

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



HPLC-ED bioaktivních látek v rozmarýnu

Bakalářská práce

Autor:

Kateřina Erbenová

Studijní obor:

Chemie – analytik specialista

Vedoucí práce:

doc. RNDr. David Jirovský, Ph. D.

Olomouc 2024

Bibliografická identifikace:

Jméno autora:	Kateřina Erbenová
Název práce:	HPLC-ED bioaktivních látek v rozmarýnu
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. David Jirovský, Ph. D.
Rok odevzdání práce:	2024
Anotace:	Bakalářská práce je zaměřena na analýzu vybraných fenolových kyselin v extraktech rozmarýnu lékařského metodou HPLC s dvoukanálovou coulometrickou detekcí.
Klíčová slova:	rozmarýn lékařský, rozmarýnová kyselina, kávová kyselina, polyfenolové kyseliny, separace, elektrochemická detekce, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Počet stran:	37
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's name:	Kateřina Erbenová
Title:	HPLC-ED of bioactive substances in rosemary
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Analytical Chemistry
Supervisor:	doc. RNDr. David Jirovsk, Ph. D.
Year of submission:	2024
Annotation:	The bachelor's thesis is focused on the analysis of selected fenolic acids in extracts of rosemary by the HPLC method with two-channel coulometric detection.
Key words:	Rosemary, rosmarinic acid, caffeic acid, polyphenolic acids, separation, electrochemical detection, high performance liquid chromatography
Number of pages:	37
Language:	Czech

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsme závěrečnou práci na téma „HPLC-ED bioaktivních látek v rozmarýnu“ vypracovala samostatně se všemi uvedenými informačními zdroji a literaturou.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a i v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

Podpis:

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat především svému vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Davidu Jirovskému, Ph.D. za ochotu, dohled a hlavně trpělivost při konzultacích a psaní bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za podporu po celou dobu studia.

Seznam zkratek:

HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ED – Elektrochemická detekce

RP-LC – Kapalinová chromatografie - separace na obrácených fázích

MIC – Minimální inhibiční koncentrace

TLC – Chromatografie na tenké vrstvě

GC - Plynová chromatografie

FID – Plamenově-ionizační detektor

MS – Hmotnostní spektrometrie

TMS - Trimethylsilan

RP – Obrácené fáze

UV/VIS – Ultrafialová/viditelná oblast

DAD – Detektor fotodiodového pole

NMR – Nukleární magnetická rezonance

CZE – Kapilární zónová elektroforéza

MEKC – Micelární elektrokinetická chromatografie

FLD – Fluorescenční detektor

MF – Mobilní fáze

Obsah

1. Abstrakt	8
Abstract	9
2. Úvod.....	10
3. Cíl práce	11
4. Teoretická část.....	12
4. 1. Rozmarýn lékařský.....	12
4. 1. 1. Popis rostliny.....	12
4. 1. 2. Historie	12
4. 1. 3 Využití v současnosti	13
4. 1. 4. Léčivé účinky	13
4. 2. Fytochemie rozmarýnu lékařského	14
4. 2. 1. Terpeny.....	14
4. 2. 2. Polyfenoly	18
4. 2. 2. 1. Flavonoidy.....	19
4. 2. 2. 2. Fenolové kyseliny (FK).....	21
4. 3. Metody analýzy polyfenolů.....	24
5. Experimentální část	26
5. 1. Instrumentace HPLC	26
5. 1. 1. Chromatografické podmínky.....	26
5. 2. Použité chemikálie	26
5. 3. Vzorky	26
5. 4. Pracovní postup	26
5. 4. 1. Příprava mobilní fáze (MF).....	26
5. 4. 2. Příprava roztoků standardů.....	27
5. 4. 3. Zpracování a příprava vzorků	27
6. Výsledky a diskuze.....	28
6. 1. Hydrodynamický voltamogram.....	28
6. 2. Analýza standardů kyselin	29
6. 3. Analýza vzorků tinktur.....	30
6. 4. Porovnání obsahu RA u obou tinktur	32
7. Závěr.....	33
8. Seznam použité literatury.....	34

1. Abstrakt

Rozmarýn lékařský je léčivá rostlina pocházející ze Středomoří. Je to keřovitá, vždyzelená bylina spadající do čeledi *Lamiaceae*.

Je znám už po mnoho tisíciletí, pro svou aromatickou vůni si vybudoval svou oblíbenost po celém světě. Má mnoho využití jak v kosmetickém průmyslu, tak v kulinářství či v léčitelství. Má pozitivní vliv na trávicí ústrojí, zvyšování sníženého krevního tlaku, pomáhá při nachlazení, podporuje činnost jater a slouží i jako prevence před nádorovými onemocněními.

Rostlina obsahuje celou řadu různých bioaktivních látek. Mezi nejvíce zastoupené látky patří terpeny (především monoterpeny, diterpeny a triterpeny), flavonoidy a fenolové kyseliny.

Tato bakalářská práce je zaměřena na HPLC analýzu vybraných fenolových kyselin v extraktech z rozmarýnu. Chromatografická separace probíhala v systému obrácených fází (RP-LC). Jako detekční technika byla zvolena dvoukanálová coulometrická detekce.

Abstract

Rosemary is a medicinal plant native to the Mediterranean. It is a shrubby, evergreen herb belonging to the *Lamiaceae* family.

It has been known for many millennia, it has built up its popularity all over the world for its aromatic fragrance. It has many uses both in the cosmetic industry, in the culinary arts and in medicine. It has a positive effect on the digestive system, increases low blood pressure, helps with colds, supports liver function and also serves as a prevention against cancer.

The plant contains a number of different bioactive substances. Among the most represented substances are terpenes, (especially monoterpenes, diterpenes and triterpenes), flavonoids and phenolic acids.

The bachelor's thesis is focused on HPLC analysis of selected phenolic acids in rosemary extracts. Chromatographic separation was carried out in a reversed phase system (RP-LC). Two-channel coulometric detection was chosen as the detection technique.

2. Úvod

Rozmarýn lékařský (*Salvia rosmarinus*, dříve *Rosmarinus officinalis*), je stálezelená, keřovitá rostlina patřící do čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Po nových fyto genetických průzkumech byl přiřazen do rodu *Salvia* s novým názvem *Salvia rosmarinus* [1].

Rozmarýn lékařský, který má mnoho léčivých účinků, je znám už po mnoho tisíc let. Staří Řekové a Římané ho měli v oblibě. Používali rozmarýn na výrobu odvarů nebo mastiček na léčbu plísní a ekzémů. Nosívali ho studenti na hlavách, protože se říkávalo, že rozmarýn povzbuzuje paměť. Na pohřbech byl symbolem vzpomínek, na svatbách symbolem lásky. Pro svou specifickou aromatickou vůni se při morové epidemii používal jako lék. Nyní se jeho účinky využívají jak v medicíně, tak v kosmetice, nebo v potravinářství.

V kulinářství se používá jako koření při úpravách masa nebo omáček. Používají se jak čerstvé, tak sušené listy rozmarýnu. Účinné látky obsažené v rozmarýnu mají schopnost zpomalovat oxidativní proces potravin, což z rozmarýnu dělá užitečný přírodní konzervant.

Jako léčivá bylina obsahuje mnoho různých silic, rostlinných fenolů, saponinů, tříslovin a dalších látek. Tyto látky mu propůjčují protiplísňové, antivirové, antibakteriální, protizánětlivé, protinádorové, antitrombotické, antidepresivní, antiulcerogenní a antioxidační účinky.

Nejvýznamnější bioaktivní látky v rozmarýnu jsou polyfenolové kyseliny, diterpenoidní hořčiny, triterpenoidy, flavonoidy, těkavé oleje a třísloviny [2]. Nejvíce zastoupenými sekundárními metabolity obsaženými v rostlině jsou terpeny. Do skupiny polyfenolů patří flavonoidy a fenolové kyseliny, které se od sebe liší strukturní charakteristikou a antioxidační aktivitou [3]. V poslední době je věnována větší pozornost fenolovým kyselinám. Zkoumá se potenciál jejich účinku pro léčbu nádorových onemocnění, kardiovaskulárních chorob a léčbě problémů kůže.

Chemická analýza a výběr vhodné instrumentální metody ke stanovení obsažených látek v rostlině je vždy podřízen chemickému charakteru analytů. Charakterem se myslí například jeho těkavost, resp. molekulová hmotnost. Tato práce je zaměřena především na obsažené látky netěkavé povahy, jako jsou fenolové a polyfenolové kyseliny. Mezi nejvíce zastoupené fenolové kyseliny patří kávová kyselina a rozmarýnová kyselina. Analytická metoda, vhodná pro separaci a analýzu netěkavých látek, se nazývá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která je v spojení s elektrochemickým detektorem (HPLC-ECD) vhodná pro detekci sekundárních metabolitů fenolové povahy.

3. Cíl práce

Hlavním cílem této bakalářské práce je seznámit čtenáře s rozmarýnem lékařským, jeho vlastnostmi a možnostmi využití jak v historii, tak v současnosti. Mezi další cíle patří:

- podat základní přehled o fytochemii rozmarýnu,
- seznámit se současnými analytickými metodami, které se nejčastěji v praxi využívají pro analýzu fenolových kyselin v rostlinných matricích,
- připravit vlastní tinkturu ze sušené drogy rozmarýnu,
- pomocí metody HPLC s elektrochemickou detekcí charakterizovat tento extrakt a komerčně dostupnou tinkturu z hlediska obsahu rozmarýnové kyseliny, popřípadě dalších vybraných fenolových kyselin.

4. Teoretická část

4. 1. Rozmarýn lékařský

4. 1. 1. Popis rostliny

Rozmarýn lékařský (*Salvia rosmarinus*) je stálezelená, keřovitá bylina, která má v oblíbené slunečné a teplejší podnebí [4]. Je řazena do čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*) a spolu se šalvějí, bazalkou, oreganem a tymiánem do rodu šalvěje (*Salvia*) [1]. Má dřevitý stonek s tmavě zelenými listy tvarem připomínající jehličí (Obr. 1). Květy mohou mít barvu růžovou, fialovou, bílou nebo modrou. Bylina původně pochází z pobřeží Středozemního moře, ale je odolná i vůči chladnějším podmínkám. Není tolik náročná na pěstování, přežije i dlouhou dobu bez přísunu vody. Může dorůst až 2 metrů. Nyní se rostlina nejvíce pěstuje a dováží z Maroka, Tuniska, Španělska, Portugalska, Turecka, Alžírska a Indie [5].

Rozmarýn má díky svým aromatickým a léčivým účinkům velmi dlouhou historii využití.



