

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Biologická aktivita extraktů z *Alliaria petiolata*

Diplomová práce

Bc. Andrey Satornik

Kvalita a zpracování zemědělských produktů

Vedoucí práce: Ing. Pavel Nový, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Biologická aktivita extraktů z *Alliaria petiolata*" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24.07.2020

Poděkování

Autor vyjadřuje hlubokou vděčnost vedoucímu doktorovi Novému za pomoc a podporu při provádění práce, považuje za příjemnou povinnost poděkovat pracovníkům Katedry kvality a bezpečnosti potravin za pomoc při experimentálním výzkumu.

Biologická aktivita extraktů z *Alliaria petiolata*

Souhrn

Problém nalezení nových rostlinných zdrojů biologicky aktivních látek je v současné době aktuální. Tato práce je zaměřena na studium biologické aktivity éterického oleje a alkoholového extraktu získaného z česnáčku lékařského (*Alliaria petiolata*).

Byla studována antimikrobiální aktivita silice i extraktu proti řadě mikroorganismů (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*) pomocí bujónové mikrodiluční metody. Dále bylo analyzováno chemické složení silice pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) a byla testována antioxidační aktivita extraktu metodou DPPH.

Esenciální olej i extrakt vykazovaly antimikrobiální aktivitu pouze vůči *B.cereus*. Největší inhibiční účinek proti tomuto kmenu měl alkoholový extrakt při minimální inhibiční koncentraci 256 µg/ml. GC-MS analýzou byly jako hlavní složky identifikovány phytol (51,11%), hexahydrofarnesyl acetone (27,12%) a (E)-β-ionone (6,20%). Lihový extrakt vykazoval antioxidační aktivitu odpovídající 50,1 µg ekvivalentu vitamínu C/mg extraktu.

Toto je první práce, ve které byla podrobně studována antimikrobiální a antioxidační antioaktivita extraktu a silice česnáčku lékařského.

Klíčová slova: antimikrobiální aktivita, antioxidační aktivita, silice, česnáček lékařský

Biological activity of *Alliaria petiolata* extracts

Summary

The problem of finding new plant sources of biologically active substances is currently relevant. This work is focused on the study of the biological activity of essential oil and alcoholic extract obtained from garlic (*Alliaria petiolata*).

The antimicrobial activity of essential oil and extract against a number of microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*) was studied using a broth microdilution method. Furthermore, the chemical composition of the essential oil was analyzed by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) and the antioxidant activity of the extract was tested by DPPH.

Both the essential oil and the extract showed antimicrobial activity only against *B. cereus*. The alcohol extract had the greatest inhibitory effect against this strain at a minimum inhibitory concentration of 256 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Gyt-MS identified phytol (51.11%), hexahydrofarnesyl acetone (27.12%) and (E) - β -ionone (6.20%) as major components. The alcoholic extract showed an antioxidant activity corresponding to 50.1 μg vitamin C equivalent / mg extract. This is the first work in which the antimicrobial and antioxidant activity of garlic extract and essential oil was studied in detail

Keywords: antimicrobial activity, antioxidant activity, essential oil, garlic mustard

Obsah

1 Úvod	7
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3 Literární rešerše	9
3.1 Éterické oleje	9
3.1.1 Historie éterických olejů	9
3.1.2 Složení éterických olejů	10
3.1.2.1 Terpeny.....	12
3.1.3 Získání éterických olejů	13
3.1.4 Chromatografická analýza éterických olejů	15
3.1.5 Použití a účinek éterických olejů.....	16
3.1.6 Význam v potravinářství	18
3.1.7 Současný stav výzkumu složení éterických olejů	18
3.1.8 Způsoby stanovení antioxidantní aktivity	19
3.1.8.1 Elektrochemické metody	20
3.1.8.1.1 Amperometrická metoda.	20
3.1.8.1.2 Coulometrická metoda.	20
3.1.8.1.3 Metoda voltametrie.	20
3.1.8.2 Chromatografické metody	20
3.1.8.3 Spektrální metody.....	21
3.1.8.3.1 Spektrofotometrická metoda	21
3.1.8.3.2 Metoda DPPH.....	21
3.1.8.3.3 Metody založené na schopnosti inhibovat autooxidaci adrenalinu	22
3.1.9 Metody stanovení citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám	22
3.1.9.1 Disková difuzní metoda.....	23
3.1.9.2 Metody diluční	24
3.1.9.3 E-test.....	25
3.1.10 Antimikrobiální a antioxidantní aktivita éterických olejů	26
3.2 Extrakty	28
3.2.1 Technologie extrakce biologicky aktivních látek.....	28
3.4 Současný stav výzkumu rostlin čeledi Brassicaceae	30
3.4.1 Česnáček lékařský (<i>Alliaria petiolata</i>)	31
3.4.1.1 Botanická charakteristika a rozšíření	31
3.4.1.2 Tradiční využití	32
3.4.1.3 Biologická aktivita	32
3.4.1.3 Obsahové látky	33
4 Metodika	34

4.1	Strukturura výzkumu	34
4.2	Sběr rostlinného materiálu a příprava vzorků Ошибка! Закладка не определена.	
4.3	Chemikálie a kultivační média	35
4.4	Přístrojové vybavení.....	35
4.5	Destilace silice.....	35
4.6	Příprava lihového extraktu	36
4.7	Použité mikroorganismy	36
4.8	Příprava médií a inokula.....	36
4.9	Stanovení minimální inhibiční koncentrace bujónovou mikrodiluční metodou.....	37
	4.9.1 Postup.....	37
	4.9.2 Vyhodnocení.....	38
4.10	Antioxidační aktivita	38
4.11	GC-MS analýza chemického složení	39
5	Výsledky.....	42
6	Diskuze.....	44
7	Závěr	47
8	Literatura.....	48

1 Úvod

Předmětem této práce bude výzkum chemického složení, antimikrobiální a antioxidační activity extraktů z česnáčku lékařského. Léčivé vlastnosti česnáčku lékařského jsou způsobeny jeho neobvyklým chemickým složením, ve kterém lze rozlišit mnoho biologicky aktivních látek. Složení závisí zcela na části použité rostliny. Například listy česnáčku lékařského obsahují flavonoidy, glykosid sinigrin, kyselinu askorbovou a karoten.

V posledních letech četné studie prokázaly přítomnost éterických olejů s antibakteriální, fungicidní, antivirovou, protinádorovou a antioxidační aktivitou. To nám umožňuje zvážit nové možnosti vytváření alternativních přípravků z rostlinných materiálů.

V současné době velké množství mikroorganismů je vážným problémem pro lidské zdraví, zejména nozokomiálních kmenů. Rozšířený výskyt multirezistence komplikuje výběr vhodné chemoterapie. Jedním z důvodů jeho vzniku je masivní použití antimikrobiálních látek, které je komplikováno řadou vedlejších účinků: dysbióza, alergické reakce, tvorba zkřížené rezistence.

V tomto ohledu se neustále hledá nová léčiva s antimikrobiální aktivitou, která však mají odlišný mechanismus účinku ve srovnání se známými antibiotiky a postrádají vedlejší účinky antibiotik. Základem pro vytvoření těchto léčiv jsou éterické oleje rostlin, které mohou vykazovat antimikrobiální a antioxidační aktivitu. Mezi takové rostliny patří i česnáček lékařský.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je zanalyzovat chemické složení silice pomocí plynové chromatografie. Otestovat antimikrobiální a antioxidační aktivitu extraktů z česnáčku lékařského.

Hypotéza: Biologickou aktivitu česnáčku lze předpokládat na základě jeho tradičního využití v lidovém léčitelství.

3 Literární rešerše

3.1 Éterické oleje

3.1.1 Historie éterických olejů

Vonné rostliny ve starověkém světě poutaly pozornost jako zdroj kadidla. Informace o lidském využití léčivých vlastností aromatických olejů byly nalezeny ve starověkých písemných památkách Sumerského království, které existovaly více než 6,5 tisíciletí před naším letopočtem. Řekové a Římané získali tyto znalosti po dobytí Egyptské říše. Je možné, že to byl arabský lékař a filozof Avicenna, kdo objevil metodu hydrodistilace pro izolaci aromatických složek z rostlin. Arabové učili Evropany umění extrakce aromatických olejů na španělských univerzitách a znalosti o olejů sami přišly do Evropy díky křižáků (Günther 1948).

Na začátku šestnáctého století byly známy takové vonné rostliny jako rozmarýn, levandule, šalvěj, calamus, kasie a další, a na začátku šestnáctého století - asi 130 aromatických látek. v současné době je známo více jak 3000 esenciálních olejů z rostlin, které se vyskytují po celém světě, ale pouze 150 až 200 druhů má průmyslový význam, většina z nich roste v tropech a subtropích a jen několik z nich se pěstuje ve mírném pásmu. Voňavé oleje našli uplatnění ve farmaceutickém, potravinářském a zejména v parfémovém průmyslu. Nehledě na vývoj výroby syntetických látek jsou nejlepší parfémové kompozice stále na bázi přírodních éterických olejů (Spicka et al. 2016).

Éterické oleje (*Olea aetherea*) jsou směsi aromatických látek, které patří do různých tříd organických sloučenin, zejména terpenoidů, méně často aromatických nebo alifatických sloučenin. Mezi éterické oleje patří vonné látky produkované rostlinami éterických olejů během jejich života, které mají aromatickou vůni a palčivou chuť (Grinkevich et al. 1983).

Úloha éterických olejů v metabolismu rostlin není úplně jasná. Jiné autoři tvrdí, že funkce esenciálních olejů spočívá v uzavření rán na stoncích a ochraně kůry před vlhkostí. Esenciální oleje mohou chránit rostliny před houbovými chorobami, které jsou přenášeny opylujícím hmyzem. Éterické oleje chrání rostliny před přehřátím během dne (ochranná vrstva těkavého éterického oleje kolem rostliny ji chrání před přehřátím slunečního záření) a podchlazením v noci, jakož i před urychlením enzymatických procesů (Regnault-Roger 1997; Nazzaro et al. 2017; Baser KHC. 2010). Termín „éterické oleje“ se objevil v 16. století (Butnariu 2018). Říká se jim éterický, protože se vypařují jako éter a oleje, protože jsou na dotek mastné a vznášejí se na vodě. Vůně rostlin je způsobena přítomností par vonných olejů ve vzduchu (Günther 1948).

3.1.2 Složení éterických olejů

Éterické oleje se získávají z různých částí rostlin: květiny (růže, okvětní lístky a hlavy květů); listy (máta, eukalyptus); z jehel a tlapek (odpad při sklizni dřeva z jedle, borovice); ovocná slupka (citrus); kořeny (valeriány) nebo oddenky (iris); ovoce (mandle); kůra (skořice, kafr); dřevo (cedr) - jak ve volném stavu, tak ve formě glykosidů (mandlové ovoce) (Butnariu 2018).

Obsah aromatických olejů se velmi liší: fialové květy mají obsah esenciálních olejů kolem 0,004%, růžové květy - 0,07-0,1%, kmín obsahuje esenciální oleje v rozmezí - 3-7% a v pupenech hřebíčku tento obsah dosahuje 20-22%. (Jirovetz et al. 2006).

Složení oleje v době vývoje je víceméně konstantní, v některých případech se může mírně lišit charakter vůně v závislosti na poměru složek. Tyto rozdíly mohou být způsobeny složením půdy, vlhkostí, klimatických podmínkách, slunečním zářením, pěstební ploše, ročním obdobím a dokonce i denní dobou (u růže je maximální akumulace éterických olejů brzy ráno kolem 4-6 hodiny a u květů levandule se hromadí nejvíce odpoledne), stáří rostliny atd (Dhifi et al. 2016).

Počet složek v éterickém oleji jednoho rostlinného druhu může dosáhnout maximálně 500 komponent (Zaslavskaya et al. 2017). Jsou to směsi různých organických sloučenin - terpenů, seskviterpenů, aromatických, alicyklických a alifatických uhlovodíků. Terpenové sloučeniny, které jsou nejdůležitějšími složkami olejů, v živočišných organismech nemají syntetickou dráhu. Více než 200 organických látek se nachází v růžovém oleji, většina z nich je zastoupena (asi 80%) fenyletylalkoholem a terpenovými alkoholy (geraniol, linalool, citronon) (Kustova 1978).

Mátový olej obsahuje více než 100 složek, z nichž hlavní jsou mentol, menton, menthylaceton a cineol (Olennikov & Dudareva 2011). V levandulovém oleji bylo identifikováno více než 160 složek, jejichž hlavní složkou jsou komplexní alkoholy linaloolu a řada organických kyselin (octová, butylová, valerianová, kaproová) (Danh et al. 2013).

Zastoupení jednotlivých složek éterických olejů je závislé na stupni vývoje rostliny a také není jednotné v různých částech rostliny. Vzhledem k tomu „aromatický buket“ éterických olejů se může významně měnit. V procesu zrání semen koriandru má aromatický olej květinové tóny s převahou vůně fialek nebo konvalinek. Složení éterického oleje jednotlivých druhů rostlin se také významně liší v závislosti na podmínkách pěstování. Například levandulový olej z hor ve Francii má ovocnou a sladkou vůni a v anglické levanduli je stín kafru (Saeb & Gholamrezaee 2012)

Největší množství aromatických olejů v rostlinách je pozorováno během květu a zrání semen. Oleje se hromadí ve zvláštních formacích - zásobárnách umístěných v různých orgánech rostlin. V závislosti na umístění zásobárny jsou rozděleny do dvou skupin:

- Exogenní – zásobárny zahrnují: žlázové skvrny vytvořené na okvětních lístcích květin (růže), žlázové chloupky na epidermis listů a květů (pelargonie), žlázy různých typů (labiální);
- Endogenní – zásobárny zahrnují: zaoblené zásobárny, které se nacházejí v parenchymu kořenů a oddenků, ovocné kůry, v listech (kořen elecampanu, eukalyptus, citronové plody), jednotlivé buňky (kořen kořene), buněčné skupiny nebo tkáňová místa (podkožní kořen kořene valerjánu), podlouhlé tvar nádoby ve formě "tubulů" a pasáží (plody pupkového a jehličnatého dřeva) (Duarte et al. 2017)

Při získávání éterických olejů je třeba vzít v úvahu specifickou lokalizaci aromatických olejů. Při exogenní lokalizaci se oleje uvolňují snadněji a suroviny nevyžadují důkladné mletí, zatímco při získání olejů z endogenní lokalizace je nutné důkladně rozdrtit materiál (Opender 2008).

