,22 mg/g, rozdíl tedy není příliš radikální, například ve srovnání s rapidním rozdílem v obsahu polyfenolů.



Obrázek 17: Srovnání obsahu celkových flavonoidů v extraktech

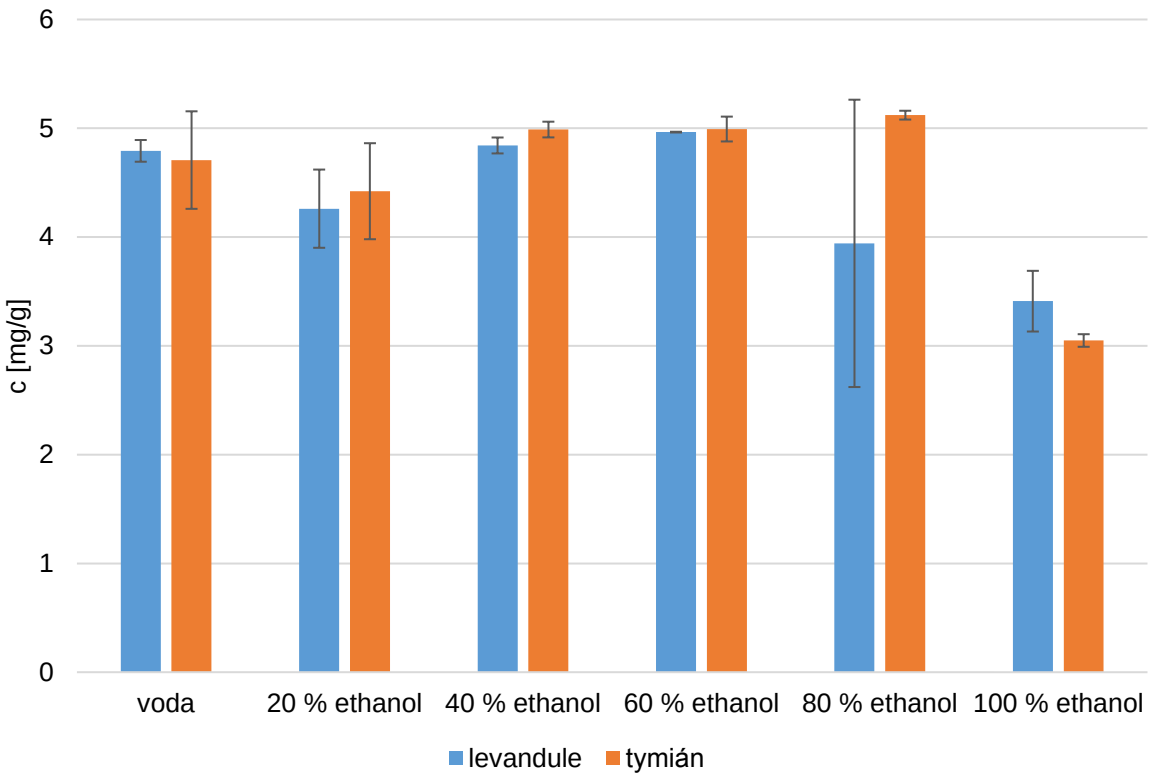
Z grafického srovnání obsahu flavonoidů u všech testovaných extraktů (Obrázek 17) lze jednoznačně označit olejové extrakty jako nejkoncentrovanější, při srovnání testovaných bylin pak u olejových extraktů vedle tymián. Vodné a ethanolové extrakty měly obdobný průběh extrakce, nezávisle na době louhování. Nejvyšších koncentrací, mimo olejové extrakty, dosáhly 24 hodinové extrakty levandule. Optimální koncentrace ethanolu pro extrakci flavonoidů byla koncentrace 40 %. Naopak nejméně vyhovují extrakce s nejnižším obsahem testovaných aktivních látek byla extrakce s použitím 100% ethanolu.