Obr. 1: *Rosmarinus Officinalis* [53]



Obr. 2: Rozmarýn u pobřeží [54]

4. 1. 2. Historie

Latinský název *Rosmarinus* je složeninou slov „ros“ a „marinus“, což v doslovném překladu znamená „rosa moře“. Může to být důsledkem toho, že rozmarýn často volně roste u mořského pobřeží (Obr. 2) [6]. Používal se v dávných dobách často jako symbol rozumu, nebo vzpomínání pozůstalých na mrtvé, anebo naopak jako symbol lásky pro nevěsty na svatbách [6]. V Austrálii a na Novém Zélandu je rozmarýn připomínkou na oběti První světové války. Lidé si rozmarýn schovávali pod polštáře, na kterých spávali, protože věřili, že je ochrání před vstupem zlým duchů do domu [7].

Existuje i legenda, která vysvětluje složeninu názvu rozmarýn. Legenda praví, že Panna Marie, když uprchla z Egypta, se schovávala u rozmarýnového keře. Když svůj modrý plášť

přes keř přehodila, bílé květy rozmarýnu zmodraly. Z toho důvodu se keři dlouho říkalo „rose of Mary“, i když se rozmarýn svým vzhledem růži vůbec nepodobá [8].

V minulosti byly extrakty z rozmarýnu používány hlavně na kožní onemocnění, k léčbě moru a dny, nebo jako aromaterapie na zklidnění. V lidovém léčitelství se extrakty z rozmarýnu používaly na bolesti hlavy, křeče, neklid, zlepšení nálady a proti únavě [9].

4. 1. 3 Využití v současnosti

Využití rozmarýnu je velice rozmanité. Jeho extrakty se používají především v potravinářství. Sušený rozmarýn je velice aromatický a slouží hlavně jako ochucovadlo jídel. Také patří mezi přírodní konzervanty potravin. V seznamu potravin prodlužující trvanlivost mají extrakty rozmarýnu kód E392 [10].

Pro své aromatické, léčivé a konzervační účinky se používá i v kosmetickém průmyslu. Používá se v produktech, jako rozmarýnová voda, která pomáhá v péči o vlasy, kdy výtažky z rozmarýnu dokážou pomoci k obnově kořínkových folikul a podporují jejich růst, dále napomáhá čištění a hojení pokožky [8], [11].

V medicíně se účinné látky rozmarýnu využívají k léčení Alzheimerovy choroby, deprese, zažívacích, tonických a diuretických onemocnění [11]. Dokáže pozitivně ovlivňovat náladu, paměť, bolest, úzkost a spánek [12]. Studie provedená na potkanech ukázala, že obsažená rozmarýnová kyselina má vliv na pozastavení tvorby a snížení vývoje nádoru tlustého střeva. To by dokazovalo, že rozmarýn obsahuje léčivé látky, které mají potenciál k léčbě rakoviny [13].

4. 1. 4. Léčivé účinky

Rozmarýn je pro své léčivé účinky využíván už po mnoho generací. Novými studiemi byly prokázány významné antimikrobiální, protizánětlivé, antioxidační, antiapoptotické, protinádorové, antinociceptivní a neuroprotektivní účinky [12].

Rozmarýnový olej má antibakteriální vlastnosti. Bylo prokázáno, že olej má schopnost snižovat hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC) v hovězím a vepřovém masu [13]. MIC je minimální hodnota antibiotika, které má schopnost inhibovat/zamezovat růst daného kmene bakterie [14].

Průzkumy také ukázaly, že rozmarýnové esenciální oleje a extrakty mají protizánětlivé účinky, protože snižují výskyt leukocytů v místě zánětu [13].

Antidepresivní působení bylo testováno na myších vystavených stresové situaci. Hladiny neurotransmiterů v jejich mozcích se zvýšily, což vedlo ke snížení stresu [13]. Svými neuroprotektivními účinky dokáže rozmarýn také přispět v boji proti Alzheimerově chorobě nebo demenci [11].

Antioxidační a protinádorové účinky napomáhají ke snižování peroxidaci lipidů, které způsobují oxidační stres. Oxidační stres může vést k nástupu různých onemocnění jako třeba cukrovky nebo k tvorbě nádorů [13].

4. 2. Fytochemie rozmarýnu lékařského

Účinné látky v rozmarýnu se nacházejí ve všech částech, tedy v listech, kořenech, stoncích i květech. Nejlépe se získávají z rostlinných extraktů nebo silice (esenciální olej) – ta se získává z listů rostliny [15].

V esenciálním oleji se nachází mnoho těkavých látek ze skupiny terpenů, kam spadají monoterpeny, diterpeny, triterpeny a seskviterpeny. Jednou z hlavních obsažených složek je kafr, po kterém má rostlina charakteristické aroma[15]. Dalšími zastoupenými látkami jsou 1,8-cineol, α -pinen, β -pinen, borneol, kamfen, limonen, p-cymen, verbenon a β -karyofylen [16].

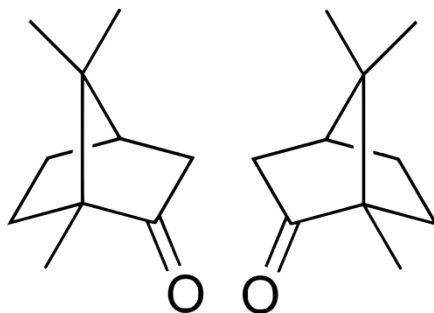
V extraktech z rozmarýnu se naopak nachází jak těkavé, tak netěkavé složky. Patří sem polyfenoly, které se skládají z flavonoidů a fenolových kyselin. Dále zde patří diterpeny a triterpeny [15]. Typické sloučeniny, které jsou v extraktech zastoupeny, jsou rozmarýnová kyselina, kávová kyselina, chlorogenová kyselina, kafr, karnosová kyselina, karnosol, rosmanol, oleanová kyselina, betulínová kyselina, betulín, ursolová kyselina, α -amyrin, β -amyrin, luteolin, apigenin, genkwanin, diosmetin, hispidulin [16].

4. 2. 1. Terpeny

Terpeny jsou uhlovodíky, které jsou odvozené z isoprenu. Jejich sumární vzorec se skládá z pěti atomů uhlíku a osmi atomů vodíku (C_5H_8) [17]. Terpeny jsou nejčastěji obsaženy v esenciálních olejích nebo pryskyřicích. V rozmarýnu jsou zastoupeny monoterpeny, diterpeny i triterpeny.

- *Kafr*

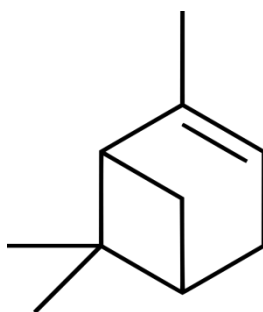
Kafr (Obr. 3) je monoterpenoidní látka poprvé izolovaná z kůry kafrovníku (*Cinnamomum camphora*). Jeho sumární vzorec je $C_{10}H_{16}O$. Od počátku 20. století se vyrábí z α -pipenu. Má typické zatuchlé aroma. Je součástí kadidel, repelentů proti hmyzu a používá se i jako léčivo. Jedná se o jednu z nejhojnějších látek obsažených v rozmarýnové silici [18].



Obr. 3: Strukturní vzorec kafru [55]

- *α -pinen*

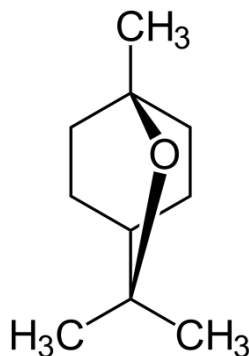
α -pinen (Obr. 4) je bicyklický uhlovodík, řazený do monoterpenů. Sumární vzorec α -pinenu je $C_{10}H_{16}$. Jeho strukturní izomery se nachází v enantiomerních formách (+) a (-). Nachází se v esenciálních olejích mnoha různých rostlin, například v rozmarýnu nebo v jehličnanech. Je přítomný i v květech konopí setého (*Cannabis sativa*) a podílí se na doprovodném farmakologickém účinku kanabinoidů. Má rozsáhlou biologickou aktivitu (antibakteriální, antifugální, protizánětlivé, antioxidační, neuroprotektivní, gastroprotektivní, protinádorové a insektivní účinky). Může sloužit jako výchozí látka pro syntézu dalších monoterpenů, jako je kafr, limonen nebo borneol [19].



Obr. 4: Strukturní vzorec α -pinenu [56]

- *1,8-cineol*

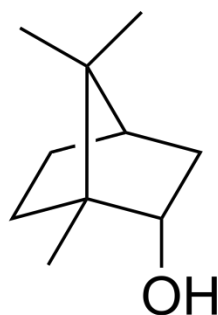
1,8-cineol, neboli eukalyptol, (Obr. 5) je monoterpen s molekulovým vzorcem $C_{10}H_{18}O$. Jeho hlavním přírodním zdrojem je rostlina eukalyptus. Největším spotřebitelem listů eukalyptu je medvídek koala, který jich dokáže zkonzumovat až půl kilogramu denně. Dále se jako sekundární metabolit nachází v oreganu nebo rozmarýnu. V posledních letech bylo zjištěno, že eukalyptol má schopnost po perorálním vstřebání putovat po celém organismu. V dnešní době je využíván pro své aromatické a léčivé účinky zejména u onemocnění dýchacích cest, ale v historii byl australskými domorodci používán i pro léčbu zranění a zánětů [20].



Obr. 5: Strukturní vzorec 1,8-cineolu [57]

- *Borneol*

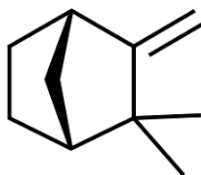
Borneol je bicycklý monoterpen (Obr. 6), který je již dlouhou dobu znám a používán v Číně, Japonsku a jiných částech Asie. V čínské medicíně je využíván pro své analgetické, protizánětlivé, antipyretické, antibakteriální a neuroprotektivní účinky. V čínské medicíně jsou známy přípravky obsahující tři D, L–borneol formy: L-borneol, D-borneol a syntetický racemický borneol. L-borneol je jedna z přírodních forem borneolu, který se získává z listů rostliny blumea (*Blumea balsamifera*). D-borneol se přírodní cestou získává z listů a větvíček rostliny kastrovníku (*Cinnamomum camphora*). Syntetický borneol se získává buď redukcí kafru nebo hydrolyzou α -pinenu. Všechny konfigurace borneolu mají podobné účinky, hlavně se liší prostorovou orientací (enantiomery) a jejich cenou na trhu. Syntetický borneol může způsobovat nežádoucí účinky, proto bývá na trhu levnější než přírodní. V dnešní medicíně se používá i pro stabilizaci protinádorových léčiv [21].