3.1.2.1 Terpeny

Éterické oleje jsou vicesložkové směsi organických sloučenin, zejména terpeny a jejich deriváty kyslíku - alkoholy, aldehydy, ketony, estery atd. (V některých případech převažuje jedna nebo více složek) (Sell 2006).

Terpeny jsou podtřídou nenasycených uhlovodíků obecného vzorce $(C_5H_8)_n$, kde $n > 2$. Empirický vzorec C_5H_8 , oficiálně nazvaný „2-methylbut-1,3-dien“, je známý jako isopren. Terpeny jsou ve skutečnosti izoprenové polymery s nízkým stupněm polymerace. Se zvýšením počtu isoprenových zbytků v molekule (stupeň polymerizace) se vlastnosti sloučeniny radikálně mění. V divočině však nejběžnější nejsou polymery isoprenu, ale jejich kyslíkem substituované deriváty, které se v současnosti nazývají terpenoidy. (Shaderkina & Shaderkin 2019).

Terpeny lze rozdělit do 3 skupin:

- monoterpeny;
- seskviterpeny (seskviterpeny);
- diterpeny.

Monoterpeny (monoterpenoidy) vznikají ze dvou isoprenových molekul. Jsou široce distribuovány ve světě rostlin jako součást éterických olejů. Vůně rostlin určují monoterpeny a estery. Klasickými představiteli monoterpeny jsou kineol - hlavní složka eukalyptového oleje a mentol - hlavní složka máty peprné. Monoterpeny také zahrnují gáfor (kafr), bicyklický keton obsahující dva isoprenové monomery. Monoterpenové uhlovodíky (α -pinen, β -pinen, terpinolen, β -terpinen) jsou velmi charakteristické pro fylogeneticky starší jehličnany, zatímco kvetoucí rostliny jsou charakterističtější pro kyslík obsahující monoterpenové aldehydy, ketony a alkoholy (citral, linalool, terpineol, geraniol)) Specifická vůně jehličnatého lesa je spojena s tvorbou a odpařováním monoterpenových uhlovodíků.

Monoterpeny jsou klasifikovány podle struktury svých uhlíkových koster - v závislosti na stupni cyklizace a struktuře cyklů. Mezi nimi se rozlišují acyklické, monocyklické a bicyklické monoterpeny (Plemenkov 2006).

Kombinace tří isoprenových molekul se nazývá seskviterpeny (seskviterpenoidy). Jsou také součástí éterických olejů. Tříčlenný izomer má však těžší molekulu, a proto a priori, méně těkavý, dává méně výrazný, ale trvalejší zápach. Příkladem seskviterpenů je farnesol, který je součástí éterických olejů konvalinek a lip, a farnesen izolovaný z pryskyřice borovice. Seskviterpeny nejsou však tak citlivé na oxidaci a nejsou tak těkavé jako monoterpeny.

Čtyřčlenné polymery isoprenu (diterpeny, diterpenoidy) jsou ještě méně těkavé, jsou součástí rostlinných pryskyřic. Kromě toho je diterpenový vitol součástí chlorofylu.

Terpeny se rychle odpařují (vysoce těkavé), snadno oxidují a rozkládají se rychleji než jiné uhlovodíky. Citrusové oleje, které mají ve složení velké množství terpenů, by proto měly být skladovány nejdéle 2 roky, pokud možno na chladném místě. Jiné éterické oleje mají delší trvanlivost 3-4 roky a některé, jako víno, se v průběhu let zlepšují (například myrha).

Terpeny jsou velmi reaktivní:

- jsou snadno oxidovány na vzduchu, zejména ve světle, často se mění na sloučeniny obsahující kyslík (Scott 2005);
- při zahřátí isomerizovaný (především při interakci s kyselými činidly);
- snadno reagují v přítomnosti katalyzátorů (Pd, Pt, Ni);

- dvojn  vazby snadno podlehaji adicnim reakcim - hydrogenuj , hydratují, připojují halogeny, halogenovodíky, organick  kyseliny atd. (Modzelewska et al. 2005).

 terick  oleje také obsahují neterpenick  sloučeniny biogenerovan  cestou fenylpropanoidů, jako je eugenol, cinnamaldehyd a safrol (Dhifi et al. 2016).

Při siln m zahřiv n i bez p ristupu vzduchu (400 - 500 ° C) se terpenov  cyckly otevrou. Také z bicycklck ch terpenů lze získat monocyklck  a dokonce alifatick  molekuly. Při zahřat i na 700 ° C a v ice se všechny terpeny rozkládají za vzniku komplexn i směsi produktů (isoprenov  aromatick  uhlovodíky atd.) (Nikitin 1952).

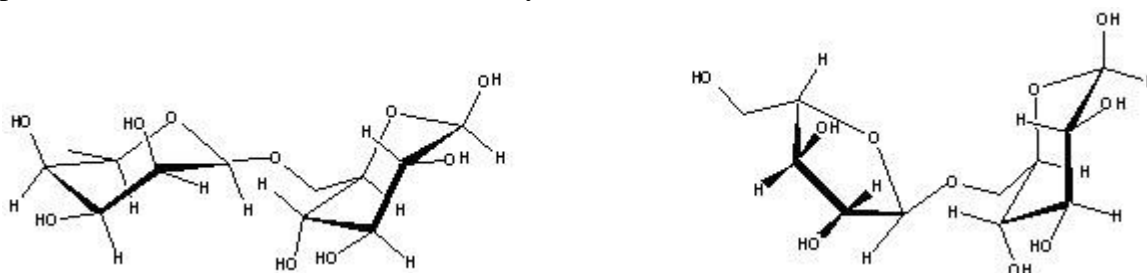
Terpeny se izolují z p rodn ch surovin, napriklad guma,  terick  oleje, terpentýn, balzam atd. Pro izolaci lze pouz t destilaci s vodn i parou, extrakci těkavými rozpouštědly a také entheraz i (extrakci těkavými rozpouštědly, tuky, oleje). Jednotliv  terpeny ze směsi se z skaj i frakcn i destilaci ve vakuu, chromatografickými metodami, zmrazen m atd (Modzelewska et al. 2005). Mnoho terpenů a jejich derivátů se také připravuje synteticky.

3.1.3 Z skan i éterických olejů

Existuje mnoho různých zp sob  z skan i éterických olejů. N kter  z nich byly pouz v ny od nepam ti, jin  jsou modern j i, a proto mnohem produktivn j i. Esenci ln i olej m u e být v orgánech nesoucích ether ve voln m a / nebo v azan m stavu. V závislosti na formě, ve které se nach z i  terick  olej v rostlině, se pouz vaj i různé způsoby extrakce nebo se pouz vaj i kombinace různých metod (Talati 2017).

Voln  forma éterického oleje umožňuje extrahovat  terick  oleje bez předchozího zpracov n i destilaci s vodn i parou, vyfukováním vzduchem, nebo extrakci rozpouštědly (těkavými a netěkavými). V azan  formy éterických olejů jsou obvykle ve formě glykosidů (sloučenina éterických olejů s uhlovodíky - terpenov  glykosidy), seskviterpenových laktonů nebo karotenoidů (Yarskaya 2011).

Terpenové glykosidy (na obrázku 1) jsou směsi komplexních disacharidů, kter  zahrnuj i α -L-ramnopyranosyl- β -D-glukopyranosidy a α -L-arabinofuranosyl- β -D-glukopyranosidy. Terpenové zbytek (aglykon: terpenol nebo polyol) se vazi na glukopyranozu. Jednoduch  glukosidy, jako je geranyl- β -D-glukopyranosid, jsou také zdrojem ruznych slozek v  terick m oleji, protoze se muze vazat na ruzne dalsi latky (Efremov et al. 2013).



α -L-ramnopyranosyl (1-6) –
 β -D-glukopyranosid

α -L-arabinofuranosyl (1-6) –
 β -D-glukopyranosid

Obrázek 1 – Terpenové glykosidy

Extrakce vázaných forem éterických olejů vyžaduje předchozí uvolnění éterického oleje fermentací. Fermentace spočívá v udržování suroviny po dobu několika hodin až den při teplotě 50 až 60 ° C. (Efremov et al. 2013). V důsledku rozkladu glykosidů působením vlastních enzymů rostliny se tvoří významné množství éterických olejů, které lze extrahovat různými metodami. Působením enzymu dochází k hydrolize glykosidu a EO se oddělují ve volné formě. Například, β -fenyletyl- β -D-glukopyranosid je hlavním zdrojem fenylethylalkoholu v okvětních lístcích růží po fermentaci. Fermentace dramaticky zvyšuje obsah fenylethylalkoholu (Erbaş 2016). Byl také objeven geranyl glukosid, který může být během fermentace zdrojem geraniolu, který bez fermentace se nedá získat (Takoi et al. 2014). Druhem fermentace může být dlouhodobé skladování (2-3 roky) kořenů duhovky v suchém prostředí, poté se v nich hromadí potřebné aromatické složky. Po fermentaci se éterické oleje oddestilují jako volná forma. Během destilace parou mohou také nastat hydrolytické procesy (Efremov et al. 2013).

Pokud je esenciální olej ve velkém množství (například v oplodí citrusových plodů) lze ho extrahovat metodou lisování nebo mačkání, tj. mechanickým způsobem. Tato metoda produkuje pouze vonné oleje citrusových plodů (citron, pomeranč, mandarinka, bergamot), kde jsou oleje koncentrovány pouze ve kůře v poměrně velkých zásobárnách (Hesham et al. 2016).

V současné době se slupka obvykle odstraňuje, prochází přes ozubené válce, smísí se s malým množstvím vody a poté se podrobí lisování na hydraulických lisech. Zbývajících asi 30% éterického oleje ve slupce se dále extrahuje destilací s vodní párou. V tomto případě se nesmí produkt nechat zahřívát, protože by to zničilo důležité těkavé sloučeniny (Efremov et al. 2013).

Je-li v surovinách a termostabilním oleji obsaženo relativně hodně vonného oleje, používají se destilační metody. Destilační metody zahrnují jednoduchou destilaci (hydrodistilaci), parní destilaci (parní destilaci) a hybridní kombinaci - hydrodistilaci. Všechny tyto procesy mohou být prováděny za atmosférického nebo sníženého tlaku, protože tato metoda a její návrh hardwaru jsou nejjednodušší. Hydrodistilace - nejjednodušší metodou je destilovat vodu v přítomnosti rostlinného materiálu. V průmyslu se vzácně používá například při výrobě růžového oleje. Často se však používá v laboratorní praxi, což je spojeno s dostupností a jednoduchostí experimentu (Efremov 2013).

V závislosti na tlaku se hydrodistilace provádí za normálního tlaku (nejčastěji) nebo ve vakuu (vakuová hydrodistilace je destilace parou za sníženého tlaku). Existují návrhy na provedení hydrodistilace za zvýšeného tlaku do několika atmosfér, což významně zlepšuje poměr vody a silice v destilátu. Způsobem navrženým Safinem et al. (2015) se silice poněkud liší od ukazatelů oleje získaného tradičním způsobem.

V průmyslovém měřítku se za účelem zvýšení účinnosti procesu používá ohřev vody prehratou vodní párou. Přehřátá pára rychle ohřívá vodu v hydrodistilátoru a zajišťuje rovnoměrné rozložení v materialu (Efremov 2013).

Jsou-li složky termolabilní a podléhají degradaci, použijí se metody extrakce

a) extrakce rozpouštědly s nízkou teplotou varu (ethylether, methylenchlorid, petrolether, aceton atd.);

b) extrakce zkapalněnými plyny (propan, butan, oxid uhličitý);

c) extrakce tuky (macerace květinových surovin mastným olejem s ohřevem i bez zahřívání) (Efremov et al. 2013).

U termolabilních olejů se také používají tzv. absorpční metody, které lze rozdělit na:

–Anfleráž - éterický olej uvolněný z čerstvě vytěžených surovin (zejména z květů) je absorbován vysoce kvalitními tuhými tuky;

–Dynamická sorpce - absorpce olejů sorbenty (aktivní uhlí, silikagel) (Talati 2017).

3.1.4 Chromatografická analýza éterických olejů

Chromatografie je separační, analytická metoda založená na pohybu zóny zkoumané látky podél sorbentové vrstvy v proudu mobilní fáze. V případě rozdělovací a adsorbční chromatografii dochází k opakovaní sorpčním a desorpčním procesům. V tomto případě dochází k distribuci mezi dvěma nemísitelnými fázemi (v závislosti na jejich relativní rozpustnosti v každé fázi): mobilní a stacionární (Tsarev et al. 200).

Plynová chromatografie je skupina chromatografických metod, ve kterých je mobilní fáze plynná (ve stavu plynu nebo páry).

Podle použitého typu stacionárních fází se způsoby plynové chromatografie dělí na adsorpci plynu, když pevný nosič slouží jako stacionární fáze, a plyn-kapalinová chromatografie, když stacionární fáze je viskózní netěkavá kapalina uložená na inertním nosiči. Oddělení složek analyzované směsi ve variantě adsorpce plynů je založeno na rozdílu v oddělených látkách v adsorpčních hodnotách na povrchu adsorbentu a v případě chromatografie plyn-kapalina na rozdílu v rozpustnosti složek analyzované směsi ve stacionární kapalně fázi. (Vallance 2017).

Princip separace látek v plynové chromatografii je nerovnoměrná afinita látek pro tekavou mobilní fázi a stacionární fázi ve sloupci. Po průchodu sloupcem hmoty jej postupně opustí a zaregistrují se v detektoru. Signál detektoru se zaznamenává ve formě chromatogramu automatickým potenciometrem (záznamník) nebo se zaznamenává pomocí počítače (Pedersen-Bjergaard et al. 2019).

Plyn-kapalinová chromatografie (GLC) je účinný způsob oddělování a navazování kvantitativních vztahů ve složení éterických olejů.