5.1.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita extraktů byla stanovena podle návodu v kapitole 4.4.3. Byla určena kalibrační křivka a podle její rovnice $y=1,4113 \cdot x$ byly vypočteny koncentrace pro jednotlivé extrakty a přepočtena na miligramy antioxidantů na gram rostlinného materiálu, tyto výsledky jsou zaznamenány v tabulce (Tabulka 5), přičemž každý z extraktů byl analyzován ve třech opakováních a výsledkem je tak průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

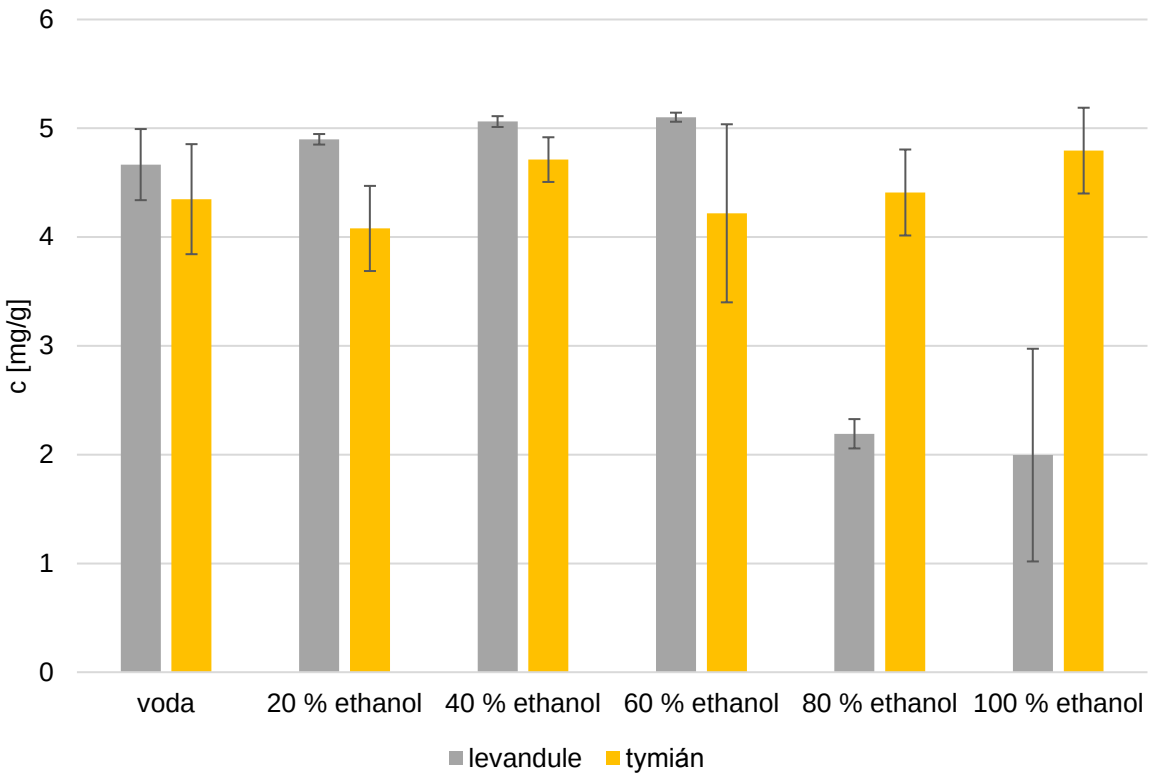
Tabulka 5: Výsledná antioxidační aktivita extraktů

	Levandule lékařská	Tymián obecný
Extrakt	c [mg/g]	c [mg/g]
vodný 15 minut	4,79±0,10	4,71±0,45
20 % ethanol 15 minut	4,26±0,36	4,42±0,44
40 % ethanol 15 minut	4,84±0,07	4,99±0,07
60 % ethanol 15 minut	4,96±0,00	4,99±0,11
80 % ethanol 15 minut	3,94±1,32	5,12±0,04
100 % ethanol 15 minut	3,41±0,28	3,05±0,06
vodný 24 hodin	4,67±0,33	4,35±0,51
20 % ethanol 24 hodin	4,90±0,05	4,08±0,39
40 % ethanol 24 hodin	5,06±0,05	4,71±0,21
60 % ethanol 24 hodin	5,10±0,04	4,22±0,82
80 % ethanol 24 hodin	2,19±0,13	4,41±0,40
100 % ethanol 24 hodin	2,00±0,98	4,79±0,39
olejový	6,25±0,02	9,86±0,07