Obr. 6: Strukturní vzorec borneolu [58]

- *Kamfen*

Jedná se o monoterpen s bicycklickou strukturou (Obr. 7). Vytváří dva enantiomery. Je to přírodní látka vyskytující se v rostlinách jako je douglaska, rozmarýn nebo konopí. Je aromatický, je možné jej syntetizovat z pipenu. Slouží jako přísada do potravin [22]. Má potenciální účinky na ovlivňování atrofii kosterního svalstva a regulaci oxidativního stresu [23].

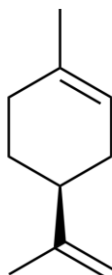


Obr. 7: Vzorec kamfenu [59]

- *Limonen*

Limonen je monoterpen (Obr. 8) enantiomerní povahy s mnoha biologickými vlastnostmi. V přírodě se nachází ve slupkách citrusových plodin (pomeranče, citróny, mandarinky).

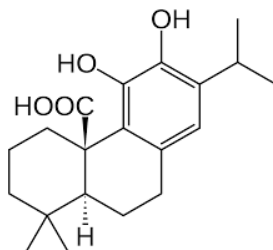
V pomerančích je nejvíce zastoupený (+) – limonen, zatímco v citronech je zastoupený (-) - limonen. Má antioxidační, protizánětlivé, protirakovinné účinky, dokáže snižovat oxidativní stres a je neuroprotektivní. Studie prokazují jeho neuroprotektivní vliv při Alzheimerově chorobě, roztroušené skleróze, epilepsii a mrtvici. (+)-Limonen je vhodnou výchozí látkou pro syntézu různých sloučenin a hlavně polymerů [24].



Obr. 8: Strukturní vzorec limonenu [60]

- *Karnosová kyselina*

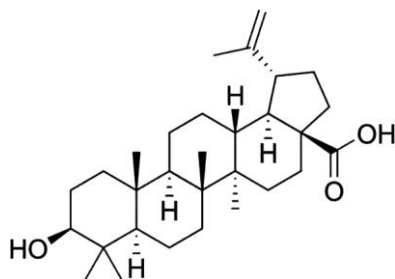
Karnosová kyselina je fenol spadající do skupiny diterpenů (Obr. 9). Poprvé byla identifikována v šalvěji, avšak je bohatě zastoupena i v rozmarýnu. Její struktura je velice podobná karnosolu a rosmanolu. Má antioxidační a antimikrobiální účinky. Používá se v kosmetickém a potravinářském průmyslu [25].



Obr. 9: Strukturní vzorec karnosové kyseliny [61]

- *Betulinová kyselina*

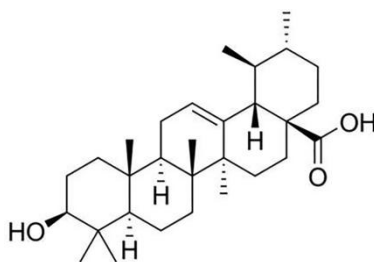
Betulinová kyselina patří mezi pentacyklické triterpenoidy (Obr. 10). V přírodě se nachází ve vnějších kůrách různých stromů, jako je například bříza bělokorá (*Betula pendula*). Byla jednou z prvních látek, které byly v 18. století identifikovány a izolovány z rostlin. Na americkém kontinentě již Indiáni používali betulinovou kyselinu jako lék. Jelikož vykazuje protirakovinné účinky, mohla by sloužit k prevenci, případě i léčbě rakoviny [26].



Obr. 10: Strukturální vzorec betulinové kyseliny [62]

- *Ursolová kyselina*

Ursolová kyselina je pentacyklická sloučenina spadající do skupiny triterpenoidů (Obr. 11). V přírodě je látka obsažena v mnoha druzích ovoce, zeleniny i rostlin. V posledních letech byla kyselina detailněji zkoumána a byly objeveny její potenciální protizánětlivé, antioxidační, a protirakovinné účinky. Kvůli špatné biologické dostupnosti a absorpci ursolové kyseliny je nutné syntetizovat její deriváty, které přebírají účinnosti jejich mateřské sloučeniny [27].



Obr. 11: Strukturální vzorec ursolové kyseliny [63]

4. 2. 2. Polyfenoly

Polyfenoly jsou organické sloučeniny složené z různého počtu aromatických jader, na nichž je navázaná hydroxylová skupina. Jsou to jako sekundární rostlinné metabolity. Díky se dále na flavonoidy, fenolové kyseliny, stilbeny a lignany. V přírodě byly identifikovány v různých druzích potravin – koření (hřebíček, máta peprná), ovoci (malina, ostružina, jahoda), zelenině (olivy, artyčoky) nebo také v čaji a červeném víně [28]. Díky své schopnosti vytvářet různé komplexní struktury mají mnoho biologických vlastností, jako třeba antioxidační, protizánětlivý, protirakovinný a antibakteriální účinek [29].

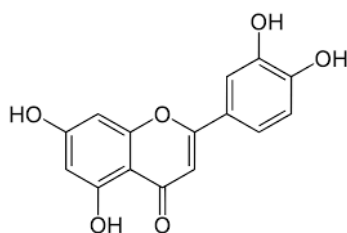
Prováděné testy prokázaly schopnost polyfenolů napomáhat ochraně imunitního systému organismu a také předcházet popálením kůže ze slunce způsobené ultrafialovým zářením [30]. Dále bylo zjištěno, že kromě protizánětlivých vlastností mají polyfenoly schopnost bojovat i s virovými onemocněními, jako je chřipka, herpes nebo SARS-CoV-2 [28]. V posledních letech byl učiněn pokrok ve výzkumu využití polyfenolů v okruhu biomedicíny, zejména v tkáňovém inženýrství, kde by mohly pomáhat při nahrazování poškozených tkání [29].

4. 2. 2. 1. Flavonoidy

Flavonoidy, patřící mezi polyfenoly, jsou sekundárními metabolity v rostlinách. Přirozeně se vyskytují v potravinách rostlinného původu a mají funkci ochrany rostlin. Mnoho se jich objevuje jako složky pigmentů květů, listů nebo stonků bylin. Mají antioxidační, protizánětlivé, antimutagenní a protinádorové účinky. Díky těmto vlastnostem jsou nepostradatelnými články ve farmaceutickém průmyslu a potravinářství. Flavonoidy mají mnoho podkategorií. Dělí se na flavony, flavonoly, flavanony, flavanoly, katechiny, antokyany a chalkony [31].

- *Luteolin*

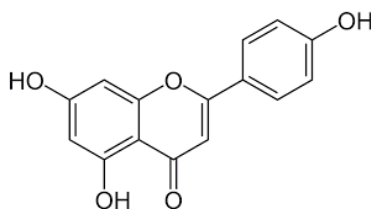
Luteolin je flavonoid spadající do podskupiny flavonů (Obr. 12). V přírodě je obsažen v mnoha léčivých rostlinách a zelenině, jako například v petrželi (*Petroselinum crispum*), celeru (*Apium graveolens*) nebo v listech perily (*Perilla frutescens*). Bohužel je jeho koncentrace v rostlinách velice nízká oproti jiným flavonoidům. V rostlinách se nejčastěji vyskytuje ve formě glykosidů. Luteolin má protizánětlivé a protinádorové účinky. Má obrovský potenciál sloužit jako preventivní léčivo, a také napomáhat jako lék v boji s rakovinou kůže [32].



Obr. 12: Strukturní vzorec luteolinu [64]

- *Apigenin*

Apigenin (Obr. 13) je látka patřící mezi flavony se sumárním vzorcem $C_{15}H_{10}O_5$. V přírodě se vyskytuje jako biapigenin (dimer) v ovoci (pomeranč, grapefruit), zelenině (petržel, cibule) a rostlinách (heřmánek, třezalka). V posledních letech byly prokázány jeho antioxidační a protizánětlivé vlastnosti a jeho schopnost účinkovat jako chemopreventivní činidlo proti rakovině [33].

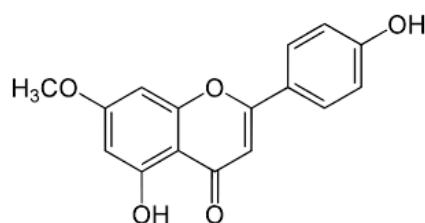


Obr. 13: Strukturní vzorec apigeninu [65]

- *Genkwanin*

Genkwanin je další flavonoid patřící mezi flavony (Obr. 14), který se v přírodě nachází v rostlinách, jako je lýkovec (*Daphne genkwa*), rozmarýn (*Salvia rosmarinus*), šalvěj (*Salvia*

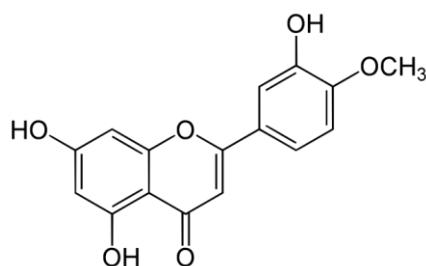
officinalis), nebo srdečník (*Leonurus cardiaca*). Výzkumy potvrdily jeho antioxidační, protizánětlivé, neuroprotektivní, protirakovinné a antidiabetické účinky. Svými vlastnostmi by mohl napomáhat jak léčbě rakoviny, tak léčbě cukrovky a onemocnění srdce [34].



Obr. 14: Strukturní vzorec genkwaninu [66]

- *Diosmetin*

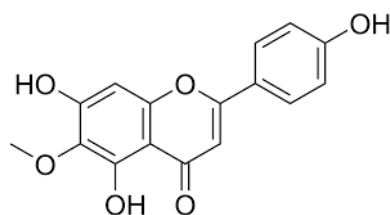
Diosmetin je flavonoid spadající do podkategorie flavonů (Obr. 15). V přírodě se vyskytuje běžně v rostlinách jako je rozmarýn (*Salvia rosmarinus*), nebo v plodinách, jako jsou olivy nebo citrusy (pomeranč, citron). Má velice rozsáhlé biologické vlastnosti – antioxidační, kardioprotektivní, protirakovinné a protizánětlivé účinky. Je významný jako aglykon diosminu, což je lék, který chrání cévy a léčí žilní nedostatečnost. Novější studie prokázaly jeho potenciální užití jako léčivo proti chřipce a jiným infekčním onemocněním (SARS-CoV-2) [35].



Obr. 15: Strukturní vzorec diosmetinu [67]

- *Hispidulin*

Hispidulin (Obr. 16) je flavonoidní látka s molekulovým vzorcem $C_{16}H_{12}O_6$. V přírodě je přítomen v rostlinách čeledi hluchavkovité (*Lamiaceae*) a hvězdčkovité (*Asteraceae*). Rozsáhlé výzkumy prokázaly jeho různorodé biologické vlastnosti (antifungální, protideštičkové, antikonvulzivní, protirakovinné). Hispidulin, stejně jako ostatní přírodní flavonoidy, má potenciál k léčbě rakoviny a k prevenci před vznikem nádorů [36].