Složky éterického oleje mají různé adsorpční afinity pro kapalnou fázi, a proto se rychlost pohybu podél sloupce látek, které tvoří éterický olej, liší od sebe. Výsledkem je, že složky opouštějí kolonu jako samostatné látky. Obvyklá doba analýzy éterického oleje není delší než 30–40 minut. V moderních metodách může jediná látka vystoupit během 3-7 sekund. Během analýzy tak mohou být detekovány stovky látek. Tyto látky jsou detekovány různými metodami (Silverstein 1974).

Hlavní metodou pro detekci látek opouštějících kolonu je FID. Za tímto účelem je výstupní konec kolony vložen do detektoru, kterým je tenká tryska s plynule hořícím plamenem vodíku. Látky vstupující do plamene jsou ionizovány pod vlivem vysoké teploty. Vzniklý ionizační proud, který mezi elektrodami protéká, je přímo úměrný počtu iontů a měří se. Počet iontů je úměrný množství látky v plameni (Buffington & Wilson 1989).

Na základě chromatografické analýzy se získá chromatogram, tj. grafické znázornění složení éterického oleje ve formě píku. Velikost píku je somerna množství látky ve vzorku. Kvantitativní poměry (obvykle ve formě procenta) se počítají automaticky pomocí speciálních kalkulaček nebo pomocí počítače (Pranker & Schulman 1993).

V současné době je hlavní metodou pro studium éterických olejů kombinace plyn-kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie, které nevyžadují předběžnou izolaci

jednotlivých látek a znalost vlastností těchto látek, která se většinou získávají spektrálními metodami (Zenekvíč 1996).

V procesu chromatografické separace látky opouštějí kolonu jednotlivě. V hmotnostním spektrometru vznikají ionty, které jsou působením magnetického pole rozděleny dle své velikosti. Výsledkem měření je hmotnostní spektrum. Toto spektrum se porovnává s databází a na základě toho vyhodnocení se získávají výsledky. Výsledky GCMS jsou řadou návrhů na identifikaci ve formě alternativních vzorců látek, je třeba vybrat nejpříjemnější varianta. Současně využívají zákony vztahu složek v éterických olejích (Harold 2019). Například, linalylacetát je vždy doprovázen linalolem a pokud je linalylacetát identifikován v éterickém oleji a linalool není nalezen, tak je to chybný nález (nebo je třeba hledat linalool). Podobně, pokud je identifikován nerol a geraniol chybí (tyto dvě látky jsou vždy přítomny společně), pak je taková identifikace pochybná (nebo je třeba hledat geraniol).

Thymol často doprovází karvacrol, para-cimen a gama-terpinen, pinocamphone - isopinocamphone atd. Dle Ermakov (1972) propojení složek v éterických olejích je způsobeno biogenetickými spojeními a poměrně jednotnými biochemickými procesy v rostlinách, které vážou všechny složky éterických olejů do jediného biologického cyklu. Znalost takových procesů zabraňuje identifikačním chybám.

Společnou identifikační chybou jsou falešné píky, které se vytvářejí jako artefakty během izolace éterických olejů (zbytky z předchozího vzorku, nečistoty v rozpouštědlech, produkty rozkladu v kapalném fázi ve sloupcích). Takové „nálezy“ by se měly vždy očekávat. Přinejmenším je třeba mít dobrou představu o možném chemickém složení chromatografického objektu a předpokládat výskyt možných „fantomů“ (Masada 1976).

Kromě toho by každá složka identifikovaná pomocí hmotnostního spektrometru měla být ověřena pomocí svého retenčního indexu a pouze na základě takového komplexního posouzení je učiněn závěr o konečné identifikaci (Polyakova 1983).

3.1.5 Použití a účinek éterických olejů

V našem moderním světě se éterické oleje používají hlavně k aromatizaci potravin, nápojů, výrobků pro domácnost, ve farmaceutickém průmyslu, v lékařství a aromaterapii a také jako rozpouštědla (terpentýn). Aromaterapie zahrnuje nejen léčbu aromaty, ale jejich použití v souladu s pravidly farmakoterapie, jakož i použití jiných léků (Tuley 2006).

Ve farmaceutickém průmyslu se na rozdíl od fenolických sloučenin, terpenoidní sloučeniny éterických olejů široce používají jako složka s antiseptickými a antimikrobiálními vlastnostmi (Tyrkov 2012). Tetraterpenoidy (karoteny a karotenoidy - provitaminy A) s aktivitou vitamínu A se používají buď ve formě přidělených množství, nebo léčivé suroviny, které je obsahují, jsou součástí poplatků za multivitaminy (Muraveva 2002).

Nejpoužívanější jsou citrusové éterické oleje, silice máty peprné a terpentýn pocházející z jehličnanů.

Éterické oleje a rostlinné materiály z éterických olejů mají širokou škálu biologické aktivity a bodem působení jsou často průdušky, ledviny, játra, kterými jsou vylučovány z těla.

Účinky éterických olejů jsou :

- Antimikrobiální (baktericidní, antiseptické) vlastnosti (listy eukalyptu, pupeny topolu, hřebíčkový olej, borovicový olej, podzemky kořenové).

- Protizánětlivé vlastnosti (gáfor, květy heřmánku, řebříček tráva, elecampanové oddenky atd.).
- Antispasmodická aktivita (máty peprné, květy heřmánku, plody koriandru, plody kopru atd.).
- Expektoranční vlastnosti (klíčky rozmarýnu, fenykl a anýz, elecampanské oddenky, tymiánová tráva, oreganová tráva atd.).
- Uklidňující účinek (valeriánské oddenky, bylina z meduňky, květy levandule atd.).
- Diuretické vlastnosti (pupeny a březové listy, jalovcové plody atd.).
- Regenerační účinek (lékárna heřmánkových květů heřmánku) (Bakkali et al. 2008).

Úžasná paleta způsobů použití přírodních éterických olejů je vysvětlena jejich vysokou penetrační schopností: nejrychlejšího léčebného účinku je dosaženo inhalací aromatických par - inhalací aromatickými látkami. V tomto případě těkavé složky éterických olejů projevují okamžitý účinek prostřednictvím čichových receptorů na mozkové buňky (Boesl et al. 2016).

Studium biologické aktivity a možnosti použití éterických olejů pro léčebné účely bylo široce prováděno v laboratoři Krymského výzkumného ústavu pojmenovaného po I.M.Sechenova. V průběhu studií bylo zjištěno, že éterické oleje a jejich složky snadno procházejí epitelem kapilár, volně procházejí placentou. Použitím transportních nosičových molekul umístěných v biologických membránách pronikají aromatické molekuly buněčnými membránami a interagují s receptory intracelulárních biologických komplexů. Interagují s endokrinním, imunitním a dalšími systémy. (Tikhomirov & Yarosh 2008).

Pronikání aromatických olejů kůži pomocí masáže, aroma koupele nebo komprese je poněkud pomalejší, ale účinek expozice aromatickým olejům touto metodou penetrace trvá déle. Jedna část éterických olejů nanesených na kůži je absorbována buňkami epidermis a druhá proniká do hlubokých vrstev podél mezibuněčných prostorů a dosahuje krevních cév, které se šíří po celém těle (Nikolayevsky 2000). Brown (1993) doporučuje při masáži koncentraci 3 kapek éterického oleje na 10 ml neutrálního oleje a při perorálním podání 2-3 kapky éterického oleje třikrát denně po dobu nejvýše tří týdnů. Autor se domnívá, že ve velkých dávkách jsou éterické oleje škodlivé a nebezpečné.

Éterické oleje se úspěšně používají k léčbě infikovaných ran a povrchových kožních lézí různé povahy. Autoři sledovali zrychlení štěpování štěpu po transplantaci kůže, zrychlení epitelizace okrajů rány, výskyt epiteliálních ostrovů na povrchu rány a snížení tvorby jizev (Chebanash 1973). Podle Kerr (2002) by měl být éterický olej při léčbě ran, oděr a jiných kožních lézí zředěn 5-7krát.

Terpeny jako kafr, mentol, eukalyptol, pyrethriny (insekticidy), kalafuna, hecogenin (detergent) atd. (Zwenger et al. 2008) našly široké uplatnění v chemickém průmyslu a medicíně. V parfumerii se aromatické látky ze skupiny terpenů (pinen, limonen, karen, fellandren, myrcen atd.) používají jako složky ve složení ovocných nebo květinových aroma. V potravinářském průmyslu se terpenoidy: α -ionon, damascenon, safranal atd. používají se jako látky zvýrazňující aroma a chuť (Caputi et al., 2011).

Aktivní složky éterických olejů ovlivňují trávicí systém, vstupují do krevního řečiště, normalizují činnost kardiovaskulárního systému a mají silný účinek na genitourinární systém a nervovou tkáň. Pro vnitřní použití éterického oleje je nutné rozpouštědlo (Nikolayaevsky 2000).

Míra penetrace přírodních éterických olejů je velmi závislá na teplotě a vlhkosti pokožky: například v teplé a vlhké atmosféře koupelny vstupují éterické oleje do těla 100 krát rychleji než při pokojové teplotě. Maximálního léčebného účinku přírodních éterických olejů je dosaženo současným zavedením aromatických směsí přes dýchací systém a kůži (Pasdaran & Sheikhi 2016).

Vůně lesních, loukových, tropických rotlin a kořeni lze použít jako aroma do polštářů a pradla, parfemu, do sáčků s oblíbenými vůněmi kolem domu a ložnice a přidat je do relaxační, tonické lázně (Babar 2015).

3.1.6 Význam v potravinářství

V průmyslu se jako aroma používají éterické oleje. Příchutě jsou navrženy tak, aby dodávaly produktům chuť a vůni a zvyšovaly stávající chuť a vůni. V domácnostech se chemikálie a parfémů používají k příjemnému zápachu.

Arómy se zavádějí v takovém množství, aby obsah aromatických látek přibližně odpovídal jejich obsahu v odpovídajících nezpracovaných produktech. Při výrazném překročení těchto množství se zhorší organoleptické vlastnosti produktu a ztratí se spotřebitelské vlastnosti produktu. Použití látek určených k aromatizaci k eliminaci změn v příchuti potravinářských výrobků v důsledku jejich kazení nebo špatné kvality surovin není povoleno (Oluyemisi et al. 2016).

V potravinářském průmyslu se stále více používají příchutě. Nárůst poptávky po aromatických látkách je způsoben vývojem moderních technologií pro získávání potravinářských produktů založených na hlubokém zpracování surovin. Po takovém zpracování, jehož účelem je získat standardizované koncentráty proteinů, tuků a uhlohydrátů, jsou potravinářské výrobky téměř úplně zbaveny „balastových“ látek, včetně těkavých aromatických látek, které určují jejich aroma (Stroganov et al. 2016).

3.1.7 Současný stav výzkumu složení éterických olejů

Celkový počet éterických rostlin světové flóry se odhaduje na 2 500 - 3 000 druhů. Hlavní celedy do kterých spadá velké množství éterických rostlin jsou *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*. Nejdůležitější éterické rostliny patří do následujících rodů: *Citrus*, *Eukalyptus*, *Abies*, *Anethum*, *Lavanda*, *Mentha*, *Thymus*, *Caramum*, *Coriandrum*, *Foeniculum*, *Salvia*, *Juniperus*, *Rosa*, *Rosmarinus*, *Pinus*, *Ocimum*, *Artemisia*, *Geranium*, *Acorus*, *Pimpinella*, *Nepeta*, *Monarda*, *Taurus*, *Lophanthus*, *Iris* a další. (Efremov et al. 2013).

Během 20. století se neuskutečňoval pouze screening rostlin éterických olejů, ale vyvinuly se různé metody extrakce a analýzy éterických olejů. Metody laboratorní a průmyslové výroby olejů prošly mnoha změnami. Rychlý vývoj přístrojové a analytické báze organických sloučenin přispěl k podrobnější a jemnější analýze éterických olejů. Pokud do 50. let. velkým úspěchem byla redukce fyzikálně-chemických konstant (ether a čísla kyselin, pH, polarizační úhel, měrná hmotnost) a hlavních tříd složek (kyseliny, alkoholy, estery, terpeny) éterického oleje, poté objevem plynové chromatografie (po 50. letech 20. století), a ještě více s příchodem chromatograficko-hmotnostní spektrometrické analýzy (z poloviny 70. let), se

výzkum v oblasti éterických olejů a identifikace složek začal pohybovat neuvěřitelně rychle (Ryeys et al. 2014).

V posledních letech se konají každoroční evropské konference věnované komplexní studii rostlin éterických olejů a jejich olejů. Jednou za pět let se konají specializované kongresy o éterických olejích a rostlinách éterických olejů. Počet vědeckých časopisů vydávajících práce o složení složek éterických olejů již dosáhl několika desítek. Indie, Turecko, Spojené státy americké, Čína, Brazílie a Egypt, které tisknou převážnou většinu prací v této oblasti, se v současné době staly středisky pro studium éterických olejů (Sadgrove & Jones 2015)

Na základě analýzy literatury je tedy zřejmé, že identifikace a komplexní studium éterických olejů, éterických olejů rostlin a hledání nových způsobů využití v různých odvětvích národního hospodářství jsou relevantní nejen v současném století, ale získávají také zvláštní význam, vědeckou a praktickou hodnotu

3.1.8 Způsoby stanovení antioxidantní aktivity

Posledních dvacet let je poznamenáno zvýšenou pozorností lékařského i chemického průmyslu na produkty zpracování léčivých rostlinných materiálů, které obsahují bohatý komplex biologicky aktivních látek (BAL), z nichž mnohé vykazují antioxidační aktivitu. Hledání, metody izolace a studium slibných přírodních zdrojů látek s antiradikální aktivitou a antioxidační aktivitou, spolu s vývojem dostupných a rychlých metod pro stanovení antioxidační aktivity, je v současné době jedním z naléhavých úkolů moderní medicíny, farmacie, kosmetologie a potravinářského průmyslu (Korotkova et al. 2003).