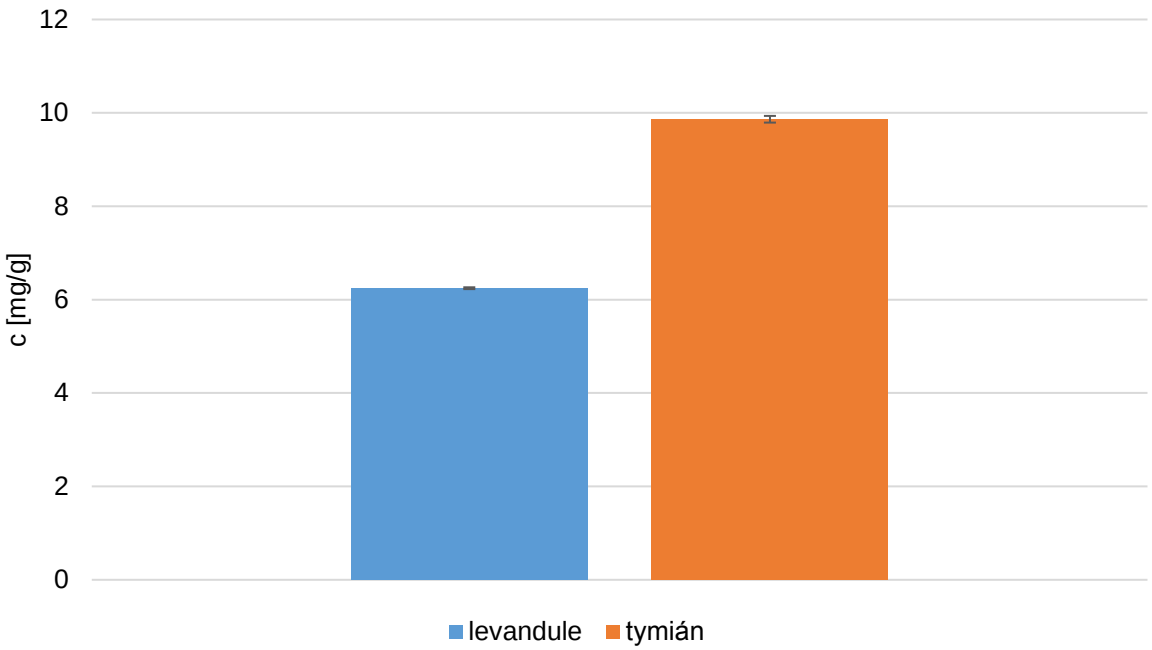
Obrázek 18: Antioxidační aktivita extraktů – 15 minutové výluhy

Podle grafu (Obrázek 18) zobrazujícího výsledky obsahu antioxidantů u 15 minutových výluhů lze konstatovat, že stanovená antioxidační aktivita extraktů vykazuje vyrovnaný trend, přičemž při koncentraci ethanolu 100°% byla stanovena nejnižší hodnota antioxidační aktivity, pro levanduli 3,41±0,28 mg/g, pro tymián 3,05±0,06 mg/g. Naopak nejvyšší antioxidační aktivity celkově dosahoval tymiánový extrakt v 80% ethanolu s 5,12±0,04 mg/g. Levandulový extrakt s nejvyšší antioxidační aktivitou byl zaznamenán u extrakce v 60% ethanolu s koncentrací antioxidantů 4,96±0,00 mg/g. Při srovnání antioxidační aktivity z hlediska složení extrakčního roztoku jsou získané koncentrace antioxidantů podobné, výjimkou byl pouze roztok s 80 % ethanolu, u kterého byla zaznamenána výrazně nižší koncentrace antioxidantů u levandule ve srovnání s tymiánem. U tohoto vzorku byla však současně zaznamenána větší chyba měření, čímž může být daný výsledek ovlivněn.