Obr. 16: Strukturní vzorec hispidulinu [68]

4. 2. 2. 2. Fenolové kyseliny (FK)

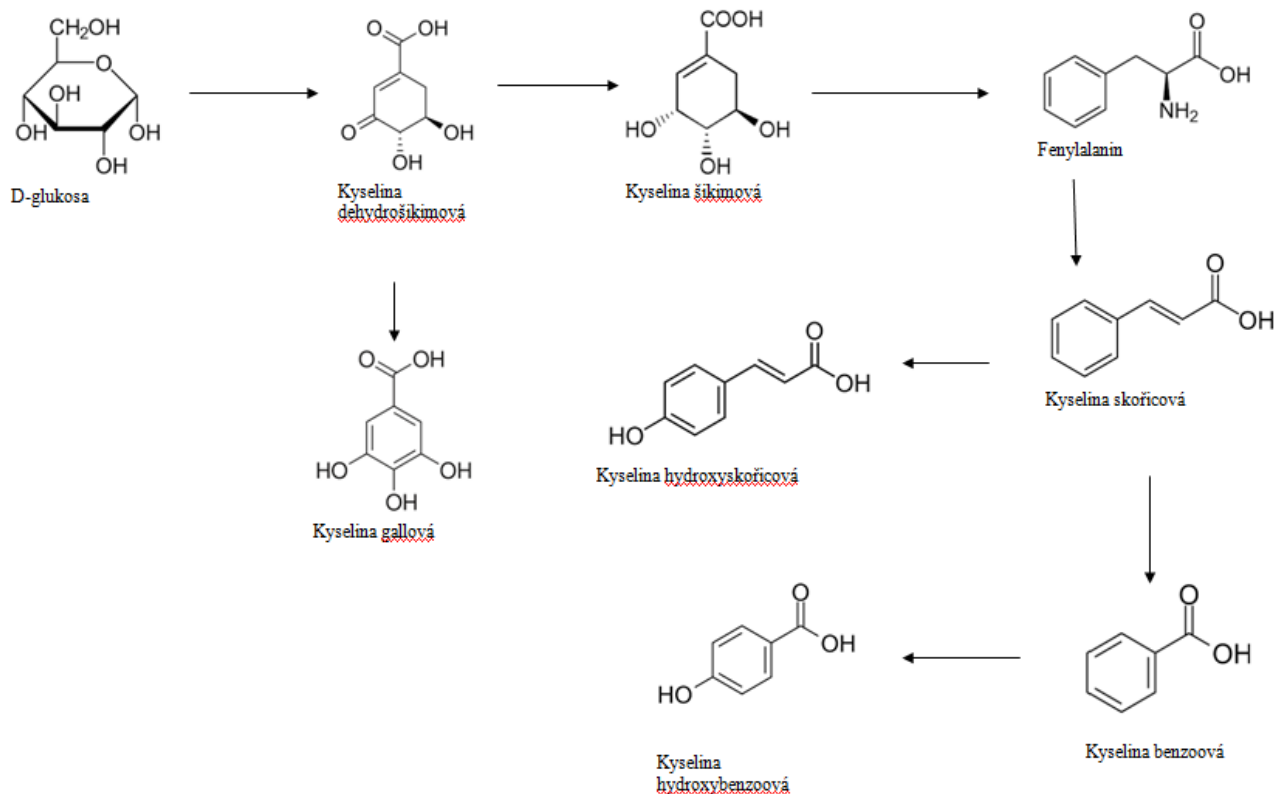
Fenolové kyseliny jsou deriváty fenolů s navázanou karboxylovou skupinou. Vychází ze skupiny sekundárních metabolitů polyfenolů spolu s flavonoidy. FK se dělí do dvou skupin podle základních kyselin, a to hydroxybenzoové kyseliny a hydroxyskořicové kyseliny. Hydroxyskořicová kyselina je odvozená od skořicové kyseliny a hydroxybenzoová kyselina je odvozená od benzoové kyseliny [37].

Syntéza FK v rostlinách probíhá pomocí šikimové kyseliny fenylpropanoidovou cestou. V principu se glukosa syntetizuje na dehydrošikimovou a šikimovou kyselinu. Dehydrošikimová kyselina se přemění na gallovou kyselinu a šikimová kyselina na fenylalanin. Pomocí fenylalaninamonné lyázy se fenylalanin syntetizuje na skořicovou kyselinu a uvolňuje se amoniak, který je potřebný u jiných syntéz. Benzoová kyselina se syntetizuje ze skořicové kyseliny při její ztrátě dvou uhlíkových atomů [37]. Schéma biosyntézy viz (Obr. 17).

V přírodě se FK vyskytují v nejrozličnějších rostlinách. Nachází se v ovoci (borůvka, banán, mango, jahoda, hruška, lesní bobule, citrusy), zelenině (artyčok, cibule, brambor), bylinách (rozmarýn, oregano, šalvěj, bazalka, tymián), obilovinách, luštěninách nebo v kávě [3]. V rostlinách jsou nejčastěji přítomny ve vázané formě, hydroxyskořicová kyselina je přítomna v podobě jednoduchého esteru s chinovou kyselinou nebo glukosou. Hydroxybenzoová kyselina se vyskytuje v nižší koncentraci než hydroxyskořicová kyselina, a to v konjugované podobě s cukry [37]. Mezi nejběžnější FK patří kávová kyselina, gallová kyselina, rozmarýnová kyselina, karnosová kyselina, p-kumarová kyselina, ferulová kyselina a chlorogenová kyselina [3].

V rostlinách mají ochrannou funkci před slunečním zářením, v boji s viry, bakteriemi, a ovlivňují barvu a vůni rostlin. Jsou významné především pro své antioxidační, protizánětlivé, protirakovinné, antimikrobiální, antialergické, antivirové, antitrombotické a hepatoprotektivní účinky [37].

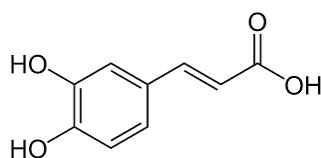
FK se využívají využití v kosmetice, potravinářství a v medicíně. Byly rovněž prokázány konzervační účinky FK, díky kterým se hojně používají v potravinářském průmyslu. Protože jsou FK obsaženy v ovoci a zelenině, jejich konzumací se do lidského těla dostávají antioxidanty, které jsou schopné předcházet srdečním onemocněním, chránit před UV zářením a rakovinou kůže jím způsobenou, snižovat úroveň oxidativního stresu, který způsobuje choroby jako je cukrovka a další. Studie prokázaly, že deriváty hydroxyskořicové a hydroxybenzoové kyseliny mají schopnost snižovat tvorbu nádoru a blokovat aktivitu mutagenních buněk [37].



Obr. 17: Schéma biosyntézy šikimovy dráhy (autor)

- Kávová kyselina

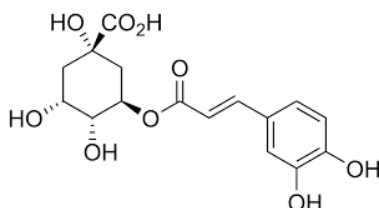
Kávová kyselina (Obr. 18) patří mezi polyfenolové sloučeniny a vychází ze struktury hydroxyskořicové kyseliny. V rostlinách slouží jako ochrana proti škůdcům, infekcím a ochraňuje rostlinu před ultrafialovým zářením B. Vyskytuje se v jednoduché nebo esterifikované podobě v potravinách jako jsou olivy, kávová zrna, brambory, ovoce nebo léčivé byliny. Ve formě monomerů se nachází jako estery organických sloučenin, cukrů, amidů nebo glykosidů, ale objevuje se i ve složitějších formách – dimerů nebo derivátů flavonoidů. Kyselina se vytváří v rostlinách pomocí šikimovy syntézy (Obr. 17), preparativně se získává extrakcí rostlinného materiálu rozpouštědlem při vysokých teplotách, případně organickou syntézou z L-tyrosinu [38]. Studie prokázaly znamenité biologické účinky kávové kyseliny. Patří mezi ně antivirové, antibakteriální, protizánětlivé, antiaterosklerotické, antidiabetické, kardioprotektivní, hepatoprotektivní a protirakovinné vlastnosti. Kyselina by mohla sloužit jako antioxidant, který by napomáhal v boji s nemocemi, jako je rakovina, cukrovka, obezita, Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba [39].



Obr. 18: Strukturní vzorec kávové kyseliny [69]

- *Chlorogenová kyselina*

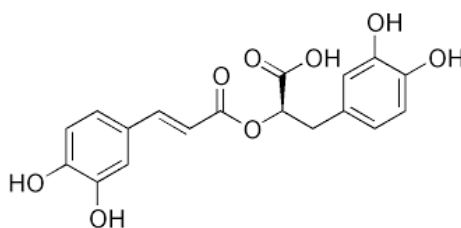
Chlorogenová kyselina (5-O-kofoeoylchinová kyselina) (Obr. 19) je fenolová sloučenina spadající do skupiny hydroxyskořicových kyselin. Je to ester kávové a chininové kyseliny. V přírodě se podobně jako kávová kyselina nachází v ovoci, bylinách, víně, čajích a kávě. Bylo prokázáno, že kyselina má antioxidační, protizánětlivé, protirakovinné, antidiabetické a antihypertenzní účinky. Díky svým rozsáhlým fyziologickým vlastnostem má kyselina potenciál k využití se jako doplněk stravy a ke konzervaci potravin. Působí proti šíření bakterií, kvasinek a plísní [40].



Obr. 19: Strukturní vzorec chlorogenové kyseliny [70]

- *Rozmarýnová kyselina*

Rozmarýnová kyselina (Obr. 20) je fenolová kyselina patřící do skupiny hydroxyskořicové kyseliny. Je to ester 3,4-dihydroxyfenylmléčné a kávové kyseliny. V přírodě se nachází hlavně v bylinách čeledi *Lamiaceae*. Poprvé byla izolována z rozmarýnu, později byla identifikována i v šalvěji, tymiánu, černohlávku, keři zlatice, oregánu nebo bazalce. Bylo prokázáno, že rozmarýnová kyselina má protirakovinné, antioxidační, antidiabetické, antimikrobiální, kardioprotektivní, antidepresivní, neuroprotektivní, protizánětlivé účinky a účinky proti stárnutí. Díky těmto vlastnostem dokáže posilovat obranný systém organismu v boji s bakteriemi, viry a plísněmi, stabilně vylučovat inzulin, napomáhat k obnově vlasových kořínek, nebo především snižovat úroveň oxidativního stresu, který je příčinou chorob, jako je vznik rakovinných buněk [13].