Nejpoužívanější jsou elektrochemické a spektrofotometrické metody analýzy. V současné době neexistuje žádná metoda, která by poskytla úplné informace o stavu a interakcích komplexních systémů, ve kterých se vytvářejí a reagují antioxidanty. Neexistuje ani jediný termín, který definuje antioxidační vlastnosti sloučeniny. Všechny existující způsoby stanovení antioxidační aktivity mají jednu nebo druhou nevýhodu. Je třeba poznamenat, že objektivní nemožnost existence nejen jediné metody, ale i možnost porovnání výsledků získaných různými metodami. Proto každý výzkumník na základě svých cílů a schopností vybere hotový, vytvoří nový, modifikuje již známou metodu nebo se často uchýlí ke studiu antioxidační aktivity studovaného objektu pomocí komplexu různých metod (Lapin et al. 2007)

Celkovou antioxidační aktivitu objektu se dá vyhodnotit pomocí integrovaných metod. Metody pro stanovení celkové antioxidační aktivity jsou zpravidla založeny na interakčních reakcích s dlouhodobými volnými radikály, které slouží jako prototyp volných radikálů vytvořených v živé buňce. Tyto metody poskytují informace o antioxidační aktivitě jednoho nebo druhého vzorku a mají řadu funkcí, které omezují možnost jejich použití. Konkrétně se analýza provádí v několika fázích a trvá poměrně dlouho, analytický signál musí být zaznamenán pomocí drahého vybavení a činidel. Kromě toho přijaté informace nejsou přímé (Sharafutdinova a et al. 2011)

Různé metody určují buď jednotlivé antioxidační složky (například vitamin E, kyselinu askorbovou atd.) Nebo celkovou antioxidační aktivitu, což je více informativní. Celková antioxidační aktivita může být stanovena několika metodami: absorpce kyslíku během peroxidace lipidů, oxidace crocinů, chemiluminiscence s luminolem, oxidace R-fykoerythrinu, citlivost erytrocytů na hemolýzu, obnovení aktivity železa a tvorba peroxidů lipidů. Někteří

autoři měří aktivitu antioxidantních enzymů, jako je askorbát peroxidáza, glutathion reduktáza, dehydroaskorbát reduktáza a monodehydroaskorbát reduktáza. Srovnávací studie se stále častěji provádějí, když se AOA měřená jednou z metod porovnává s účinkem sloučeniny na průběh konkrétní patologie. Autoři tedy frakcionovali složky zeleného čaje, studovali aktivitu frakcí metodou DPPH a hodnotili jejich účinek na růst rakovinných buněk žaludku (Hasanov et al. 2004).

3.1.8.1 Elektrochemické metody

Charakter reakce dárce-akceptor mezi antioxidantem a volnými radikály umožňuje úspěšné použití elektrochemických metod pro vyhodnocení AOA různých objektů. Elektrochemické metody se vyznačují vysokou citlivostí, rychlostí postupu analýzy, relativně nízkými náklady na vybavení a činidla, a tedy analýzou jako celkem (Sharafutdinova et al. 2011).

3.1.8.1.1 Amperometrická metoda

Metodou stanovení AOA různých vícesložkových směsí bez předchozí separace je amperometrická metoda, včetně přípravy vzorků analyzovaných a standardních látek, jejich elektrochemické oxidace v buňce amperometrického detektoru, zesílení elektrických signálů, jejich registrace a výpočtu AOA podle navrhované matematické závislosti.

3.1.8.1.2 Coulometrická metoda

Pro coulometrické stanovení AOA výtažků z bylin, šťávy z bobulí, ovoce a zeleniny, různých čajů, výluhů a nápojů na bázi přírodních rostlinných materiálů, vodních a alkoholových extraktů z chaga, balzámů a tinktur se jako reakční činidlo navrhuje elektrolyticky vyráběný brom (Shilovaa et al. 2006).

3.1.8.1.3 Metoda voltametrie

Ve voltametrické metodě se jako modelová reakce používá proces kyslíkové elektrolýzy (obrázek 3) na rtuťové elektrodě s použitím mechanismu podobného redukci kyslíku u mnoha objektů umělého a přírodního původu (Misin et al. 2011).

3.1.8.2 Chromatografické metody

Tenkvrstvá chromatografie. Metoda TLC byla vyvinuta pro stanovení AOA určitých skupin rostlinných biologicky aktivních látek. V navrhovaném provedení byly způsoby zóny jednotlivých látek s AOA po separaci přímo na desce ošetřeny okysleným roztokem manganistanu draselného, který v tomto případě působí jako vývojka. Zóny jednotlivých AO bělely na misce roztok manganistanu draselného a objevily se jako bílé skvrny na růžovém pozadí (Chistyakova et al. 2012)

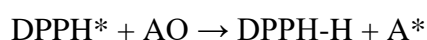
3.1.8.3 Spektrální metody

3.1.8.3.1 Spektrofotometrická metoda

Nejpočetnější metody a jejich modifikace uvedené v literatuře používají fotometrický záznam, pravděpodobně jako nejpohodlnější a nejdostupnější. Je také možné spektrofotometrické stanovení celkového obsahu AO bez separace směsi AO, zatímco výsledek se vypočítá pomocí chemometrických algoritmů. Bohužel nedostatečné znalosti přírodních směsí AO a složitost získávání vícerozměrných kalibrací brání rozsáhlému používání těchto technik. V praxi se místo celkového obsahu AO obvykle stanoví celkovou AOA studovaných směsí. Tento integrální indikátor se také nazývá celková antioxidační kapacita (Total Antioxidant Capacity, TAC) (Tsyupko et al. 2011).

3.1.8.3.2 Metoda DPPH

Jednou z metod pro hodnocení AOA je kolorimetrie CP založená na reakci DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) rozpuštěného v methanolu se vzorkem AO podle schématu:



Redukce DPPH AO snižuje purpurově modrou barvu DPPH v methanolu a reakce je monitorována změnou optické density při 514 nm konvenčními spektrofotometrickými metodami. Autoři modifikovali metodu pro stanovení AOA kombinací standardního fotometrického postupu s metodou optotermálního okna (optotermální okno, OW) - levný netradiční detektor absorpce. Optotermální konverze umožňuje zvýšení citlivosti stanovení o dva řády, zvýšení lineárního rozsahu měření 16krát ve srovnání s tradičními metodami spektrofotometrie. Důležitou výhodou metody měření optotermální absorpce je to, že je možné pracovat s opalizujícími vzorky (Hasanov et al. 2004).

Ke stanovení antiradikálové aktivity extraktů lékařských rostlin se používalo reakci se stabilním volným radikálem DPPH v 96% ethanol (Eremeeva et al. 2016). Stupeň odbarvení roztoku DPPH po přidání extraktů byl stanoven spektrofotometricky při 517 nm. Ze získaných lineárních závislostí koncentrace nezreagovaného DPPH na objemu přidaného extraktu byl stanoven objem infuze potřebný pro 50% degradaci DPPH. ARA byla hodnocena podle množství látky DPPH, která reaguje s 1 ml extraktu, podle vzorce (Fedoseeva et al. 2008).

AOA vodných extraktů z oddenků *Badonia houštiny* byla také studována metodou DPPH (Kondratenko et al. 2012).

Avšak pro kvantifikaci antiradikálové aktivity extraktů byla použita velikost reakční rychlosti radikálu DFT s extraktem oddenků *badonia houštiny* v počátečním čase (v). Hodnota v byla vypočtena jako rozdíl mezi reakční rychlostí DPPH s extraktem ve vodném médiu (v_0) a reakční rychlostí DPPH s vodou (v_{H_2O}). Rychlost sledovaných reakcí byla stanovena jako sklon počáteční přímočaré části kinetické křivky (Белый & Белая 2012) Čím vyšší je reakční rychlost radikálu DPPH s extrakty (v), tím vyšší je jejich antiradikální aktivita.

3.1.8.3.3 Metody založené na schopnosti inhibovat autooxidaci adrenalinu

AOA studovaného rostlinného materiálu se také posuzuje podle jeho schopnosti inhibovat autooxidaci adrenalinu *in vitro* a tím zabránit tvorbě reaktivních kyslíkových druhů. AOA sledovaných léčiv se vyjadřuje jako procento inhibice autooxidace adrenalinu a počítá se známým vzorcem (Ryabina et al. 2012). Hodnota AOA větší než 10% označuje přítomnost AOA. V (Ryabina et al. 2011) byla použita metoda k posouzení AOA v počátečních fázích oxidace volných radikálů inhibicí superoxidového radikálu při autooxidaci adrenalinu v alkalickém prostředí při vlnové délce 347 nm (Ryabina et al. 2012). Je však třeba poznamenat, že kromě pozitivních aspektů má tato metoda také nevýhody. Výsledky získané při různých expozičních dobách se velmi liší a nemohou splnit kritérium pro hodnocení kvality rostlinných materiálů. Autoři proto navrhují zavedení nového časového parametru, indukčního období, které je přítomno na všech autooxidačních křivkách adrenalinu v přítomnosti rostlinných extraktů a zvyšuje se zvyšujícím se procentem biologicky aktivních látek v extraktech. Nejpravděpodobnější je, že v tuto chvíli vykazují biologicky aktivní látky antioxidační účinek.

Ukázalo se, že spektrofotometrické a potenciometrické metody jsou nejkonkrétnější pro fenolové sloučeniny rostlinných extraktů. AOA rostlinných extraktů byla stanovena dvěma alternativními způsoby: inhibicí superoxidového radikálu při autooxidaci adrenalinu a amperometrickou metodou. Obě metody poskytují objektivní výsledky. V technice provádění a expresivity je však spektrofotometrická metoda nižší než amperometrická (Ryabina et al. 2011).

3.1.9 Metody stanovení citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám

Stanovení citlivosti mikroorganismů - původců infekčních nemocí člověka na antibakteriální léky - nabývá na významu v souvislosti se vznikem a rozšířením rezistence vůči antibiotikům u bakterií. Ve druhé polovině 60. let - začátek 70. let XX. století byly vyvinuty standardní metody pro stanovení citlivosti mikroorganismů na ABP (disková difúze a sériová ředění) a od té doby nedošlo k metodickým změnám zásadních změn.

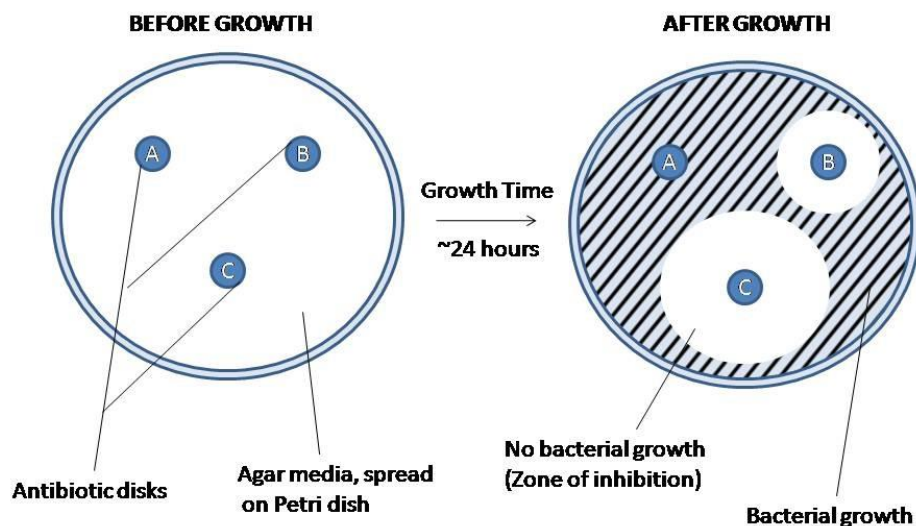
Zavedení významného počtu nových antibiotických látek do klinické praxe a vznik nových mechanismů rezistence na antibiotika u mikroorganismů však vyžadovalo přísnější standardizaci postupu testování, vývoj nových přístupů k interpretaci výsledků, zavedení moderního systému vnitřní kontroly kvality v každé fázi studie.

Všechny existující metody pro hodnocení citlivosti mikroorganismů na antibiotika lze rozdělit do dvou skupin: fenotypové znamenají hodnocení účinku antibiotika na životaschopnost mikroorganismů pomocí léčiv, jako je rychlost růstu nebo biochemická aktivita (metody sériového ředění a difúze) a genotypové metody jsou založeny na přímé detekci genů kódujících determinanty rezistence vůči antibiotikům (DNA-DNA hybridizace, PCR a další metody).

Moderní standardizované metody pro stanovení citlivosti mikroorganismů na ATB se dělí na metody diluční a difúzní metody.

3.1.9.1 Disková difuzní metoda

Metoda pro stanovení citlivosti je založena na schopnosti antibiotika difundovat z papírových disků namočených v nich do živného média a inhibovat růst mikroorganismů naočkovaných na povrchu agaru (Urbášková et al. 1985).



Obrázek 2 – Difúze antimikrobiálních látek ze zdroje do okolních médií

Principem těchto metod je difúze antimikrobiálních látek ze zdroje do okolních médií. Koncentrace antibiotika se s rostoucí vzdáleností snižuje. Prostřednictvím difúze látky je zabráněno růstu citlivých mikrobů a je vytvořena charakteristická kruhová inhibiční zóna - tzv. Inhibiční zóna (Marsik & Mister 2019).

Metody diluční jsou založeny na přímém stanovení hlavního kvantitativního ukazatele charakterizujícího mikrobiologickou aktivitu ATB - jeho minimální inhibiční koncentrace (MIC). MIC je nejnižší koncentrace antimikrobiálního činidla, která zcela inhibuje růst organismu v zkumavkách nebo mikrodilučních jamkách, podle detekce okem (CLSI 2019).

Výhodou těchto metod je to, že je lze použít pro následné stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBC) (Koukalová et al. 2013).

Tato metoda je přesnější než metoda sériového ředění, takže se v praxi častěji používá. Difúzní metoda má však určité nevýhody. Kritéria pro vyhodnocení údajů získaných u rychle rostoucích mikroorganismů se nevztahují na pomalu rostoucí kmeny. Proto je-li nezbytné použít pomalu rostoucí mikroorganismus jako zkušební kulturu, použije se metoda diluční nebo zkušební podmínky jsou zpracovány ve zvláštních experimentech. Totéž lze říci o pomalu se rozptylujících antibiotikech (například polymyxinu). (Blinova 1988)

Stejnou metodou Blažević et al. (2010) stanovili hodnoty MIC esenciálních oleje získaného z *Aurinia sinuata*. Všechny vzorky exprimovaly širokou škálu inhibiční aktivity proti Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriím a houbám. Minimální inhibiční koncentrace se pohybovaly mezi 0,008 a 0,115 mg / ml.