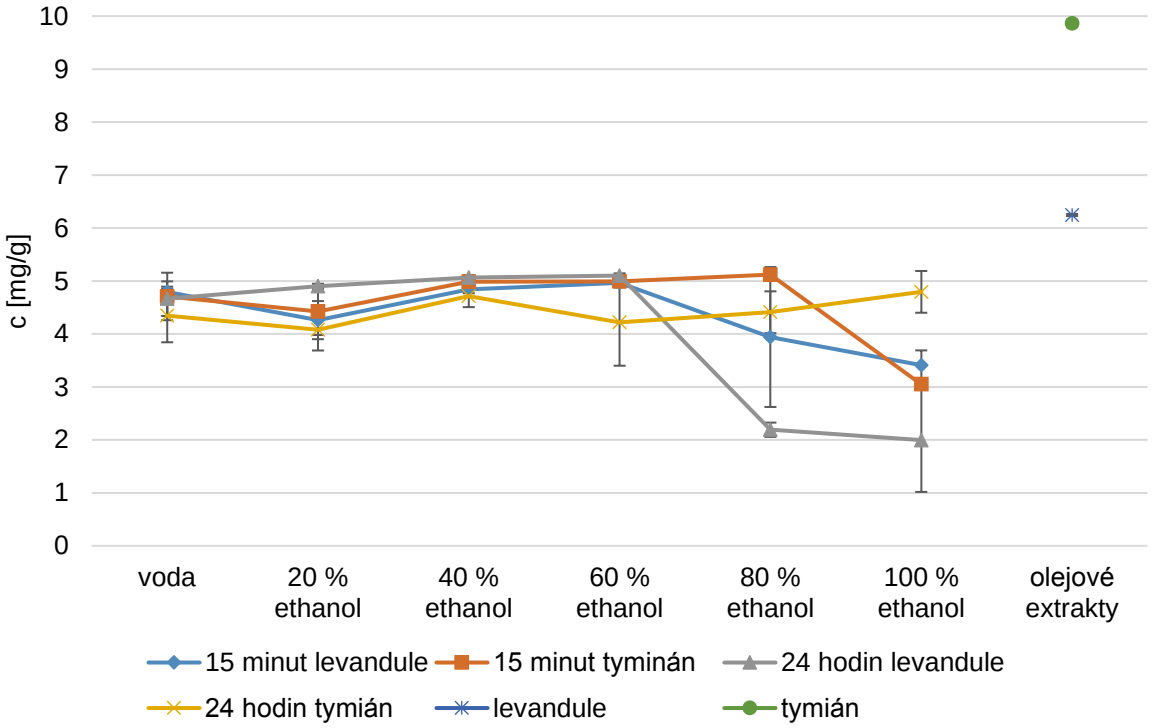
Obrázek 19: Antioxidační aktivita extraktů – 24 hodinové výluhy

Podle dosažených výsledků stanovení antioxidační aktivity u 24 hodinových výluhů (Obrázek 19) dosahoval nejvyšší koncentrace antioxidantů levandulový extrakt při použití koncentraci ethanolu 60 %, a to 5,10±0,04 mg/g. Tymiánový extrakt s nejvyšší koncentrací antioxidantů byl stanoven v případě použití 100% ethanolu, 4,79±0,39°mg/g. Obecně lze říci, že levandulové extrakty měly od vodného do 60% ethanolového extraktu trend rostoucí koncentrace antioxidantů, při 80 a 100 % ethanolu byl pak již zaznamenán pokles obsahu antioxidantů. Naopak tymiánové extrakty měly obsah antioxidantů u jednotlivých extraktů velmi podobný a nebyl zaznamenán žádný výrazný trend v obsahu antioxidantů při použití různé koncentrace ethanolu.



Obrázek 20: Antioxidační aktivita extraktů – olejové extrakty

Dle dosažených výsledků při testovaní olejových extraktů (Obrázek 20) lze říci, že tymiánový olejový extrakt vykazoval jednoznačně vyšší koncentraci antioxidantů, jejich koncentrace byla 9,86±0,07 mg/g. Levandulový olejový extrakt obsahoval menší množství antioxidantů, a to 6,25±0,029°mg/g.



Obrázek 21: Srovnání antioxidační aktivity extraktů

Při srovnání antioxidační aktivity všech připravených extraktů (Obrázek 21) je naprosto jasné, že nevyšší antioxidační aktivitou disponovaly olejové extrakty. Olejový tymiánový extrakt je ve srovnání s nejnižší koncentrací, které dosahuje levandulový extrakt ve 100% ethanolu při 24 hodinovém louhování, téměř čtyřnásobně účinnější. A při porovnání olejového tymiánové extraktu s nejaktivnějším ethanolovým extraktem obou bylin, je koncentrace antioxidantů u olejového extraktu téměř dvojnásobná. Olejový extrakt levandule pak vykazoval nižší aktivitu než tymiánový, ale stále měl vyšší antioxidační aktivitu než všechny ostatní ethanolové a vodné extrakty bylin. Z celkového hlediska disponovaly vodné a ethanolové extrakty obdobným průběhem, až na tymián louhovaný 24 hodin, u kterého byl na rozdíl od ostatních extraktů po překročení hranice 60 % ethanolu zaznamenán nárůst antioxidační aktivity ve srovnání s ostatními vzorky, u kterých byl od této koncentrace zaznamenán naopak pokles obsahu extrahovaných antioxidantů. Při srovnání 15 minutových a 24 hodinových extraktů pak nebyly pozorovány při nižší koncentraci ethanolu žádné významné rozdíly v obsahu extrahovaných antioxidantů.

Celkově dle všech dosažených výsledků lze konstatovat, že z připravených extraktů by jako nejvhodnějším pro aplikace v potravinářském průmyslu díky nejvyšším obsahům aktivních látek vyhovovaly olejové extrakty a extrakty připravené pomocí 40% ethanolu při louhovaní 24 hodin. Při porovnání obou testovaných bylin pak bylo stanoveno větší množství aktivních látek v tymiánu obecném, jak pro polyfenoly, tak flavonoidy i v případě antioxidační aktivity.