Obr. 20: Strukturní vzorec rozmarýnové kyseliny [71]

4. 3. Metody analýzy polyfenolů

Metody vhodné pro analýzu flavonoidů a fenolových kyselin v rostlinných vzorcích jsou vzhledem k povaze matrice separační metody, jako chromatografie na tenké vrstvě, elektromigrační metody, dále plynová chromatografie a především vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Už od počátku 60. let 20. století je TLC oblíbená při stanovení flavonoidů a fenolových kyselin přítomných v rostlinných produktech. Je to rychlý a jednoduchý způsob analýzy látek, jejichž kvantitativní množství se později určí pomocí jiných instrumentálních metod. K separaci směsi flavonoidů a fenolových kyselin se používá dvourozměrná TLC [41], [42].

Elektromigrační metody

Pro analýzu polyfenolů v potravinách se z elektromigračních metod používá nejvíce kapilární zónová elektroforéza (CZE) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) [43]. CZE je ideální pro analýzu nabitých částic, což fenolové kyseliny splňují. Mezi její výhody patří nízké náklady na provoz, rychlost a hlavně účinnost separace [44].

Plynová chromatografie (GC)

Stejně jako TLC byla plynová chromatografie už od počátku 60. let 20. století významnou separační technikou [45]. Polyfenoly obsažené v rostlinách je možné analyzovat i pomocí plynové chromatografie, i když jejich nízká těkavost komplikuje jejich stanovení touto metodou. Mezi důležité operace, které musí být provedeny před vlastní analýzou, patří zejména derivatizace polyfenolů, případně odstranění nežádoucích látek [46]. Protože FK nejsou dostatečně těkavé samy o sobě, musí se převést methylací pomocí trimethylsilanu (TMS) na těkavější deriváty. Pro detekci FK pomocí GC se používá zejména plamenově-ionizační detektor (FID) nebo spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) [41].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je metoda, která dominuje mezi ostatními separačními metodami z hlediska využití pro analýzu FK [47]. HPLC má schopnost od sebe oddělit i látky s nízkou těkavostí bez potřeby derivatizace.

Výhodou HPLC pro analýzu fenolových kyselin je možnost využití různých kolon, nebo možnost přepínání mezi dvěma kolonami během analýzy [41]. Kolona s obrácenou fází (RP) s náplní C18 je jednou z nejpoužívanějších při analýze fenolových kyselin. Polární mobilní fáze sestává ze směsi organického rozpouštědla a vody s obsahem solí [48].

Pro detekci fenolových látek se používá řada detektorů, zejména spektrofotometrický detektor v ultrafialové/viditelné oblasti (UV/VIS), elektrochemický detektor (ECD), fluorescenční detektor (FLD) a hmotnostní spektrometr (MS) [49].

Chaowuttikul společně s kolegy ve své práci využili detektor s diodovým polem (DAD) pro stanovení obsahu fenolových kyselin v rostlinném materiálu [50].

Jelikož fenolové kyseliny jsou elektroaktivní látky, je možné je stanovit pomocí elektrochemického detektoru. Ten ve své práci využil Salihovic se svými spolupracovníky pro měření obsahu rozmarýnové kyseliny v rostlinách čeledi *Lamiaceae* [51]. Podobně Jurič s kolegy využil pomocí elektrochemické detekce stanovení obsahu rozmarýnové kyseliny v masných produktech [52]. Jirovský analyzoval rozmarýnovou a další fenolové kyseliny pomocí HPLC-ECD v krevní plasmě prasat, která byla živena rostlinou *Prunella vulgaris* [47].

5. Experimentální část

5. 1. Instrumentace HPLC

Systém HPLC sestával z izokratické pumpy (LC-10AD, SCHIMADZU, Japonsko) s tlumičem pulsů, manuálního dávkovače s 20 μ l smyčkou a coulometrického detektoru III (ESA, Inc., Chelmsford, MA, USA) s dvouelektrodovou standardní analytickou celou (ESA, Model 5010). Tato cela je vybavena referentní hydrogen palladiovou elektrodou (Pd/H_2). Před dávkovačem byla umístěna guard cela pro odstranění nečistot z mobilní fáze (Thermo Scientific, Model 5020). Jako stacionární fáze byla použita kolona s reverzní fází C8 5 μ m, 250 mm x 2 mm NUCLEODUR (Macherey-Nagel, Německo). Pro vyhodnocení dat byl použit software Clarity (DataApex, Ver. 8.4, Česká republika). Pro dávkování vzorků byla použita skleněná 25 μ l stříkačka (Hamilton Co., Reno, NV, USA).

5. 1. 1. Chromatografické podmínky

Chromatografické podmínky, za kterých probíhaly HPLC analýzy uvedené v této práci, jsou popsány níže:

Jako stacionární fáze byla zvolena reverzní kolona C8 (viz 5.1.), mobilní fáze byla složena z fosfátového pufru a acetonitrilu (fosfátový pufr:acetonitril, 78:22, v:v). Průtoková rychlost byla nastavena na 0,15 ml/min. Coulometrický detektor byl vybaven dvěma pracovními elektrodami, kde na první elektrodě byl nastaven potenciál pro detekci $E_1 = 10$ mV (vs. Pd/H_2) a na druhé elektrodě byl potenciál $E_2 = 400$ mV (vs. Pd/H_2). Proudový rozsah obou elektrod byl nastaven na 5 μ A/V. Nastříkovaný objem vzorků byl 10 μ l.

5. 2. Použité chemikálie

Dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, Česká republika), acetonitril (HPLC – gradient grade, VWR Chemicals, Francie), ethanol (HPLC – grade, Fisher Scientific, UK), deionizovaná voda (Milipore, Francie).

5. 3. Vzorky

K analýze byly použity dva vzorky, komerční tinktura z rozmarýnu (A) a v laboratoři připravený extrakt ze sušeného rozmarýnu (B).

- A. Tinktura z pupenů rozmarýnu (výrobce: Mgr. Jarmila Podhorná, Naděje, Česká republika)
- B. Tinktura připravená ze sušeného rostlinného materiálu (výrobce: Valdemar Grešík, Česká republika), postup viz kapitola 5. 4. 3.

5. 4. Pracovní postup

5. 4. 1. Příprava mobilní fáze (MF)

100 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného ($c = 2 \cdot 10^{-2}$ mol/l) bylo za sníženého tlaku přefiltrováno na filtru o porozitě 0,22 μ m a pro kontrolu bylo změřeno pH. Vlastní mobilní fáze byla připravena smísením takto připraveného fosfátového pufru s acetonitrem (fosfátový pufr:acetonitril 78:22, v:v). Před použitím byla mobilní fáze odplyněna heliem.

5. 4. 2. Příprava roztoků standardů

Pro přípravu zásobních roztoků standardů rozmarýnové, kávové, chlorogenové a ferulové kyseliny bylo do vialek odváženo kolem 1 mg standardu kyselin rozpuštěných v 1,00 ml směsi methanol:deionizovaná voda (50:50, v:v). Tyto roztoky se dále ředily dle potřeby mobilní fáze, výsledné pracovní roztoky se přímo nastříkávaly do HPLC systému.

Směsný modelový vzorek

Do vialky byly odpipetovány stejné objemy pracovních roztoků standardů kyselin, směsný modelový vzorek se dále ředil dle potřeby mobilní fáze.

5. 4. 3. Zpracování a příprava vzorků

Pracovní postup pro přípravu tinktury ze sušeného rozmarýnu (B)

Bylo naváženo 20,01 g sušeného rozmarýnu a materiál byl převeden do reagenční láhve. Droga byla zalita 80 ml směsi ethanol:deionizovaná voda (50:50, v:v). Macerát byl uložen po dobu 4 týdnů na tmavém místě a občas protřepán.

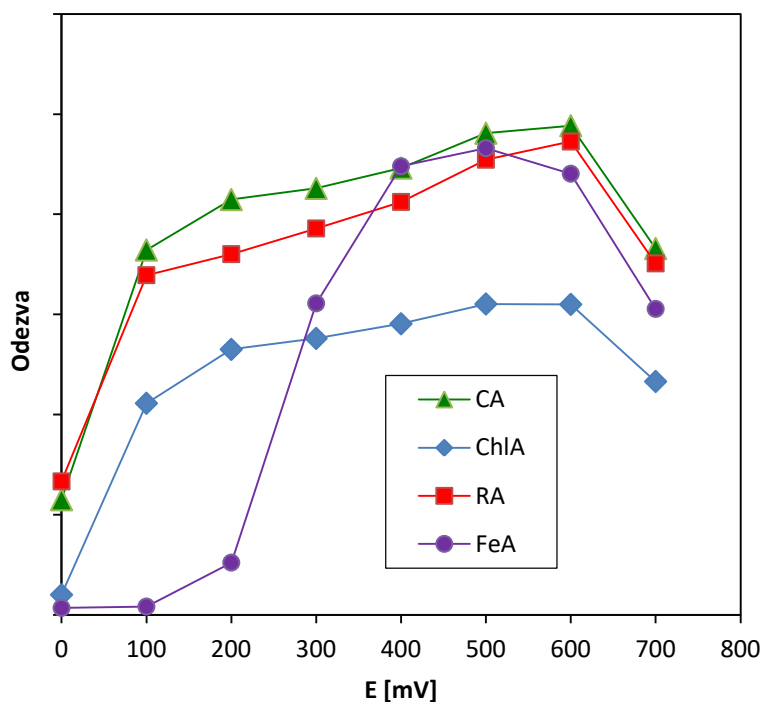
Úprava vzorků před HPLC analýzou

Před HPLC analýzou byly tinktury přefiltrovány přes diskový filtr a centrifugovány při 3 000 otáčkách po dobu 5 minut. V případě komerční tinktury (A) byl odebraný vzorek 10x zředěn mobilní fází, v případě připraveného macerátu ze sušeného rozmarýnu (B) byl vzorek zředěn mobilní fází 200x.