Pomocí diskové difúzní metody prověřovaly antibakteriální aktivitu ethanolových extraktů *Punica granatum*, *Syzygium aromaticum*, *Zingiber officinales* a *Thymus vulgaris* proti *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a

Salmonella typhi. Výsledky této práce prokázaly účinnost těchto rostlinných extraktů (Mostafa et al. 2018)

Antibakteriální aktivitu éterického oleje a methanolového extraktu *Teucrium montanum* zjišťovali diskovou difúzní metodou (Nenad Vukovic, Tanja Milosevic, Slobodan Sukdolak, and Slavica Solujic) Éterický olej *Teucrium montanum* měl velkou antimikrobiální aktivitu proti všem zkoumaným mikroorganismům. Průměry zóny inhibice růstu se pohybovaly od 16 do 29 mm (včetně průměru disku - 6 mm) s nejvyššími hodnotami inhibiční zóny pozorovanými proti *K. pneumoniae* (29 mm). Nejvyšší úroveň rezistence vykazovala *A. tumefaciens* a *E. carotowora* (inhibice zóny 16 mm). Esenciální olej vykazoval větší nebo podobnou aktivitu na grampozitivní a gramnegativní bakterie a houby *F. oxysporum*.

Kromě toho metoda difúze na agarovém disku není vhodná pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), protože není možné kvantifikovat množství antimikrobiální látky rozptýlené do agarového média. Přibližnou MIC však lze vypočítat pro některé mikroorganismy a antibiotika porovnáním inhibičních zón s uloženými algoritmy (Nijs et al. 2003).

Nicméně diskový difúzní test nabízí oproti jiným metodám mnoho výhod: jednoduchost, nízké náklady, schopnost testovat obrovské množství mikroorganismů a antimikrobiálních látek a snadnost interpretace poskytnutých výsledků. Několik studií navíc prokázalo velký zájem o pacienty, kteří trpí bakteriální infekcí antibioterapií založenou na antibiogramu původce (Kreger et al. 1980).

3.1.9.2 Metody diluční

Metoda sériové titrace může být prováděna v různých objemech média (od 1 do 10 ml). Pokusy se provádějí za aseptických podmínek za použití sterilních pipet pro každou reakční složku. Titrace může být prováděna v agarovém médiu a v tekutém bujónovém médiu..

metody diluční může být dvou typů: v bujónu a na agaru:

1) Metoda sériových ředění v bujónu

Existují dvě hlavní možnosti pro metodu sériového ředění v bujónu: makro metoda (zkumavka) a mikro metoda (s konečným objemem 0,2 ml nebo méně). Rozsah makrometru v důsledku nízké produktivity je omezen na případy, kdy je nutné posoudit citlivost jednotlivých kmenů.

2) Metoda sériového ředění na agaru

Metoda sériového ředění na agaru umožňuje obojí stanovení MIC šarže kmenů (od 15 do 30 klinických kmenů + kontrolní kmeny, v závislosti na použitém modelu inokulátoru).

Princip metody spočívá v seti testovaných mikroorganismů na Petriho miskách agarem obsahujícím dvojité ředění antibiotik. Současně se provede testování šarže klinických kmenů a odpovídajících kontrolních kmenů, jakož i monitorování růstu mikroorganismů na plotnách bez antibiotika a monitorování čistoty kultury nanesením vzorků inokula na neselektivní kultivační média. (Semina & Sidorenko 2004).

Metoda sériových ředění v agarovém médiu se vyznačuje výhodou, že mikrobiální kontaminanty jsou snadno detekovatelné a v zásadě nemění celkové výsledky titrace, zatímco na kapalných médiích může být celý experiment neprůkazný v důsledku požití alespoň jednotlivých buněk mikroorganismů odolných vůči vnějším vlivům. Tato metoda se také

používá při práci s mikroorganismy, které nerostou na běžných kapalných médiích, například *Mycobacterium tuberculosis*, které se pěstují na médiu obsahujícím koagulované sérum.

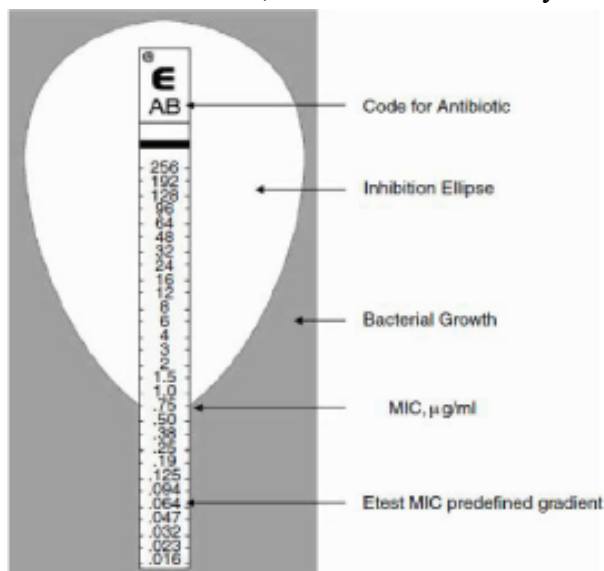
Na rozdíl od metody mikrodiluce jsou hlavní nevýhody makrodiluční metody zdlouhavé ruční provádění, riziko chyb při přípravě antimikrobiálních roztoků pro každý test, stejně jako relativně velký počet činidel a požadovaný prostor (Jorgensen & Ferraro 2009).

Ke stanovení MIC methanolových extraktů 12 léčivých rostlin byla použita agarová diluční metoda pro gram-pozitivní (5 kmenů) a gram-negativní bakterie (10 kmenů). Všechny 12 extraktů z 8 léčivých rostlin (listů nebo kořenů) bylo aktivní proti gram-negativním a gram-pozitivním bakteriím. Gram-negativní látky vykazovaly silnější účinek než gram-pozitivní bakterie. Koncentrace MIC kolísaly od 0,6 $\mu\text{g/ml}$ do 5 000 $\mu\text{g/ml}$. Nejnižší hodnoty MIC (0,6 $\mu\text{g/ml}$) a MBC (1,22 $\mu\text{g/ml}$) byly získány s extrakty pro 4 a 3 z 15 testovaných mikroorganismů (Kang et al. 2011).

Pro identifikaci baktericidního účinku léčiva se naočkuje MPA ze všech zkumavek, kde růst mikroorganismu není vizuálně pozorován. Pro perzistentní antimikrobiální látky, které jsou adsorbovány na mikrobiální buňky a inhibují jejich růst i v čerstvém živném médiu, se používají vhodné neutralizátory (Blinova N.P. 1988).

3.1.9.3 E-test

E-test je unikátní gradientní technika pro studium účinnosti antibakteriálních léčiv. Pomocí inovativní technologie suché chemie se na plastový proužek umístí 15 ředění antibiotika pro stanovení MIC. Stanovený gradient poskytuje přesné hodnocení antibakteriální aktivity léčiva, a to jak ve vztahu k vrtošivé, tak ve vztahu k běžným mikroorganismům.



Obrázek 3 – E-test

Postup hodnocení je přímý. Pásek antibiotika je umístěn na povrch očkovaného klinického izolátu. Pod páskem se vytvoří stabilní a kontinuální gradient antibiotika. Po inkubaci se vytvoří elipsa potlačeného růstu patogenu, která překračuje měřítko hodnot koncentrace antibiotik, čímž se získá hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC) v $\mu\text{g/ml}$.

Metoda E-testu je založena na kombinaci dvou konceptů - ředění a difúze, používaných v moderních metodách pro hodnocení citlivosti mikroorganismů na antimikrobiální látky. Na

rozdíl od disko-difúzní metody, která je ve skutečnosti kvalitativní, však E-test dává numerické hodnoty MIC a ve srovnání s metodou dvojitého ředění je numerický výsledek mnohem přesnější a reprodukovatelnější díky lineárnímu gradientu koncentrace antimikrobiálního léčiva na proužku.

Tato metoda je jednoduchá, není časově náročná a umožňuje testovat jemné mikroorganismy (streptokoky, pneumokoky, hemofily, gonokoky, anaeroby). Nepoužívá se z důvodu vysokých nákladů (Menshikova 2009).

3.1.10 Antimikrobiální a antioxidační aktivita éterických olejů

Používání léčivých rostlin celosvětově roste. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) přibližně 80% světové populace v současné době používá bylinné léky přímo v čaji nebo s vodou, mlékem a alkoholem. Přestože moderní syntetická léčiva se používají hlavně ve vyspělých zemích, používání rostlinných přípravků se výrazně zvýšilo. Stále roste poptávka po rostlinném materiálu. Je třeba poznamenat, že o většinu rostlin se biotechnologie a genetika zajímá jen částečně a jejich terapeutický potenciál nebyl zveřejněn (Kayser et al. 2006).

Je známo, že éterické oleje mají široké spektrum biologické aktivity. Nejvýraznější jsou baktericidní a fungicidní vlastnosti éterických olejů (Pasdaran & Sheikhi 2016). Různé třídy organických sloučenin, které tvoří éterické oleje, mění rychlost biochemických reakcí, což má destruktivní účinek na cytoplazmatické membrány a mezosomy mikroorganismů a snižuje aktivitu oxidační fosforylace (Vaara 1992). Biologická aktivita éterických olejů závisí na složení, kvalitativních a kvantitativních vlastnostech, které jsou zase určovány chemotypem rostlin, půdou a geografickými podmínkami jejich růstu, vlastnostmi technologie pro přípravu a zpracování rostlinných materiálů a řadou dalších faktorů (Dhifi et al. 2016).

Mnoho studií v posledních letech se zaměřilo na prospěšné vlastnosti éterických olejů, včetně antibakteriálních vlastností. Takže v mém předchozím vědeckém výzkumu se mi podařilo prozkoumat a prokázat antimikrobiální aktivitu éterických olejů různých bylin a rostlin na Sibiři (Satornik et al. 2016).

Zvláště zajímavé je studium přírodních sloučenin, jako jsou éterické oleje, které jsou zodpovědné za farmakologické vlastnosti mnoha léčivých rostlin. Jejich blahodárný účinek na lidské tělo se projevuje také vdechováním vzduchu, obsahující malá množství éterických olejů. Je třeba poznamenat, že v řadě zemí ve Středomoří, na Kavkaze, žije největší počet stoletců. V horkém období obsahuje vzduch těchto regionů těkavé složky bylin (tymián, oregano, pikantní, tymián, levandule, rozmarýn a další), které neustále vstupují do těla lidí, kteří tam žijí. Kromě toho je kořenitá zelenina zásadním prvkem výživy a samozřejmě pozitivně přispívá k udržení zdraví obyvatel těchto regionů (Efremov et al. 2013).

Je pravděpodobné, že stálé používání malých dávek těkavé antioxidantů je jedním z faktorů, díky kterému umožňuje pro tyto lidi dlouhý a zdravý život. Studie na toto téma však nebyly provedeny. V posledních letech byla aktivně studována antiparazitická, fungicidní, analgetická, protizánětlivá, anti-radikální, antioxidační a protirakovinová aktivita éterických olejů, přičemž většina studií byla provedena v modelových experimentech na buněčných kulturách *in vitro* (Misharina & Polshlov 2005).

Bohužel neexistuje prakticky žádná práce s laboratorními zvířaty *in vivo*, stejně jako neexistují údaje o účinku na organismus a o délce života při dlouhodobém příjmu éterických

olejů. Proto je studium vlivu éterických olejů na fyziologické a biochemické procesy in vivo v různých stádiích života od narození do stáří laboratorních zvířat důležitým a naléhavým úkolem.

V současné době přitahuje pozornost vědců téma volných radikálů a reaktivních částic obsahujících kyslík. Konzumované potraviny a nepříznivé podmínky prostředí mají významný dopad na biologickou produkci volných radikálů (Pisoschi et al. 2011).

Antioxidanty - látky, které mohou přímo interagovat s volnými radikály za vzniku inaktivních sloučenin. Bioantioxidanty (BAO) jsou látky, které vykazují vlastnosti inhibitorů oxidačních reakcí v modelových procesech oxidace volných radikálů a zachovávají si tuto vlastnost, když jsou zavedeny do biosystému (Halliwell 2007). Porušení alespoň jednoho postulátu neumožňuje volajícím látkám bio antioxidanty. Navzdory skutečnosti, že je možné zvýšit stabilitu lipidů vůči oxidaci pomocí látek, které jsou synergisty s přírodními antioxidanty nebo se v procesu metabolismu mění na antioxidanty, BAO musí mít schopnost modelovat oxidační proces volných radikálů v modelu reakce. Tato vlastnost nám umožňuje předpovídat spektrum jejich biologických účinků a provádět řízenou syntézu léčiv (Burlakova et al. 2008).

V posledních letech vědci na celém světě věnují zvláštní pozornost hledání nových přírodních antioxidantů, které, na rozdíl od syntetických, nemají prakticky žádné vedlejší účinky, zatímco mají komplex různých typů biologické aktivity (Satornik 2015).

Antioxidanty hrají důležitou roli v regulaci průběhu transformace volných radikálů v těle, významně ovlivňují jeho stav, proto se v poslední době rozšířily antioxidanty a studium antioxidantních vlastností sloučenin (Ladas et al. 2004; Fang et al. 2002; Khasanov et al. 2004).

Nejslibnějšími zdroji antioxidantů jsou rostlinné objekty (Matthaus 2002). Zahrnují takové přírodní antioxidanty, jako jsou fenolové sloučeniny, pigmentové látky (antokyany, chlorofyly, karotenoidy) a vitaminy (Vertuani et al., 2004).

Při léčbě různých onemocnění je účinnost užívání léků často omezena vedlejšími nebo toxickými účinky. Na cestě k vyřešení tohoto problému je zvláště důležité hledat nízko toxické přírodní bylinné přípravky s určitými vlastnostmi. Léčivé vlastnosti některých rostlin byly v Číně dobře známy před 5 000 lety. Koření a byliny byly používány jako léky ve starověkém Egyptě a Sýrii a také jako přírodní konzervační látky ve starém Římě a Řecku (Parry 1953).

Řada epidemiologických studií potvrdila, že strava obohacená o ovoce a zeleninu pomáhá snižovat riziko vzniku kardiovaskulárních chorob a některých typů rakoviny (Gordon 1996; Heber 2004).