6 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce se zabývala přípravou a charakterizací extraktů levandule lékařské a tymiánu obecného a jejich možnou aplikací při fortifikaci potravin.

V teoretické části byly popsány v přírodě se vyskytující látky zodpovědné za antimikrobiální a antioxidační účinky rostlin. Dále možnosti extrakce těchto látek a následně i metody pro jejich stanovení. Diskutovány byly i varianty jejich možného použití v potravinářství.

V praktické části byly připraveny vodné, ethanolové a olejové extrakty. U všech extraktů byla provedena charakterizace z hlediska obsahu celkových polyfenolů, celkových flavonoidů a antioxidační aktivity.

Z připravených extraktů měl nejvyšší koncentraci polyfenolů tymiánový extrakt připravený ve 40% ethanolu při louhovaní po dobu 24 hodin (31,05±4,19 mg/g), z levandulových extraktů měl rovněž nejvyšší koncentraci polyfenolů extrakt připravený při stejné koncentraci ethanolu a stejném čase louhování (20,38±1,01 mg/g). Nejbohatší na flavonoidy byl stanoven olejový extrakt tymiánu (26,90±0,79 mg/g), z levandulových extraktů se jednalo také o olejový extrakt (20,07±3,22 mg/g). Nejvyšší antioxidační aktivity dosáhly také olejové extrakty, tymiánový s koncentrací 9,86±0,07 mg/g a levandulový s 6,25±0,02 mg/g. Nejlepším extrakčním činidlem pro polyfenoly byl roztok o koncentraci ethanolu 40 %, tato koncentrace roztoku byla vhodná i pro extrakci flavonoidů. Celkově bylo stanoveno větší množství aktivních látek v tymiánu obecném, jak pro polyfenoly, tak flavonoidy i v případě antioxidační aktivitu. Z připravených extraktů by tedy nejvhodnějším k aplikaci v potravinářském průmyslu byly olejové extrakty a extrakty připravené pomocí 40% ethanolu při louhovaní 24 hodin. Před aplikací těchto extraktů by však mohlo být vhodné vyextrahovat barviva, která pro tymiánové extrakty znamenala výrazný zelený odstín a pro levandulové hnědý. Tato zabarvení by mohla pro spotřebitele působit nepřitažlivě.

V současnosti probíhá celá řada studií o vlivu extraktů rostlin jako antimikrobiálních a antioxidačních činidel, která by bylo možné aplikovat při skladování potravin. Nejvýznamnějšími extrakty jsou esenciální oleje, protože jejich koncentrace v rostlinách je jedna z nejvyšších, co se týče obsahu aktivních látek rostlin. Při jejich použití je ale důležité věnovat pozornost jejich vonnému charakteru, protože může ovlivnit spotřebitele. Je vhodné tedy používat esenciální oleje na potraviny, kdy nebude docházet ke střetu vůní, například na masné výrobky je vhodné použít esenciální oleje rostlin, které jsou již sžité s jejich následnou úpravou, tymián je zde tedy vhodnou volbou. Pro aplikaci na čerstvé ovoce se sklony k rychlé zkáze je možné použít zředěný roztok levandulového esenciálního oleje, tato možnost byla laboratorně testována na jahodách, kdy jahody ošetřené LEO vydržely bez výskytu plísně při teplotě 7 °C 8 dní, jahody neošetřené LEO vydržely bez plísně dny 2 [53]. Levandulový esenciální olej je možné také používat pro pekárenské výrobky nebo suroviny, spotřebiteli nebude možné reziduum aroma podivné, jelikož existují výrobky obsahující přímo levandulové květy. Další možností je používat natolik zředěné esenciální oleje, že jejich aroma nebude postřehnutelné. Otázkou však zůstává, zda budou v této koncentraci aplikované esenciální oleje ještě dostatečně účinné. Dále nelze opomenout vliv polyfenolických látek a flavonoidů na lidské zdraví. Jejich obsah má značný vliv především na zmírnění vlivu oxidačního stresu na lidský organismus, a potraviny s vyšším obsahem těchto látek bývají označovány jako superpotraviny. Testované extrakci lze tak kromě

aplikací ve formě přírodních konzervantů využít i pro fortifikaci různých potravin s cílem zvýšení jejich antioxidačního účinku.