6. Výsledky a diskuze

6. 1. Hydrodynamický voltamogram

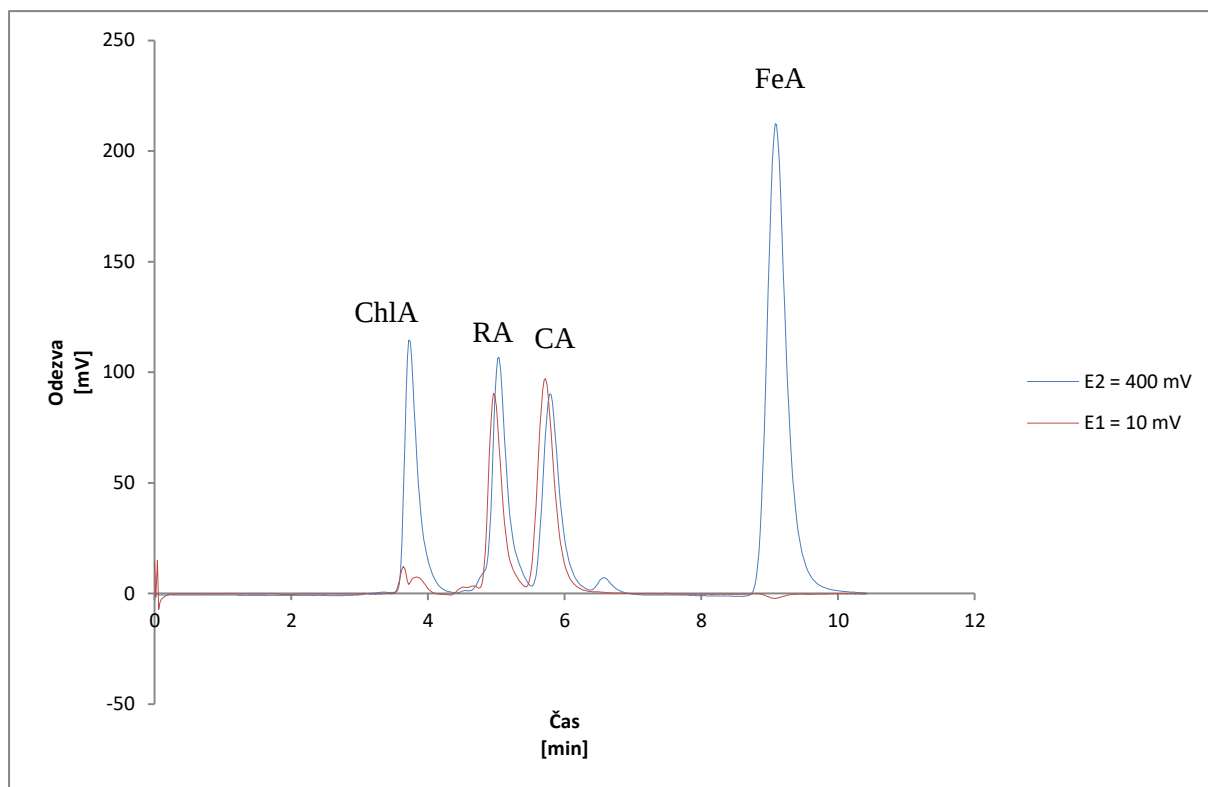
Pro určení optimálního pracovního potenciálu pro analýzu rozmarýnové (RA), kávové (CA), chlorogenové (ChlA) a ferulové (FeA) kyseliny byly sestaveny hydrodynamické voltamogramy analytů. Roztoky standardů kyselin měly pro analýzu koncentraci 0,01 mg/ml. Měřila se závislost výšky píku kyselin na vloženém napětí. Počáteční měření probíhalo při napětí 0 mV vloženém na pracovní elektrodě, dále se napětí zvyšovalo o 100 mV až do napětí 700 mV.



Obr. 21: Hydrodynamický voltamogram studovaných fenolových kyselin (autor)

Hydrodynamický voltamogram ukazuje, jak se kyseliny chovají při různých hodnotách napětí vloženého na pracovní elektrodu. Na Obr. 21 lze vidět, že kyseliny (RA, CA) poskytují odezvu už při napětí 0 mV, jedná se tedy o velmi snadno elektrochemicky oxidovatelné látky. ChlA poskytuje proudovou odezvu až při napětí 100 mV a FeA až od napětí 200 mV. K největší proudové odezvě u všech kyselin došlo při vloženém napětí v rozmezí 400-600 mV. Pro další experimentální práce byl zvolen potenciál 10 mV na první elektrodě a potenciál 400 mV na druhé elektrodě. Tyto hodnoty poskytovaly dobrou selektivitu detekce a poměr signálů na obou kanálech (E_1/E_2) bylo možné využít jako identifikační charakteristiku studovaných analytů.

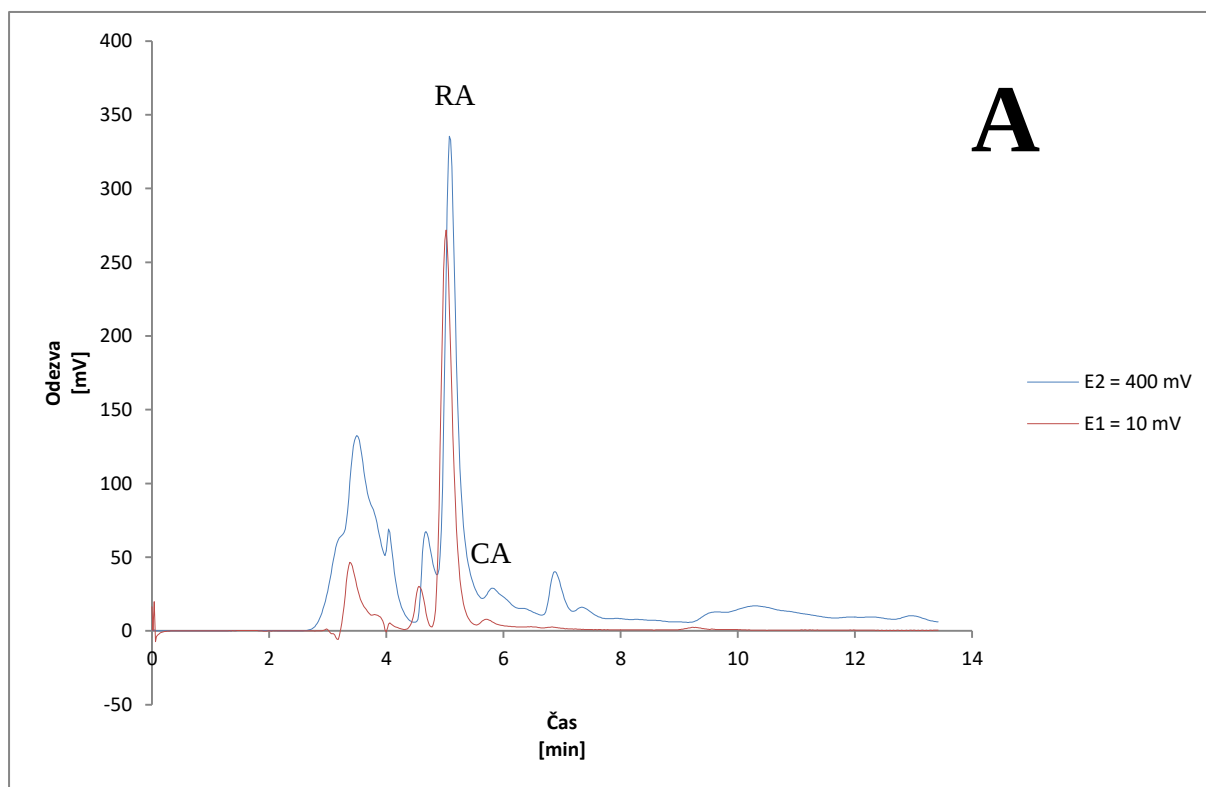
6. 2. Analýza standardů kyselin



Obr. 22: Chromatogram směsného modelového vzorku (autor)

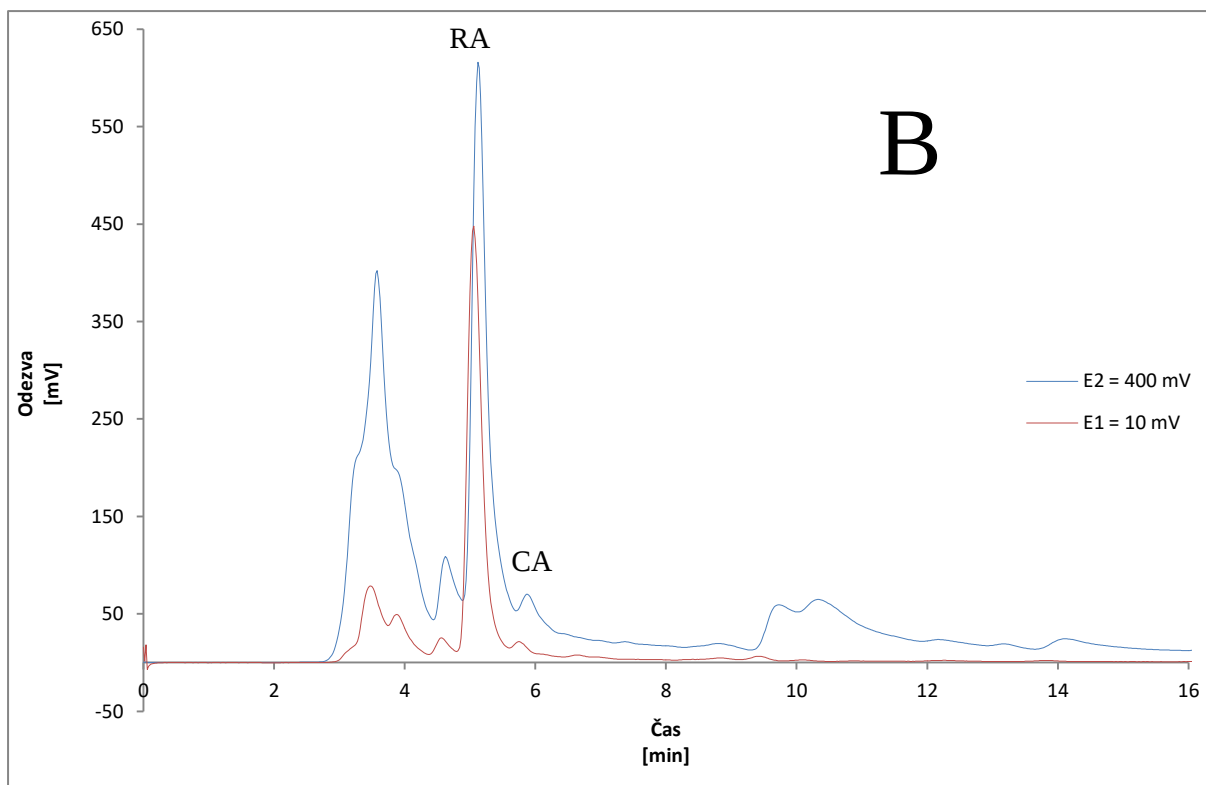
Na doporučení vedení laboratoře byla zvolena mobilní fáze připravená z fosfátového pufru a acetonitrilu (viz. 5. 4. 1.), která dokázala separovat standardy kyselin ve směsném modelovém vzorku. Všechny sledované analyty byly rozděleny do 10 minut. Při napětí 10 mV na první elektrodě (E_1) a 400 mV na druhé elektrodě (E_2) jsou na Obr. 22 zobrazeny dobře separované a detekované píky standardů kyselin. U RA a CA je patrné, že se kyseliny dobře oxidují a dochází k téměř totožné odezvě na obou kanálech (E_1/E_2). Kapacitní faktor ChlA je nízký, nicméně přítomnost této kyseliny se v reálném vzorku nepředpokládá. ChlA je dobře oxidovatelná až při napětí 400 mV (E_2) (viz Obr. 21), u 10 mV (E_1) je odezva látky nízká. FeA má vysokou odezvu při napětí 400 mV (E_2), při napětí 10 mV (E_1) poskytuje tato látka záporný (redukční) pík. Při ještě nižším vloženém potenciálu by byl redukční pík více znatelný.