Je známo, že léčivé vlastnosti mnoha rostlinných přípravků používaných v lidovém lékařství jsou způsobeny přítomností organických a anorganických sloučenin s různými typy biologické aktivity, včetně antioxidantních vlastností. Takové sloučeniny zahrnují karotenoidy, flavonoidy, antokyany, fenolové kyseliny, kumariny, taniny, jakož i některé kovy Mn, Cu, Zn (Cuppert 1998; Wei et al. 2007; Nakatani 2000; Craig et al. 1999; Liu 2004)

Zájem o studium a používání látek přírodního původu v posledních letech dramaticky vzrostl. Na rozdíl od syntetických přípravků mají tato léčiva výrazně méně vedlejších účinků, často vykazují výrazný biologický účinek při nižších koncentracích díky přítomnosti přírodních synergických látek (Liu 2004). Biologicky aktivní sloučeniny rostlinného původu jsou chemicky velmi rozmanité.

Použití antioxidantních léčiv je indikováno k prevenci mnoha nemocí a jejich použití během intenzivní terapie může zvýšit účinnost určitých léků. Jak je známo, většina syntetických

antioxidantů je strukturními analogy přírodních molekul a jejich mechanismy jsou základem jejich působení. Z toho by mělo být uznáno, že je odůvodněné pravidelně brát přípravky obsahující přirozené AO, aby se zvýšil stav AO v těle a snížilo se riziko patologických radikálů (Wang & Boh 2012).

Zdrojem přírodních antioxidantů jsou byliny, kořeny, koření a výtahy z různých částí rostlin. Takové rostliny a přípravky z nich obsahují velké množství různých biologicky aktivních látek, včetně antioxidantů, které zahrnují některé vitaminy, polyfenoly - flavonoidy, karotenoidy a také éterické oleje. Biologický účinek antioxidantů je založen nejen na jejich schopnosti zachytit volné radikály, ale také na ovlivnění přenosu buněčných signálů (Carlsen 2010).

V řadě vědeckých prací bylo zjištěno, že příjem éterických olejů nebo výtahů z aromatických rostlin nebo koření byl doprovázen snížením intenzity peroxidace lipidů v orgánech a tkáních laboratorních zvířat a také vedl ke zvýšení aktivity antioxidantních a ochranných enzymů (Anilakumar et al. 2001; Banerjee et al. 1994; Bhattacharjee et al. 2007; Kapoor et al. 2010; Misharina et al. 2014). Tato data prokazují, že éterické oleje jsou účinnými bioantioxidanty.

Zvláštní místo mezi biologicky aktivními éterickými oleji zaujímá cibule a česnekové éterické oleje. Na rozdíl od ostatních, éterické oleje těchto rostlin sestávají z těkavých dialkyl polysulfidů, látek profylaktické a terapeutické hodnoty. Tyto sloučeniny se vytvářejí enzymaticky v době sekání cibule nebo česneku z prekurzorů S-alkyleystein sulfoxidů. V cibuli obsahují dialkylpolysulfidy jako alkyly propylové a propenylové substituenty, v česneku obsahují hlavně allylový substituent. Účinnost česnekového éterického oleje a jeho jednotlivých složek ve vztahu k různým typům karcinogeneze byla potvrzena mnoha studiemi (Milner & Nutr 2001).

Vzhledem k rostoucí popularitě éterických olejů a dalších sloučenin rostlinného původu v průmyslu, medicíně a potravinářství jako složek tzv. funkční výživa, výše uvedené problémy se stávají stále akutnější a relevantnější. Je zřejmé, že přírodní AO a biologicky aktivní látky, jako éterické oleje, jsou slibnými prostředky k nápravě mnoha patologických stavů. Není však méně zřejmé, že v současné době existuje nedostatek vědeckého výzkumu zaměřeného na studium způsobů, jak éterický olej ovlivňuje metabolismus, vývoj a průběh nemocí v živém organismu.

3.2 Extrakty

3.2.1 Technologie extrakce biologicky aktivních látek

Extrakce - metoda extrahování látky z roztoku nebo suché směsi pomocí vhodného rozpouštědla (extrakčního činidla)

V závislosti na použitém rozpouštědle mohou být extrakty vodné, alkoholové, éterické atd. A jejich konzistence kapalné, husté, silné a suché. Extrakce určité látky z rostlinných materiálů je založena na výběru rozpouštědla a podmínkách extrakčního procesu (Panfilov et al. 2001)

Výhody tinktur a extraktů jsou: jednoduchost technologie, vysoká dostupnost a nízká cena, široké spektrum účinku. V některých případech je však tinktura a extrakty obtížné

standardizovat, mnohé z nich nejsou analyzovány na obsah účinných látek. Mají vlastnost „stárnutí“ při narušení složení léku za vzniku sedimentu, používají se orálně nebo topicky (Minina et al. 2004).

Mezi hlavní metody extrakce rostlinných materiálů patří

- macerace (infuze),
- perkolace,
- kontinuální Soxhletova extrakce,
- extrakce vodou a alkoholem,
- ultrazvukové ošetření (US),
- mikrovlnná extrakce, infuze,
- odvarování,
- extrakce superkritickou tekutinou (Hostettmann 2014)

Metoda macerace (infuze) je nejstarší metodou extrakce. Získání extraktů macerací je následující: drcený rostlinný materiál se umístí do uzavřené nádoby s rozpouštědlem a udržuje se při pokojové teplotě. Doba infuze byla určena počtem extraktů. Poté byla směs vypuštěna, zfiltrována a vyčištěna (Minina et al., 2004).

Macerace je jednoduchá metoda extrakce, která, i když je cenná, představuje nevýhodu dlouhé doby extrakce a nízké účinnosti. Důležitým bodem této metody je volba rozpouštědla, která vymezuje třídy sloučenin získaných ze vzorků a také umožňuje maceraci pro extrakci termolabilních složek (Azwanida 2015; Handa et al 2008)

Metoda perkolace je hlavní metodou výroby tinktur a extraktů. Extrakce perkolační metodou se liší od macerační metody v tom, že po krátké infuzi během extrakce je maximální koncentrační rozdíl vytvořen postupným přemístěním extraktu čistým extraktantem.

Výhodou této metody je to, že takto získaný extrakt je vysoce koncentrovaný a obsahuje velký podíl aktivních složek a může být použit v nižších jednotkových dávkách pro zajištění lepší léčby léčivem. Rozpouštědlo je směs destilované vody a vody modifikované katalyzátorem. Směs zvyšuje extrakci účinných látek pro zlepšení zpracování a také zlepšuje kvalitu a zpracování extraktu (Sweet & Earle 2003).

Extrakce nižšími alkoholy a vodou umožňuje izolovat látky rozpustné ve vodě a alkoholu, jako jsou fenolové sloučeniny, glykosidy, ve vodě rozpustné uhlovodíky atd. Zároveň do extraktu přechází mnoho dalších cenných látek: lipidy, minerály, deriváty chlorofylu, karotenoidy a vitamíny (rozpustné v tucích) (Коровкина et al., 2007).

Soxhletova extrakce je tradiční technologie pro extrakci biologicky aktivních látek. Tato metoda umožňuje téměř úplně extrahovat látku ze suroviny opakovanou extrakcí rozpouštědlem ve zvláštním zařízení. Rostlinné suroviny se rozdrtí a umístí do sáčku (ve formě kazety) z filtračního papíru. Patrona se umístí do extraktoru Soxhletova aparátu a podrobí se extrakci rozpouštědlem. Olovo zahřívejte, aby byl var rovnoměrný. Množství rozpouštědla nalitého do extraktoru musí být dostatečné, aby bylo přeneseno přes sifonovou trubici do přijímače (Handa, S.S. et al., 2008).

Moderní metody extrakce chemikálií jsou účinnější a rychlejší. V současné době se extrakce látek z rostlinných materiálů provádí metodami, jako je ultrazvuková extrakce (Vinatoru 2001) a SFE (Lang et al. 2001).

3.3 Současný stav výzkumu rostlin čeledi *Brassicaceae*

Čeď *Brassicaceae* (*Cruciferae*) zahrnuje brokolici, zelí a květák, křen, ředkvičky, ředkvičky, tuřín a další zeleninu. Stejně jako veškerá zelenina obsahují uhlohydráty, vitamíny a minerály, ale jejich chemické složení je jedinečné díky vysokému obsahu látek obsahujících síru - glukosinolátů, které způsobují specifickou vůni a štiplavou chuť čeledi (Higdon et al 2007).

V zelenině jsou glukosinoláty chemicky a tepelně stabilní, ale pokud je narušena integrita buňky, hydrolyzují působením enzymu za vzniku isothiokyanátů a indolových sloučenin.

Je známo, že se z glukosinolátů tvoří více než sto isothiokyanátů (Fowke 2003). Například glukorafanin je prekurzorem sulforafanu, allylisothiokyanát je sinigrin, hydroxybenzitisothiokyanát je sinalbi

Práce (Andini et al. 2020) určila specifitu antimikrobiální aktivity různých isothiokyanátů čeledi *Brassicaceae* pomocí mikrodiluční metody. Bzlo testováno 11 izothiokyanátů na jejich antimikrobiální aktivitu ve vztahu k kazení potravin nebo patogenním mikroorganismům, včetně: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida holmii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*. Všechny testované isothiokyanáty vykazovaly inhibiční růstový účinek na všechny testované mikroorganismy . 9-methylsulfonylnonyl-ITC (9-MSoITC) a 9-methylsulfonyl-nonyl-ITC (9-MSITC) byly neúčinnější proti *B. cereus*, s minimální inhibiční koncentrací (MIC) 25, respektive 50 µg / ml. Navíc izothiokyanáty vykazovaly destruktivní účinek na všechny testované mikroorganismy.

Autoři (Blažević et al. 2011) zkoumali antimikrobiální aktivitu rostliny *Aurinia leucadea* stanovením inhibičních zón pomocí difúzní metody na disku a minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pomocí mikrodiluční metody. Na základě studie bylo zjištěno, že inhibují širokou škálu bakterií a hub, s hodnotami MIC 2,0–32 , 0 µg / ml, což ukazuje na jejich slibný antimikrobiální potenciál, zejména proti houbám *Candida albicans* a *Rhizopus stolonifer*, jakož i proti klinicky důležitému patogenu *Pseudomonas aeruginosa*.

Výsledky výzkumu (Prasad 2014) naznačují vysokou biologickou aktivitu rostlin čeledi *Brassicaceae*. Methanolvý extrakt listů z kvěťáku vykazoval maximální inhibiční zónu proti *E. coli*. Ethanolový extrakt z Pak choy vykazoval nejvyšší inhibiční zónu proti *S.aureus*. *E.coli* byl maximálně inhibován chloroformovým extraktem kvěťáku. Extrakt z diethyletheru z listů kvěťáku měl maximální inhibiční zónu proti *P.aeruginosa*

Chloroformový extrakt z kvěťáku měl mezi všemi vzorky extrahovanými pomocí chloroformu nebo rozpouštědel, jako je diethylether, methanol a ethanol, maximální inhibiční zónu s průměrem 34 mm. Listový extrakt Pak choy ze všech čtyř rozpouštědel vykazoval inhibici proti všem mikroorganismům, což naznačuje, že Pak choy lze použít jako antimikrobiální činidlo proti těmto mikroorganismům bez ohledu na rozpouštědlo použité pro eluci aktivních sloučenin. To naznačuje, že listy čeledi *Brassicaceae* mohou být zdrojem přirozeně dostupné potravy mající antimikrobiální aktivitu

Ve svém předchozím studiu (Satornik et al. 2016) *Brassica Rapa L* bylo zjištěno, že kořenová plodina obsahuje malé množství (~ 1%) éterického oleje. Tento éterický olej, který jsme získali, byla tmavě modrá kapalina těžší než voda. V elektronickém absorpčním spektru

oleje ve viditelné oblasti byly zaznamenány absorpční pásy charakteristické pro chamazulen (732, 660 a 605 nm). Pomocí metody chromatografie-hmotnostní spektrometrie bylo ukázáno, že složení éterického oleje je představováno 17 složkami, které tvoří 99,2% součtu všech olejových složek. Hlavními složkami oleje s celkovým obsahem 91,8% jsou tři izomery azaronu: α -azaron ((E) -azaron), β -azaron (Z) -azaron) a γ -azaron (sekichon) s převahou β - azaron (57,4%).

Výsledky mého studia (Satornik et al. 2016) mikrobiologické aktivity ukázaly, že tuřínový olej inhibuje růst testovaných kmenů *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella pneumoniae*. Ve vztahu k kmenům *Acinetobacter baumannii* a *Staphylococcus aureus*, éterický olej *Brassica rapa* L. vykazuje nulový efekt. Bylo zjištěno, že éterický olej *Brassica rapa* stimuluje množení kmenů *Escherichia coli*.

Hlavní pozornost byla zaměřena na stanovení biologicky aktivních látek s výraznými redukčními vlastnostmi v *Brassica rapa* L. Přítomnost takových sloučenin poskytuje antioxidační aktivitu suroviny, která se nakonec projevuje v antimikrobiálním, protizánětlivém a v některých případech antikarcinogenním účinku fytonutrientů. Výsledky kvantitativní analýzy studovaných vzorků tuřín ukázaly, že obsah vitamínu C, jako nejučinnějšího redukčního činidla, byl $61,0 \pm 0,2$ mg% na 100 g čerstvého kořene. Ve studovaných surovinách nebyl nalezen vitamin P.

Také v *Brassica rapa* byly detekovány redukční látky - snadno hydrolyzovatelné cukry - v množství $3,02 \pm 0,15$ g na 100 g suché suroviny. Obsah taninů byl stanoven v množství $0,49 \pm 0,02$ g / 100 g. Celkový obsah flavonoidů byl $1,07 \pm 0,05$ g na 100 g suché suroviny. Studie farmakologických vlastností azaronů ukázala, že sloučeniny mají uklidňující, hypnotický, analgetický účinek. Byla také zjištěna schopnost asaronů uvolnit křeče hladkého svalstva a snížit krevní tlak

Ukázalo se, že obsah glukorafaninu jako prekurzoru sulforafanu ve studovaných surovinách je biologicky významný a srovnatelný s ukazateli pro jiné zástupce kruciferózní rodiny, doporučené jako rostlinná surovina s antikarcinogenním účinkem. Spektrofotometrická studie antioxidační aktivity za použití modelové autooxidační reakce adrenalinu (in vitro) odhalila, že na rozdíl od vodného extraktu ze suchých surovin má čerstvě vymačkaná šťáva *Brassica rapa* L. výrazný antioxidační účinek. Studie prokázaly, že kořenová plodina je nejcennější a nejužitečnější jako antioxidant v čerstvé, tepelně neošetřené formě.