Momentálně jsou bylinky stále primárně používány k ochucení, jejich vliv na udržitelnost potravin je ve fázi studií, ale ještě není zařazen do provozu, protože toto zavedení je náročné na volbu bylin, koordinaci koncentrace a zachování biologické aktivity použitých látek po zařazení do řetězce termálních úprav, vše je tedy velice technologicky náročné.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] CHARLES, Denys J., 2012. Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. New York: Springer. ISBN 978-1-4614-4309-4.

[2] CHIPAULT, J. H., G. R. MIZUNO, J. M. HAWKINS a W. O. LUNDBERG, 1952. THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF NATURAL SPICES b. *Journal of Food Science*. **17**(1-6), 46-55. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1952.tb16737.x. ISSN 0022-1147. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1952.tb16737.x

[3] COWAN, M. M.:Plant products as microbial agents, Clin. Microbiol. Reviews, 1999, vol. 12, no. 4, s. 564 – 582

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

[5] CABALLERO, Benjamin, Luiz C. TRUGO a Paul M. FINGLAS, c2003. Encyclopedia of food sciences and nutrition. 2nd ed. New York: Academic Press. ISBN 99-999-0127-1.

[6] SPENCER, Jeremy P. E., Manal M. ABD EL MOHSEN, Ann-Marie MINIHANE a John C. MATHERS, 2008. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*. **99**(01). DOI: 10.1017/S0007114507798938. ISSN 0007-1145. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114507798938

[7] MATTILA, Pirjo, Jarkko HELLSTRÖM a Riitta TÖRRÖNEN, 2006. Phenolic Acids in Berries, Fruits, and Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**(19), 7193-7199. DOI: 10.1021/jf0615247. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0615247

[8] GROTEWOLD, Erich, c2006. *The science of flavonoids*. New York: Springer. ISBN 978-0387-28821-5.

[9] BAUR, Joseph A. a David A. SINCLAIR, 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*. **5**(6), 493-506. DOI: 10.1038/nrd2060. ISSN 1474-1776. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/nrd2060

[10] [2015]. *Diet-microbe interactions in the gut: effects on human health and disease*. London, UK: Elsevier, AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, s. 103-117. ISBN 978-0-12-407825-3.

[11] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-16-9.

[12] PISOSCHI, Aurelia Magdalena, Aneta POP, Cecilia GEORGESCU, Violeta TURCUŞ, Neli Kinga OLAH a Endre MATHE, 2018. An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **143**, 922-935. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.11.095. ISSN 02235234. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523417309984

[13] *Antioxidants in Food: Practical Applications*, 2001. 1. Boca Raton: Woodhead Publishing Limited. ISBN 0-8493-1222-1.

[14] MEWALAL, Ritesh, Durgesh K. RAI, David KAINER, Feng CHEN, Carsten KÜLHEIM, Gary F. PETER a Gerald A. TUSKAN, 2017. Plant-Derived Terpenes: A Feedstock for Specialty Biofuels. *Trends in Biotechnology*. **35**(3), 227-240. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.08.003. ISSN 01677799. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779916301287

[15] TRINDADE, Helena, Luis Gaspar PEDRO, Ana Cristina FIGUEIREDO a José Gonçalves BARROSO, 2018. Chemotypes and terpene synthase genes in Thymus genus: State of the art. *Industrial Crops and Products*. **124**, 530-547. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.08.021. ISSN 09266690. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669018307155

[16] MASHWANI, Zia-ur-Rehman, Mubarak Ali KHAN, Tariq KHAN a Akhtar NADHMAN, 2016. Applications of plant terpenoids in the synthesis of colloidal silver nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*. **234**, 132-141. DOI: 10.1016/j.cis.2016.04.008. ISSN 00018686. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868615300397

[17] MALACARNE, Mario, Giampaolo ANTONIOLLI, Daniela BERTOLDI, Tiziana NARDIN a Roberto LARCHER, 2018. Botanical origin characterisation of tannins using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. **267**, 204-209. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.06.131. ISSN 03088146. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617311135

[18] ERDELSKÁ, Oľga, Karol ERDELSKÝ, Mojmír KVAČALA, Dionýz DUGAS a Zlata KOMÁROVÁ, 2008. *Atlas liečivých rastlín*. Bratislava: Príroda. ISBN 978-80-07-01527-2.

[19] GÓRNICKA, Jadwiga, 2002. *Domácí přírodní lékárna: rádce pro zdraví*. Praha: Vašut nakladatelství. ISBN 80-723-6026-4.