6. 3. Analýza vzorků tinktur



Obr. 23: Chromatogram vzorku komerční tinktury (A) (autor)

Vzorek komerční tinktury (A) byl analyzován za stejných podmínek jako směs standardů. Vzorek byl před analýzou 10x zředěn mobilní fází, jak je popsáno v kapitole 5. 4. 3.. Obr. 24 zobrazuje chromatogram vzorku komerční tinktury, kde lze bezpečně identifikovat pouze pík rozmarýnové kyseliny (RA), a to jednak na základě shody retenčních časů s příslušným standardem (viz Obr. 22), a také na základě shodného poměru signálů na obou kanálech (E_1/E_2). Kávová kyselina (CA) se eluuje ve stejný retenční čas jako její standard, ale z důvodu jiných interferujících látek ve směsi při napětí 400 mV (E_2) v podobném retenčním čase není možné spolehlivě využít identifikaci na základě poměru signálů E_1/E_2 , ale pouze na základě shody retenčního času píku se standardem CA. Ve vzorku komerční tinktury nebyla detekována ferulová kyselina ani chlorogenová kyselina.



Obr. 24: Chromatogram vzorku macerátu ze sušeného rozmarýnu (B) (autor)

Postup přípravy macerátu je zmíněn v předchozí kapitole (viz 5. 4. 3.). Před HPLC analýzou tinktury ze sušeného rozmarýnu (B) musel být vzorek 200x zředěn. Pro analýzu látek obsažených v macerátu byly použity stejné podmínky, jako pro analýzu standardů kyselin a komerční tinktury (A). Látku, kterou dokážeme z Obr. 24 bezpečně identifikovat, je rozmarýnová kyselina, protože se eluuje ve stejném retenčním čase jako standard RA (viz Obr. 22) a poměr odezvy na první a druhé elektrodě (E_1/E_2) je také srovnatelný jako u standardu. Kávová kyselina se eluuje ve stejný retenční čas jako její standard (viz Obr. 22), ale poměr odezvy obou kanálů (E_1/E_2) se oproti standardu liší, jako v případě analýzy vzorku (A). Lze tedy kávovou kyselinu identifikovat pouze pomocí shody retenčního času se standardem. Chlorogenová a ferulová kyselina nebyla v macerátu sušeného rozmarýnu nalezena.

6. 4. Porovnání obsahu RA u obou tinktur

Pro odhad obsahu RA lze porovnat plochy píků příslušející RA v macerátu sušeného rozmarýnu a v komerční tinktuře. Porovnáním ploch píků rozmarýnové kyseliny a připočítáním zředovacího faktoru [Fk] je možné porovnat obsah rozmarýnové kyseliny mezi komerční tinkturou a macerátem připraveným v laboratoři. V Tabulce č. 1 jsou uvedeny hodnoty ploch píků rozmarýnové kyseliny a zředovací faktory reálných vzorků.

Tab. 1: Naměřené plochy píků RA v reálných vzorcích, zředovací faktor reálných vzorků:

Reálný vzorek:	Plocha (A) píku RA [mV*s]	Fk:
(A) komerční tinktura	3725	10
(B) tinktura ze sušeného rozmarýnu	6634	200

Výpočet:

$$\frac{A_{\text{macer. suš.roz.}}}{A_{\text{kom.tin.}}} * \frac{Fk_{\text{macer.suš.roz.}}}{Fk_{\text{kom.tin.}}} = \frac{6634}{3725} * \frac{200}{10} \cong 35x \quad (1)$$

Z výše uvedeného výpočtu vyplývá, že obsah rozmarýnové kyseliny v macerátu připraveném v laboratoři je asi 35x vyšší než v komerční tinktuře.

7. Závěr

Cílem bylo vypracovat bakalářskou práci, poskytující základní informace o rozmarýnu lékařském z hlediska botanického charakterizace, a rovněž o historii jeho využití až do současnosti. Dále jsou diskutovány jeho léčebné účinky a využití v medicíně. Větší pozornost dostalo téma fytochemického složení rostliny, kdy je podán přehled nejvíce zastoupených sekundárních látek v rozmarýnu, jako jsou terpeny, flavonoidy a zejména pak fenolové kyseliny. V další části práce jsou zmíněny nejčastěji používané metody analýzy polyfenolů v rostlinných matricích.

V praktické části je popsána instrumentace, chromatografické podmínky a postupy přípravy vzorků pro analýzu vybraných fenolových látek. S využitím metody HPLC-ED byla analyzována modelová směs čtyřech vybraných fenolových kyselin, a to rozmarýnové kyseliny, kávové kyseliny, chlorogenové kyseliny a ferulové kyseliny. Ze čtyř kyselin v reálných vzorcích byla analýzou potvrzena pouze přítomnost rozmarýnové a kávové kyseliny. U obou vzorků byl porovnán relativní obsah rozmarýnové kyseliny. Tinktura připravená tradičním způsobem (macerací byliny v ethanolickém roztoku) obsahovala zhruba 35x více rozmarýnové kyseliny než tinktura z prodejní sítě.

8. Seznam použité literatury

- [1] L. M. de Macedo *et al.*, „Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and Its Topical Applications: A Review", *Plants Basel Switz.*, roč. 9, č. 5, s. 651, kvě. 2020, doi: 10.3390/plants9050651.
- [2] A. Anadón, M. R. Martínez-Larrañaga, I. Ares, a M. A. Martínez, „Chapter 60 - Interactions between Nutraceuticals/Nutrients and Therapeutic Drugs", in *Nutraceuticals*, R. C. Gupta, Ed., Boston: Academic Press, 2016, s. 855–874. doi: 10.1016/B978-0-12-802147-7.00060-7.
- [3] S. Kiokias, C. Proestos, a V. Oreopoulou, „Phenolic Acids of Plant Origin—A Review on Their Antioxidant Activity In Vitro (O/W Emulsion Systems) Along with Their in Vivo Health Biochemical Properties", *Foods*, roč. 9, č. 4, s. 534, dub. 2020, doi: 10.3390/foods9040534.
- [4] „Rosemary - *Salvia rosmarinus* | Plants | Kew". Viděno: 27. listopad 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.kew.org/plants/rosemary>
- [5] F. Pappachan, A. Suku, a S. Mohanan, „Chapter 10 - *Rosmarinus officinalis*", in *Herbs, Spices and Their Roles in Nutraceuticals and Functional Foods*, A. Amalraj, S. Kuttappan, K. Varma A.C., a A. Matharu, Ed., Academic Press, 2023, s. 149–170. doi: 10.1016/B978-0-323-90794-1.00017-X.
- [6] „824d2982-0b7c-40d9-b3d9-9e5d823d295c.pdf". Viděno: 27. listopad 2023. [Online]. Dostupné z: https://www.herbsociety.org/file_download/inline/824d2982-0b7c-40d9-b3d9-9e5d823d295c
- [7] „THE BENEFITS, USES, AND HISTORY OF ROSEMARY OIL & THE ROSEMARY PLA". Viděno: 27. listopad 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.saje.com/en-io/blogs/ingredient-garden/rosemary>
- [8] „History Of Rosemary - Learn About Rosemary Herbal Uses - Gardening Know How's Blog". Viděno: 27. listopad 2023. [Online]. Dostupné z: <https://blog.gardeningknowhow.com/tbt/history-of-rosemary-plants/>
- [9] „Rosemary Health Benefits, Nutrients per Serving, Preparation Information, and More". Viděno: 27. listopad 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.webmd.com/diet/health-benefits-rosemary>
- [10] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (EFSA ANS Panel) *et al.*, „Refined exposure assessment of extracts of rosemary (E 392) from its use as food additive", *EFSA J.*, roč. 16, č. 8, s. e05373, 2018, doi: 10.2903/j.efsa.2018.5373.
- [11] E. Aziz *et al.*, „Rosemary species: a review of phytochemicals, bioactivities and industrial applications", *South Afr. J. Bot.*, roč. 151, s. 3–18, pro. 2022, doi: 10.1016/j.sajb.2021.09.026.
- [12] M. Ghasemzadeh Rahbardar a H. Hosseinzadeh, „Therapeutic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its active constituents on nervous system disorders", *Iran. J. Basic Med. Sci.*, roč. 23, č. 9, s. 1100–1112, zář. 2020, doi: 10.22038/ijbms.2020.45269.10541.
- [13] M. Nadeem *et al.*, „Therapeutic Potential of Rosmarinic Acid: A Comprehensive Review", *Appl. Sci.*, roč. 9, č. 15, Art. č. 15, led. 2019, doi: 10.3390/app9153139.
- [14] „microbiology-guide-interpreting-mic.pdf". Viděno: 17. leden 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.idexx.com/files/microbiology-guide-interpreting-mic.pdf>
- [15] J. M. Andrade, C. Faustino, C. Garcia, D. Ladeiras, C. P. Reis, a P. Rijo, „*Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity", *Future Sci. OA*, roč. 4, č. 4, s. FSO283, dub. 2018, doi: 10.4155/fsoa-2017-0124.
- [16] F. J. González-Minero, L. Bravo-Díaz, a A. Ayala-Gómez, „*Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary): An Ancient Plant with Uses in Personal Healthcare and Cosmetics", *Cosmetics*, roč. 7, č. 4, Art. č. 4, pro. 2020, doi: 10.3390/cosmetics7040077.