3.3.1 Česnáček lékařský (*Alliaria petiolata*)

3.3.1.1 Botanická charakteristika a rozšíření

Alliaria petiolata (M. Bieb.) Cavara & Grande je dvouletá bylinná rostlina vysoká 20 až 100 cm se silnou vůní česneku. Stonek je vztyčený, s namodralým květem, lysým, obvykle poddimenzovaným. Spodní listy jsou na dlouhých stopkách, pupenovitým, hrubozrnném plášti, uprostřed - ve tvaru srdce, horní - zubaté zuby. Květy jsou bisexuální, malé, se čtyřmi okvětními lístky, bílé v apikálním květenství racemózy. Ovoce - dlouhé čtyřstěnné otevírací lusky s konvexními křídly. Květy v dubnu až červnu přináší plody v květnu až červenci (Dobracheva 1987).

Česnáček je rostlina hojně rostoucí v listnatých a křovištních lesích, hájích, narumištích a zahrádkách. Má ráda humózní, vlhké půdy, písčité i hlinité (Janca 1994).

Rostlina česnáčku lékařského je rozšířena téměř po celé Evropě, v asijských zemích (střední, střední a západní Asie, Čína, Kavkaz, Nepál, Indie, Pákistán) a také na africkém kontinentu (severní Afrika). Více než 70 různých evropských druhů hmyzu a asi 7 evropských druhů hub používá jako základ potravin česnáček lékařský. Na této rostlině se žíví mnoho larev některých druhů motýlů a můr. V Severní Americe byl zaveden jako kulinářská bylina v 60. letech 20. století, ale protože neexistují významní přirození nepřátelé, je schopna překonat a vysídlit mnoho svých původních druhů díky vysoké produktivitě osiva a monopolizaci zdrojů a je považována za invazivní odvětví (Nuzzo 1999).

3.3.1.2 Tradiční využití

Česnáček lékařský patří do čeledi *Brassicaceae*. Listy, květiny a ovoce jsou jedlé jako potrava pro lidi. Mají jemnou chuť česneku a hořčice. Zelené lusky semen *A. petiolata* jsou smažené, drcené semínko je koření a česnekové vůně se přidávají do pikantních pokrmů. Rostlina je známá svými farmakologickými vlastnostmi. *A. petiolata* v čaji je čistič krve; kvetoucí rostlina je expektorantní, antiseptická, stimulační a antiastmatická, vyhánět červy a pomáhá hojit rány; obklad léčí kožní vředy a řezy a šťáva stimuluje průtok krve (Bowles 2004).

Dle Janca (1994) teoreticky je možno drogu podávat formou nálevu, ale v čajích česnekové aroma většinou silně proráží a mnozí lidé je nesnášejí. Proto se doporučuje raději formu prášku, podávaného 3 až 4 krát denně na špičku kulatého nože. Nálev se používá pouze pro vnější použití a pro klyzmata.

3.3.1.3 Biologická aktivita

Léčivé rostliny mají schopnost inhibovat růst širokého spektra patogenních mikroorganismů v důsledku přítomnosti éterických olejů. Antimikrobiální vliv éterických olejů a jejich různých složek extrahovaných z léčivých rostlin byl dobře zdokumentován (Hammer et al. 1999; Hood et al. 2003; Duschatzky et al. 2005)

Janca (1994) uvádí, že droga má desinfekční účinky na močový trak i na dýchací cesty. Je velmi vhodná k zevní léčbě zahnívaných ran a zánětů pokožky, včetně bakteriálních (například růže). Může se použít i na kloktání a převalování v ústech při zánětech v ústní dutině, ale i při paradentóze. Mírně zlepšuje spalování tuků, takže ji můžeme aplikovat i při poruchách žlučníku a slinivky, stejně jako při zvýšeném obsahu tuku v krvi. Má taky účinek protisklerotický.

Jsou také známy některé údaje o chemickém složení této rostliny. Uvádí se, že listy obsahují flavonoidy, pryskyřice, sinigrinový glykosid atd. Semena obsahují asi 30% oleje, který obsahuje erukovou, linolovou, olejovou a řadu dalších mastných kyselin (Корниевский 2004).

Ve studiích Blaževiče et al. (2008) bylo chemické složení éterického oleje podrobně studováno pomocí plynové chromatografie. Čtyřicet čtyři těkavých látek z *Alliaria petiolata* bylo identifikováno po hydrodistilaci v Clevenger aparátu. Esenciální oleje byly izolovány z čerstvého a suchého rostlinného materiálu. Těkavé sloučeniny byly analyzovány plynovou chromatografií (GC) a hmotnostní spektrometrie (GC-MS). Hlavními složkami byly organické

sloučeniny nitrilu a síry. Byly to allylthiokyanát (40,3–47,2%), 3,4-epithiobutannitril (3,8–10,2%), allyl nitril (0,6–7,6%), allylthiokyanát (1,2–2,1%), které jsou uvolňovány z glukosinolátu sinigrinu degradací. V olejích z autolyzovaného rostlinného materiálu našli diallyl disulfid (7,2%), diallyl sulfid (0,7%), 3-vinyl-3,4-dihydro-1,2-dithiin (0,5%) a 2-vinyl-4H-1,3-dithiin (0,3%) které se uvolňují degradací S-alke (en) ylcytein sulfoxidu (Blažević et al. 2008).

3.3.1.3 Obsahové látky

Hlavními obsahovými látkami jsou allylsulfid, rhodanlyl (sírnaté glykosidy) a alliarin, beta karoten, éterický olej, pektin, kyselina a askorbová. Droga je ovšem celkově velmi málo prozkoumána (Janca 1994).

Charakteristická chuť a vůně všech rostlin *Brassicaceae* (zelí, květák, brokolice, ředkvička, křen, hořčice, řepka olejka) byla přičítána těkavým sloučeninám obsahujícím síru, které se vyvíjejí při thioglukosidázové hydrolyze glukosinolátů po poškození tkáně. Bylo zjištěno, že třída glukosinolátových sloučenin *Alliaria petiolata* obsahuje sinigrin a glucotropaeolin (Daxenbichler et al. 1991).

V mém předchozím výzkumu *Brassica rapa L.*, který také patří do čeledi *Brassicaceae*, jsme také studovali aktivitu proti rakovině v důsledku přítomnosti glukorafaninu. V našich vzorcích bylo nalezeno dostatečně velké množství tohoto glukosinolátu (Саторник et al. 2016)

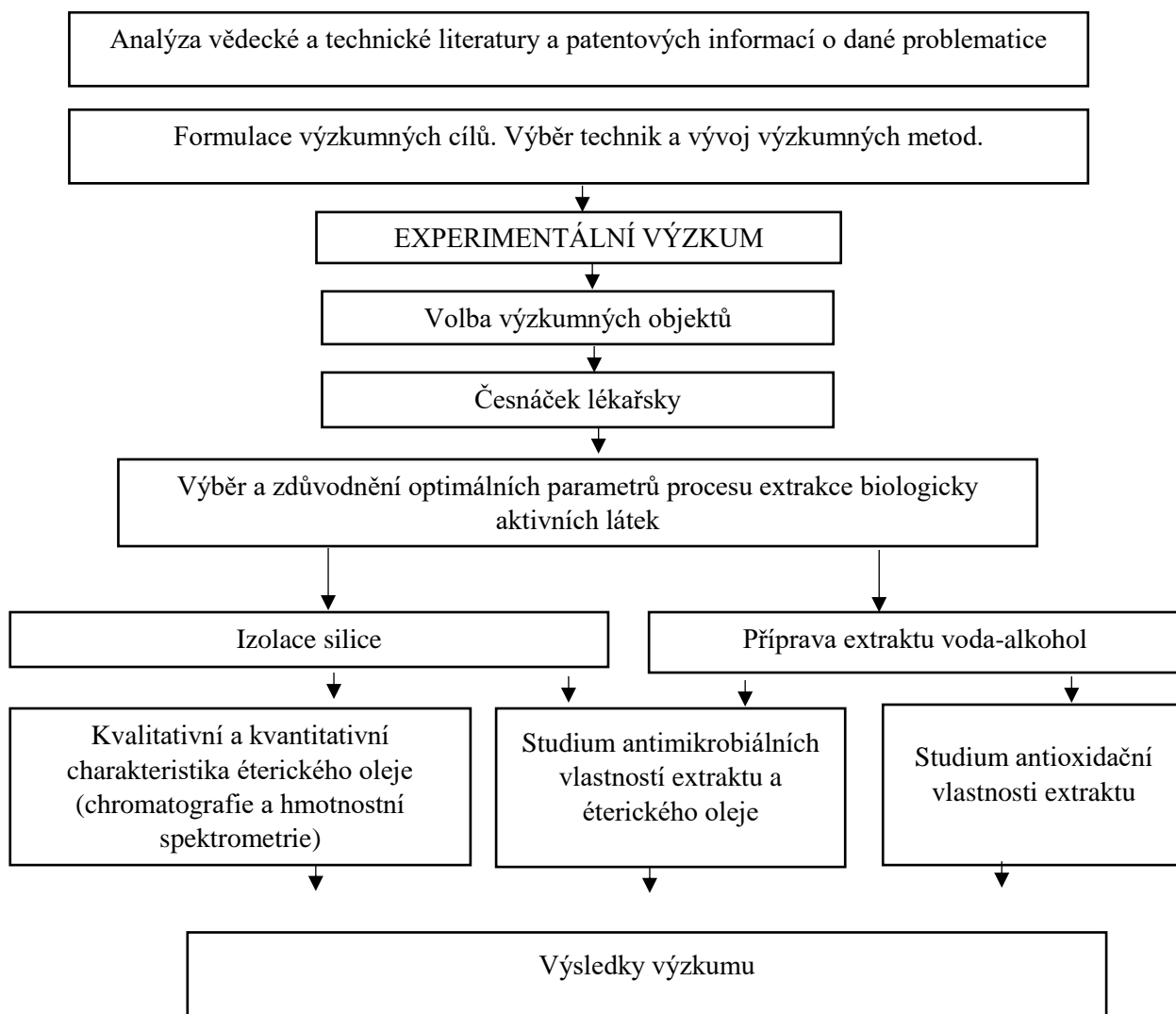
Je obtížné přeceňovat prospěšné vlastnosti česnáčku lékařského. Česnáček má díky svému cennému chemickému složení anthelmintický (anthelmintický), vykašlávání, diaforický, diuretický, antiastmatický a antiseptický účinek. Například flavonoidy obsažené v listech česneku *Sciatica* mají silný antioxidační účinek na lidské tělo a přispívají k jeho uzdravení a omlazení. Kyselina askorbová nalezená v listech této rostliny má také antioxidační účinek. Karoten ve struktuře česneku pomáhá zlepšit funkci plic (Alekseev 1974).

Na základě literární rešerše lze konstatovat, že antimikrobiální a antioxidační aktivita éterického oleje a extraktů *Alliaria petiolata* nebyla studována, čehož se tato práce bude věnovat.

4 Metodika

V rámci práce byla testována antimikrobiální aktivita a antioxidační aktivita éterického oleje a lihového extraktu česnáčku lékařského

4.1 Struktura výzkumu.



4.2 Sběr rostlinného materiálu a příprava vzorků

Předmětem studia byla rostlina *A. petiolata*. Sběr a sklizeň proběhla v Praze okrese Uhřetěves v období květu, koncem května 2019. Rostlina (stonky a listy) byla odstraněna z půdy, vysušena ve stínu při pokojové teplotě a dodána do laboratoře. Rostliny sušené na vzduchu byly skladovány při relativní vlhkosti 75%. Listy a květy byly odděleny od stonku a homogenizovány

4.3 Chemikálie a kultivační média

- Destilovaná voda
- Mueller Hinton Broth (MHB)
- Sabouraud Dextrose Broth (SDB)
- Ethanol 96%
- Tetracycline
- Tioconazole
- DPPH
- DMSO
- Twin

4.4 Přístrojové vybavení

- chromatograf Agilent 7890A G
- kvadrupólový analyzátor Agilent 5975C
- kolona HP-5MS 30m × 0.25 mm, 0.25 μm film od Agilent (Santa Clara, CA, USA)
- Microtitrační desky
- Vícekanálová pipeta
- Flowbox
- Kyvety
- Stříkačky
- Petriho misky
- Laboratorní váhy
- Vaříč
- Teploměr
- Filtrační papír
- Ostatní laboratorní sklo a pomůcky

4.5 Destilace silice

Prvním krokem před analýzou éterických olejů je jejich izolace.

Před použitím Clevengerův přístroj byl promyt hexanem a několikrát propláchnut destilovanou vodou .

Nasekané a smíšené části sušené rostliny byly podrobeny hydrodistilaci za použití přístroje Clevenger. Vysušené na vzduchu suroviny v množství 359 g (v několika opakování) byly umístěny do baňky s kulatým dnem s destilovanou vodou, namontovány nad ohřívač a uvolněny esenciální olej byl kvantitativně shromažďován v Clevengerově trysce po dobu 3-4 hodin.

Výsledný destilát byl extrahován hexanem. Extrahovaný éterický olej byl uložen v čisté skleněné vialce na tmavém místě při 4 ° C do úplného odpaření hexanu a konstantní hmotnosti silice.

Extrakt byl uchováván v mrazáku v eppendorfcích při $T = -18\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do chromatografické a antimikrobiální analýzy.

Procentuální výtěžek izolovaného esenciálního oleje byl vypočten vzhledem k jejich suché hmotnosti podle vzorce:

$$X = \frac{V \times 100 \times 100}{m(100 - W)}$$

kde V - objem silice (cm^3)

m - hmotnost suroviny (g)

W - úbytek hmotnosti sušením surovin (%)

Pro další studium antimikrobiální aktivity byl éterický olej rozpuštěn v alkoholu a Tween v poměru 1: 2, vortexován a nalit do eppendorfek a zmražen při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6 Příprava lihového extraktu

Ke kontrole antimikrobiálního účinku a antioxidační aktivity byly použity alkoholové extrakty česnáčku lékařského

Část sušeného drceného rostlinného materiálu o hmotnosti 25 g umístí se do baňky o objemu 700 ml. Pro extrakci a přípravu pracovních roztoků se používal 70% ethanol.