[20] Chemical composition of lavender essential oil and its antioxidant activity and inhibition against rhinitis-related bacteria, 2010. *African Journal of Microbiology Research*. **2010**(4), 303-313. DOI: 10.5897/AJMR. ISSN 1996-0808.

[21] Lavandula, 2018. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2018-03-05]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Lavandula

[22] SHELLIE, Robert, Luigi MONDELLO, Philip MARRIOTT a Giovanni DUGO, 2002. Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography–mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. Journal of Chromatography A. 970(1-2), 225-234. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00653-2. ISSN 00219673. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967302006532

[23] Lavender essential oil information, c1998-2018. Esoteric Oils [online]. Cape Town [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: http://essentialoils.co.za/essential-oils/lavender.htm

[24] HESSAYON, D. G., 1999. Zelenina a bylinky v zahradě. Praha. ISBN 80-860-2995-6.

[25] FEŘTEKOVÁ, Vlasta, 2000. Kosmetika v teorii a v praxi. 3. rozš. vyd. Praha: Maxdorf. ISBN 80-859-1219-8.

[26] Thymus_vulgaris3, 2007. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Fraancisco: Wikimedia Foundation [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9a/Thymus_vulgaris3.jpg?uselang=cs

[27] Nurzyńska-Wierdak, R. Zawiślak, G. (2016). Chemical composition and antioxidant activity of lavender (Lavandula angustifolia Mill.) aboveground parts. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus, 15(5), 225–241.

[28] Imelouane, B., H. Amhamdi, J.P. Wathelet, M. Ankit, K. Khedid and A. El Bachiri, 2009. Chemical composition of the essential oil of thyme (Thymus vulgaris) from Eastern Morocco. Int. J. Agric. Biol., 11: 205–208

[29] 2012-. Handbook of herbs and spices. 2nd ed. Oxford: Woodhead, s. 499-525. Woodhead Publishing series in food science, technology and nutrition. ISBN 978-0-85709-039-3.

[30] HUDAIB, Mohammad, Ester SPERONI, Anna Maria DI PIETRA a Vanni CAVRINI, 2002. GC/MS evaluation of thyme (Thymus vulgaris L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **29**(4), 691-700. DOI: 10.1016/S0731-7085(02)00119-X. ISSN 07317085. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073170850200119X

[31] Plants extracts and secondary metabolites, their extraction methods and use in agriculture for controlling crop stresses and improving productivity: A review, 2018. Academia Journal of Medicinal Plants. (6), 223-240. DOI: 10.15413/ajmp.2018.0139. ISSN 2315-7720.

[32] ALTEMIMI, Ammar, Naoufal LAKHSSASSI, Azam BAHARLOUEI, Dennis WATSON a David LIGHTFOOT, 2017. Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *May 22-24, 2017 Kuala Lumpur (Malaysia) ICLTET-2017, ACBES-2017*. IIE, 2017-05-22, **6**(4), -. DOI: 10.15242/IIE.C0517024. ISBN 9789384422783. ISSN 2223-7747. Dostupné také z: http://iieng.org/images/proceedings_pdf/C05170241.pdf

[33] ALTEMIMI, Ammar, Naoufal LAKHSSASSI, Azam BAHARLOUEI, Dennis WATSON a David LIGHTFOOT, 2017. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*. **6**(4). DOI: 10.3390/plants6040042. ISSN 2223-7747. Dostupné také z: http://www.mdpi.com/2223-7747/6/4/42

[34] *Extrakční techniky* [online], [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52968

[35] HANDA, Sukhdev Swami, Suman Preet Singh KHANUJA, Gennaro LONGO, Dev Dutt RAKESH, *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, 2008. Trieste: Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies International Centre for Science and High Technology.

[36] AZMIR, J., I.S.M. ZAIDUL, M.M. RAHMAN, et al., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. **117**(4), 426-436. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014. ISSN 02608774. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877413000277

[37] SOMMER, Lumír, 2000. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM. ISBN 80-214-1742-0.

[38] OPEKAR, František, 2003. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-0553-1.

[39] MARÍA, Rondón, Moncayo SHIRLEY, Cornejo XAVIER, Santos JAIME, Villalta DAVID, Siguencia ROSA a Duche JODIE, 2018. Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal of King Saud University - Science*. **30**(4), 500-505. DOI: 10.1016/j.jksus.2017.03.009. ISSN 10183647. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1018364717301957

[40] MARIMUTHU, Nishandhini, T VISWANATHAN, Mahendran RADHA, P.R. RATHISRE a Jeyabaskar SUGANYA, 2017. Preliminary analysis of Phyto-constituents from the Leaf Extracts of Ballota nigra Linn. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. **10**(1). DOI: 10.5958/0974-360X.2017.00035.X. ISSN 0974-3618.