- [17] „Terpen | Esenciální oleje, aromaterapie, vůně | Britannica". Viděno: 8. leden 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/terpene>
- [18] „Kafr | Definice, vzorec, použití a fakta | Britannica". Viděno: 8. leden 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/camphor>
- [19] M. Allenspach a C. Steuer, „ α -Pinene: A never-ending story", *Phytochemistry*, roč. 190, s. 112857, říj. 2021, doi: 10.1016/j.phytochem.2021.112857.
- [20] R. Pries, S. Jeschke, A. Leichtle, a K.-L. Bruchhage, „Modes of Action of 1,8-Cineol in Infections and Inflammation", *Metabolites*, roč. 13, č. 6, Art. č. 6, čer. 2023, doi: 10.3390/metabo13060751.
- [21] R. Ma, D. Lu, J. Wang, Q. Xie, a J. Guo, „Comparison of pharmacological activity and safety of different stereochemical configurations of borneol: L-borneol, D-borneol, and synthetic borneol", *Biomed. Pharmacother.*, roč. 164, s. 114668, srp. 2023, doi: 10.1016/j.biopha.2023.114668.
- [22] E. B. Russo a J. Marcu, „Chapter Three - Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads", in *Advances in Pharmacology*, roč. 80, D. Kendall a S. P. H. Alexander, Ed., in Cannabinoid Pharmacology, vol. 80. , Academic Press, 2017, s. 67–134. doi: 10.1016/bs.apha.2017.03.004.
- [23] S. Baek *et al.*, „Camphene Attenuates Skeletal Muscle Atrophy by Regulating Oxidative Stress and Lipid Metabolism in Rats", *Nutrients*, roč. 12, č. 12, s. 3731, pro. 2020, doi: 10.3390/nu12123731.
- [24] L. B. Eddin, N. K. Jha, M. F. N. Meeran, K. K. Kesari, R. Beiram, a S. Ojha, „Neuroprotective Potential of Limonene and Limonene Containing Natural Products", *Molecules*, roč. 26, č. 15, Art. č. 15, led. 2021, doi: 10.3390/molecules26154535.
- [25] S. Birtić, P. Dussort, F.-X. Pierre, A. C. Bily, a M. Roller, „Carnosic acid", *Phytochemistry*, roč. 115, s. 9–19, čvc. 2015, doi: 10.1016/j.phytochem.2014.12.026.
- [26] S. Fulda, „Betulinic Acid for Cancer Treatment and Prevention", *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 9, č. 6, Art. č. 6, čer. 2008, doi: 10.3390/ijms9061096.
- [27] V. Khwaza, O. O. Oyedeji, a B. A. Aderibigbe, „Ursolic Acid-Based Derivatives as Potential Anti-Cancer Agents: An Update", *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 21, č. 16, Art. č. 16, led. 2020, doi: 10.3390/ijms21165920.
- [28] K. Chojnacka, D. Skrzypczak, G. Izydorczyk, K. Mikula, D. Szopa, a A. Witek-Krowiak, „Antiviral Properties of Polyphenols from Plants", *Foods*, roč. 10, č. 10, Art. č. 10, říj. 2021, doi: 10.3390/foods10102277.
- [29] Y. Liu, Y. Shi, M. Zhang, F. Han, W. Liao, a X. Duan, „Natural polyphenols for drug delivery and tissue engineering construction: A review", *Eur. J. Med. Chem.*, roč. 266, s. 116141, úno. 2024, doi: 10.1016/j.ejmech.2024.116141.
- [30] S. Saric a R. K. Sivamani, „Polyphenols and Sunburn", *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 17, č. 9, Art. č. 9, zář. 2016, doi: 10.3390/ijms17091521.
- [31] A. N. Panche, A. D. Diwan, a S. R. Chandra, „Flavonoids: an overview", *J. Nutr. Sci.*, roč. 5, s. e47, led. 2016, doi: 10.1017/jns.2016.41.
- [32] G. Seelinger, I. Merfort, U. Wölflle, a C. M. Schempp, „Anti-carcinogenic Effects of the Flavonoid Luteolin", *Molecules*, roč. 13, č. 10, Art. č. 10, říj. 2008, doi: 10.3390/molecules13102628.
- [33] S. Shukla a S. Gupta, „Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention", *Pharm. Res.*, roč. 27, č. 6, s. 962–978, čer. 2010, doi: 10.1007/s11095-010-0089-7.
- [34] N. El Menyiy *et al.*, „Genkwanin: An emerging natural compound with multifaceted pharmacological effects", *Biomed. Pharmacother.*, roč. 165, s. 115159, zář. 2023, doi: 10.1016/j.biopha.2023.115159.

- [35] M. Wujec a M. Feldo, „Can We Improve Diosmetin Activity? The State-of-the-Art and Promising Research Directions", *Molecules*, roč. 28, č. 23, Art. č. 23, led. 2023, doi: 10.3390/molecules28237910.
- [36] K. Liu, F. Zhao, J. Yan, Z. Xia, D. Jiang, a P. Ma, „Hispidulin: A promising flavonoid with diverse anti-cancer properties", *Life Sci.*, roč. 259, s. 118395, říj. 2020, doi: 10.1016/j.lfs.2020.118395.
- [37] N. Kumar a N. Goel, „Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications", *Biotechnol. Rep.*, roč. 24, s. e00370, srp. 2019, doi: 10.1016/j.btre.2019.e00370.
- [38] K. M. M. Espíndola *et al.*, „Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma", *Front. Oncol.*, roč. 9, s. 541, čer. 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00541.
- [39] N. Pavlíková, „Caffeic Acid and Diseases—Mechanisms of Action", *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 24, č. 1, Art. č. 1, led. 2023, doi: 10.3390/ijms24010588.
- [40] J. Santana-Gálvez, L. Cisneros-Zevallos, a D. A. Jacobo-Velázquez, „Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome", *Molecules*, roč. 22, č. 3, Art. č. 3, bře. 2017, doi: 10.3390/molecules22030358.
- [41] C. D. Stalikas, „Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids", *J. Sep. Sci.*, roč. 30, č. 18, s. 3268–3295, 2007, doi: 10.1002/jssc.200700261.
- [42] M. Sikorska, I. Matławska, K. Głowniak, a G. Zgórk, „Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids in *Asclepias syriaca* L", *Acta Pol. Pharm.*, roč. 57, s. 69–72, led. 2000.
- [43] V. García-Cañas a A. Cifuentes, „Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis", *ELECTROPHORESIS*, roč. 29, č. 1, s. 294–309, 2008, doi: 10.1002/elps.200700438.
- [44] X.-J. Zhou, J. Chen, a Y.-P. Shi, „Rapid and sensitive determination of polyphenols composition of unifloral honey samples with their antioxidant capacities", *Cogent Chem.*, roč. 1, č. 1, s. 1100527, pro. 2015, doi: 10.1080/23312009.2015.1100527.
- [45] K. D. Bartle a P. Myers, „History of gas chromatography", *TrAC Trends Anal. Chem.*, roč. 21, č. 9, s. 547–557, zář. 2002, doi: 10.1016/S0165-9936(02)00806-3.
- [46] P. Viñas, N. Campillo, N. Martínez-Castillo, a M. Hernández-Córdoba, „Solid-phase microextraction on-fiber derivatization for the analysis of some polyphenols in wine and grapes using gas chromatography–mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, roč. 1216, č. 9, s. 1279–1284, úno. 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2008.12.058.
- [47] D. Jirovský, P. Kosina, M. Myslíková, J. Stýskala, J. Ulrichová, a V. Simánek, „HPLC analysis of rosmarinic acid in feed enriched with aerial parts of *Prunella vulgaris* and its metabolites in pig plasma using dual-channel coulometric detection", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 55, č. 19, s. 7631–7637, zář. 2007, doi: 10.1021/jf070883e.
- [48] K. Štulík, *Analytické separační metody*. Karolinum, 2004.
- [49] B. L. Reuhs, „High-Performance Liquid Chromatography", in *Food Analysis*, S. S. Nielsen, Ed., Cham: Springer International Publishing, 2017, s. 213–226. doi: 10.1007/978-3-319-45776-5_13.
- [50] C. Chaowuttikul, C. Palanuvej, a N. Ruangrunsi, „Quantification of chlorogenic acid, rosmarinic acid, and caffeic acid contents in selected Thai medicinal plants using RP-HPLC-DAD", *Braz. J. Pharm. Sci.*, roč. 56, s. e17547, bře. 2020, doi: 10.1590/s2175-97902019000317547.
- [51] M. Salihovic, B. Dilberovic, J. Toromanovic, I. Tahirovic, J. Krvavac, a E. Sofic, „Quantification of rosmarinic acid and caffeic acid in some plants of family Lamiaceae

- using high performance liquid chromatography with electrochemical detection", *Planta Med.*, roč. 76, č. 12, s. P290, srp. 2010, doi: 10.1055/s-0030-1264588.
- [52] U. Jurič, M. Slemnik, a M. Škerget, „The new rapid and accurate analytical HPLC-ECD method for the determination of rosmarinic acid in meat products", *J. Food Sci.*, roč. 86, č. 10, s. 4491–4499, 2021, doi: 10.1111/1750-3841.15890.
- [53] „Rosemary Monograph", HerbRally. Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.herbrally.com/monographs/rosemary>
- [54] Citrus-shop.cz, „ROZMARYN LÉKAŘSKÝ - SALVIA ROSMARINUS - Citrus-shop.cz". Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.citrus-shop.cz/blog-souteze/rozmaryn-lekarsky-salvia-rosmarinus>
- [55] „Camphor", *Wikipedia*. 17. duben 2024. Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Camphor&oldid=1219311326>
- [56] „Pinene", *Wikipedia*. 17. duben 2024. Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Pinene&oldid=1219392466>
- [57] „Soubor:1,8-Cineol.svg – Wikipedie". Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1,8-Cineol.svg>
- [58] „Borneol", *Wikipedia*. 25. prosinec 2023. Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Borneol&oldid=1191680666>
- [59] „Camphene | C10H16 | ChemSpider". Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.83259.html>
- [60] „(-)-Limonene ((S)-(-)-Limonene) | MedChemExpress", MedchemExpress.com. Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: https://www.medchemexpress.com/_S_-_-_Limonene.html
- [61] „Carnosic acid", *Wikipedia*. 8. červen 2023. Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Carnosic_acid&oldid=1159150321
- [62] „Chemical structure of betulinic acid.", ResearchGate. Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-betulinic-acid_fig2_248396740
- [63] „-Chemical structure of ursolic acid. | Download Scientific Diagram". Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-ursolic-acid_fig1_290531988
- [64] „Luteolin", *Wikipedia*. 12. duben 2024. Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Luteolin&oldid=1218557205>
- [65] „Apigenin", *Wikipedia*. 29. duben 2024. Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Apigenin&oldid=1221353301>
- [66] „Genkwanin", *Wikipedia*. 6. září 2023. Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Genkwanin&oldid=1174053321>
- [67] „Diosmetin", *Wikipedia*. 29. červenec 2023. Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Diosmetin&oldid=1167651909>
- [68] „Hispidulin", *Wikipedia*. 2. květen 2023. Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Hispidulin&oldid=1152849102>
- [69] „Caffeic acid", *Wikipedia*. 24. duben 2024. Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Caffeic_acid&oldid=1220551970
- [70] „Chlorogenic acid", *Wikipedia*. 28. únor 2024. Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Chlorogenic_acid&oldid=1210898660
- [71] „Rosmarinic acid", *Wikipedia*. 13. leden 2024. Viděno: 29. duben 2024. [Online]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Rosmarinic_acid&oldid=1195318454