[41] 2002. *Lavender: the genus Lavandula*. New York: Taylor & Francis, s. 86-99. ISBN 0-415-28486-4.

[42] LUCERA, Annalisa, Cristina COSTA, Amalia CONTE a Matteo A. DEL NOBILE, 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*. **3**. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00287. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00287/abstract

[43] CAROCHO, Márcio, Patricia MORALES a Isabel C.F.R. FERREIRA, 2015. Natural food additives: Quo vadis?. 45(2), 284-295. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.06.007. ISSN 09242244. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415001508

[44] RAMOS, Marina a Ana BELTRAN, 2013. Carvacrol and Thymol for Fresh Food Packaging. 05(04). DOI: 10.4172/jbb.1000151. ISSN 09750851. Dostupné také z: https://www.omicsonline.org/carvacrol-and-thymol-for-fresh-food-packaging-jbb.1000151.php?aid=15717

[45] SALEHI, Bahare, Abhay Prakash MISHRA, Ila SHUKLA, et al., 2018. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. Phytotherapy Research. 32(9), 1688-1706. DOI: 10.1002/ptr.6109. ISSN 0951418X. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.6109

[46] ERLAND, Lauren A.E., Soheil S. MAHMOUD, Ila SHUKLA, et al., 2016. Lavender (Lavandula angustifolia) Oils: Health and potential uses. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Elsevier, 2016, 32(9), 501-508. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00057-2. ISBN 9780124166417. ISSN 0951418X. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124166417000572

[47] Natural Product Reports, 18(6). ISSN 02650568. Dostupné také z: http://http://xlink.rsc.org/?DOI=b101061l

[48] Shamsa Fadhil, Monsef Hamid Reza ., Ghamooshi Rouhollah . a Verdian Rizi Mohammad Reza ., 2007. Spectrophotometric Determination of Total Alkaloids in Peganum harmala L. Using Bromocresol Green. Research Journal of Phytochemistry. 1(2), 79-82. DOI: 10.3923/rjphyto.2007.79.82. ISSN 18193471. Dostupné také z: http://www.scialert.net/abstract/?doi=rjphyto.2007.79.82

[49] MUTHUKUMARAN, Peraman, Nachimuthu SARASWATHY, Vijayasekar ASWITHA, Ramesh BALAN, Venkatesh Babu GOKHUL, Palanikumar INDUMATHI a Sivasubramani YUVAPRIYA, 2016. Assessment of Total Phenolic, Flavonoid, Tannin Content and Phytochemical Screening of Leaf and Flower Extracts from Peltophorum pterocarpum (DC.) Backer ex K.Heyne: a comparative study. Pharmacognosy Journal. 8(2), 140-143. DOI: 10.5530/pj.2016.2.7. ISSN 09753575. Dostupné také z: http://phcogj.com/article/129

[50] Quantitative estimation of tannins, phenols and antioxidant activity of methanolic extract of Imperata cylindrica, 2013. International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences. 4(1), 73-77. ISSN 0975-7538.

[51] SALEHI, Bahare, Mohammad Sanad ABU-DARWISH, Amer Hussein TARAWNEH, et al., 2019. Thymus spp. plants - Food applications and phytopharmacy properties. 85, 287-306. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.01.020. ISSN 09242244. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224418307507

[52] LUCERA, Annalisa, Cristina COSTA, Amalia CONTE a Matteo A. DEL NOBILE, 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds. Frontiers in Microbiology. 3. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00287. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00287/abstract

[53] PREDOI, Daniela, Simona ICONARU, Nicolas BUTON, Monica BADEA a Luminita MARUTESCU, 2018. Antimicrobial Activity of New Materials Based on Lavender and Basil Essential Oils and Hydroxyapatite. Nanomaterials. 8(5). DOI: 10.3390/nano8050291. ISSN 2079-4991. Dostupné také z: http://www.mdpi.com/2079-4991/8/5/291

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

UV záření	Ultra Violet, ultra fialové záření
LEO	levandulový esenciální olej
TEO	tymiánový esenciální olej
EPE	Pulsed-electric Field extraction, extrakce pulzním elektrickým polem
EAE	Enzyme Assisted Extraction, enzymaticky asistovaná extrakce
HPLC	High Performace Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
TLC	Thin Layer Chromatography, chromatografie na tenké vrstvě
UV-VIS	Ultra Violet-Visible, ultrafialové a viditelné
B.L.B	Bouguer-Lambert-Beer