Rostlinný materiál byl extrahován ve zvoleném poměru extraktorů surovin 1:20 pro stabilitu systému.

Extrakce probíhala po dobu 24 h při pokojové teplotě za stálého míchání na laboratorní třepačce. Extrakt byl potom oddělen od bylinného zbytku filtrací přes papírový filtr a poté sterilizován přes membránový filtr (průměr pórů $0,45\text{ }\mu\text{m}$) ve sterilní vakuové filtrační aparatuře

Získaný roztok byl pak odpařen ve vakuové odparce při teplotě $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně dosušen v exsikátoru. Vysušený extrakt byl pak znovu resuspendován v DMSO na požadovanou koncentraci.

4.7 Použité mikroorganismy

Pro testování byly použity standardní sbírkové kmeny ze sbírky ATCC (American Type Culture Collection)

- *S. aureus* ATCC 29213
- *E. coli* ATCC 25922
- *E. faecalis* ATCC 51299
- *C. albicans* ATCC 10231
- *B.cereus* ATCC 1177
- *P. aeruginosa* ATCC 27853

4.8 Příprava médií a inokula

Pro hodnocení citlivosti se používají média speciálně určená pro tento účel. Mueller Hinton Broth (MHB) – bakterie, Sabouraud Dextrose Broth (SDB) – kvasinky

Vybrané kultivační médium pro stanovení citlivosti se připravuje ze suchého prášku průmyslové výroby v souladu s pokyny výrobce. Po vaření se živné médium ihned nalije do skleněných lahví a pevně se uzavře a autoklávuje 25 min 121° C.

Pro přípravu inokula se používá čistá denní (24h) kultura mikroorganismů pěstovaných v živném médiu. Malé množství materiálu (1-2ml) se pomocí stříkačky přenese do zkumavky se sterilní živnou půdou tak, aby se hustota inokula zvýšila o 0,5 v souladu se standardem MacFarland. Inokulum by mělo být použito do 15 minut po přípravě.

4.9 Stanovení minimální inhibiční koncentrace bujónovou mikrodiluční metodou

4.9.1 Postup

Princip této techniky spočívá v ředění antimikrobiální látky v jamkách mikrotitrační destičky. Každá následující koncentrace se rovná polovině předchozí koncentrace.

Hodnocení citlivosti na antibiotika zahrnuje postupnou implementaci několika fází:

- příprava kultivačních médií;
- příprava suspenze studovaných mikroorganismů (inokulum);
- očkování;
- inkubace;
- účtování a interpretace výsledků, formulace doporučení pro léčbu.

Obecnou a zásadně důležitou pro všechny testovací metody je standardizace suspenze studovaného mikroorganismu. Jeho koncentrace by měla být $1,5 \cdot 10^8$ KTJ/ml. Téměř nepřijatelnější metodou pro stanovení koncentrace bakteriální suspenze je měření její optické hustoty. Optická hustota bakteriální suspenze s koncentrací $1,5 \cdot 10^8$ KTJ/ml při vizuální kontrole splňuje standardní zákal 0,5 podle MacFarlanda.

Pro přípravu základních roztoků antibiotik je nutné použít látky antibiotik se známou aktivitou, lékové formy nejsou vhodné. Pro vážení látek je nutné používat elektronické laboratorní váhy s přesností až 4 znaky. Roztoky antibiotik se připravují v koncentraci 512,0 µg / ml a vyšší. Vzorčky antibiotik pro přípravu základních roztoků se připravují s ohledem na jejich čistotu. Vážení přesně vypočítaného množství prášku je téměř nemožné. Připravuje se proto blízko vypočtený vzorek a poté se přepočítava množství požadovaného rozpouštědla.

$$V_{\text{rozpouštědla skutečný}}(ml) = \frac{m_{\text{ATB skutečná}}(mg) \times V_{\text{rozpouštědla teoretická}}(ml)}{m_{\text{ATB teoretická}}(mg)}$$

kde $V_{\text{rozpouštědla teoretický}} = 1 \text{ ml}$

$$m_{\text{ATB teoretická}}(mg) = \frac{\text{počáteční koncentrace ATB (mg)}}{\text{čistota ATB \%}}$$

Vzhledem k tomu, že se antibiotika významně liší v rozpustnosti, je v některých případech potřeba použít různé látky pro primární rozpouštění (solubilizaci) přípravku (rozpouštědla) - DMSO pro thiokonazol a uvést je do předem stanovené koncentrace (ředidla). V případech, kdy

rozpouštědla a ředidla jsou různé látky, musí být k rozpuštění antibiotika použito minimální možné množství rozpouštědla. Destilovaná voda se používá k přípravě pracovních roztoků.

Z pracovních roztoků se připraví dvojnásobná ředění antibiotika. Při výpočtech se jako základ vezme konečná koncentrace antibiotika v médiu 1,0 µg / ml (vyšší - 2, 4, 8 atd.; Nižší - 0,5; 0,25; 0,125 atd.) .). V tomto případě by skutečná koncentrace roztoků měla brát v úvahu ředící faktor antibiotického roztoku během inokulace.

Do každé jamky mikrotitrační destičky se přidá 100 µl média. Poté se do druhé řady zavede pracovní roztok antibiotika v množství 200 µl ml pomocí mikropipety se sterilní špičkou. Důkladně se promíchává a přeneso se 100 µl roztoku antibiotika do třetí řady obsahující nejprve 100 µl bujonu. Tento postup se opakuje, dokud nejsou připraveny všechny potřebné série ředění. Z poslední zkumavky se odebere 100 µl.

Takto se získají řady s antibiotickými roztoky, jejichž koncentrace se v sousedních zkumavkách liší dvakrát.

Suspenzi bakterií se naleje do sterilní vaničky, sterilní hroty „ježka“ se namoče do suspenze a naočkujte sterilní tekutou půdu v připravené mikrotitrační destičce.

Pro stanovení citlivosti metodou mikrozředění se provádí kontrola čistoty za použití speciálně ponechaných pro tento účel jámek mikrotitrační destičky, do které se nepřidávají antibiotické roztoky a mikrobiální suspenze.

Ke kontrole růstu při určování citlivosti metodami ředění se používají speciálně ponechané jamky mikrotitrační destičky, do které se nepřidává antibiotikum.

Destička se potom umístí na 24 hodin do inkubátoru při teplotě 37 pro bakterie a 25 pro kvasinky. Během inkubace musí být destička zakryta víkem, aby se zabránilo vysušení obsahu jamek.

4.9.1 Vyhodnocení

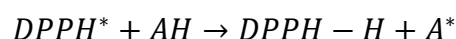
Ředící metody se používají ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) antimikrobiálních látek a jsou referenční metodou testování antimikrobiální citlivosti.

V našich testech se mikroorganismy testují na svou schopnost reprodukovat viditelný růst v živném médiu (rozpuštění v živném médiu) obsahujícím následné rozpouštění antimikrobiálního činidla - silice.

Výsledky se hodnotí vizuálně, porovnáním růstu mikroorganismu v přítomnosti antibiotika s růstem kultury v buňce bez antibiotika.. Za MIC se považuje minimální koncentrace, při které je zajištěno úplné potlačení viditelného růstu studovaného kmene.

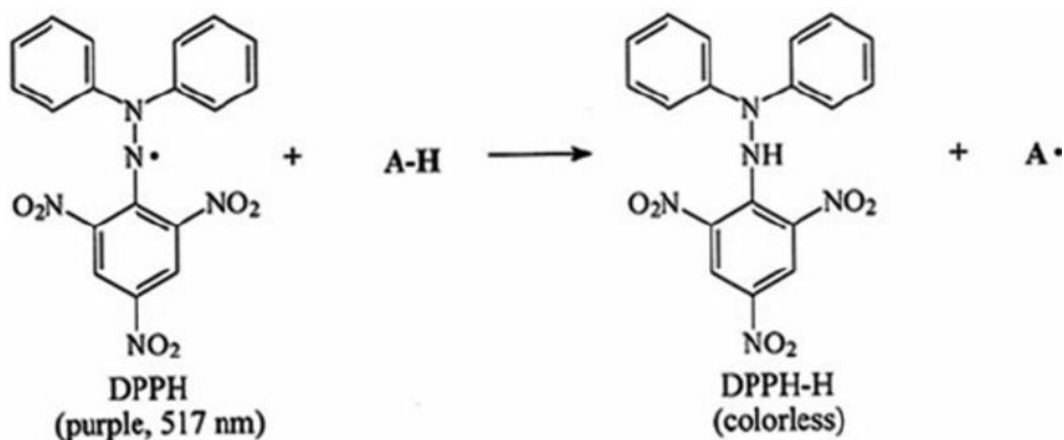
4.10 Antioxidační aktivita

Jednou z metod pro hodnocení antioxidační aktivity (AOA) je kolorimetrie volných stabilních radikálů na základě DPPH reakce DPPH (2,2-difenyl-1 pikrylhydrazyl (C₁₈H₁₂N₅O₆, M = 394,33) rozpuštěného v methanolu se vzorkem antioxidantu (AH) podle schématu:



Redukce DPPH antioxidantem snižuje purpurově modrou barvu DPPH v methanolu a reakce je řízena změnou optické hustoty při 517 nm.

Ke stanovení antiradikální aktivity extraktů česnáčku lékařského byla použita reakce se stabilním radikálem DPPH.



Studium antioxidačních vlastností bylo provedeno spektrofotometricky s 1 mM alkoholovým roztokem DPPH (Sigma-Aldrich) na spektrofotometru.

K přípravě pracovních roztoků bylo použito 175 μ l methanolu. Na mikrotitrační destičce byla připravena ředící řada pro extrakt a vitamín C. DMSO byl použit jako rozpouštědlo pro vitamín C. Poté do jejich počáteční koncentrace 512 μ g/ml byly extrakt a vitamín C upraveny methanolem. Stupeň odbarvení roztoku DPPH po přidání extraktů byl stanoven při 517 nm.

Měření bylo provedeno po 30 minutách inkubace ve tmě.

Pro srovnání antioxidační aktivity byla provedena analýza standardu kyseliny askorbové (512 μ g / ml). Jako indikátory antioxidační aktivity byly zvoleny stupeň inhibice DPPH (%) a antioxidační aktivita IC_{50}

$$AOA = \frac{D_k - D_{vzorek}}{D_k}$$

kde

D_k je optická hustota v kontrolním vzorku;

D_{vzorek} je optická hustota v vzorku.

Každý experiment byl proveden třikrát ve třech opakováních, interval spolehlivosti byl vypočten statistickými metodami pomocí Studentova koeficientu (koeficient determinace $R^2=0,95$).

4.11 GC-MS analýza chemického složení

Složení éterického oleje *A.petiolata* bylo stanoveno pomocí pomoci plynového chromatografu Agilent 7890A GC připojeného k jednomu kvadrupólovému analyzátoru Agilent 5975C. Byla použita kolona HP-5MS 30m \times 0.25 mm, 0.25 μ m film od Agilent (Santa Clara, CA, USA). Jako rozpouštědlo byl použit hexan a objem vzorku 1 μ l byl vstříkovan ve splitovém režimu (poměr 20: 1) do injektoru zahřátého na 250 $^{\circ}$ C.

Počáteční teplota v peci byla nastavena na počátečních 60 ° C na 3 minuty, dále byla zvyšována na 230 ° C rychlostí 3 ° C / min, a poté udržována konstantní po dobu 10 minut. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 1 ml/min. MS analýza byla provedena v režimu «full-scan». Elektronová ionizační energie nastavena na 70 eV.

Identifikace jednotlivých složek byla provedena na základě shody jejich hmotnostních spekter a retenčních indexů s databází National Institute of Standards and Technology Library (NIST, USA) a literaturou (Adams 2007), jakož i koinjecí autentických standardů.

5 Výsledky

5.1 Antimikrobiální aktivita

Na základě provedeného výzkumu byly získány následující výsledky pro antibakteriální aktivitu, chemické složení a antioxidační aktivitu

Standardní antibiotika thioconazol a tetracyklin byly použity jako referenční antibiotika

Ze sušeného materiálu byla vydestilována lehce žluto-zelená, mírně kalná silice, tuhnoucí při pokojové teplotě, o výtěžnosti 0,00173 %. Výtěžnost lihového extraktu byla 0,0047 %

Srovnávací studie antibakteriální aktivity alkoholových extraktů rostliny a jejího éterického oleje s různými koncentracemi biologicky aktivních látek jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 – Minimální inhibiční koncentrace etanolového extraktu a silice *Alliaria petiolata*

	EO (µl/ml)	EtOH (µg/ml)	Tetracyclin (µg/ml)	Tioconazol (µg/ml)
<i>S. aureus</i>	-	-	0.5	-
<i>B. cereus</i>	512	256	1	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	0.5	-
<i>E.coli</i>	-	-	1	-
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	1	-
<i>C.albicans</i>	-	-	-	0.031

Mírná antibakteriální aktivita byla prokázána u extraktu a silice česnáčku lékařského proti mikroorganismům *B. cereus*

Je důležité poznamenat, že alkoholové extrakty vykazovaly výraznější inhibiční růst bakterií než éterický olej (asi 1,5krát).

To lze vysvětlit skutečností, že chemické složení éterického oleje a alkoholového extraktu je odlišné.

5.2 Antioxidační aktivita

Výsledky studie antioxidační aktivity jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 – Antioxidační aktivity extraktu *A. petiolata* a vitaminu C

	IC50 (µg/mL)	SE
Extract <i>A. petiolata</i>	89,69	37,16
Vitamin C	4,49	0,92

Na základě spektrofotometrické analýzy hydroalkoholických extraktů *A. petiolata*, kyseliny askorbové byl stanoven ukazatel: optická hustota (A) a poloviční koncentrace maximální inhibice (IC50) byla vypočtena pro extrakt a vitamin C spolu s jejich směrodatnou odchylkou (SE).

Ve srovnání s antioxidační aktivitou vitamínu C byla antioxidační aktivita extraktu asi 20krát slabší. V ekvivalentech antioxidační kapacity vitamínu C (VCEAC) se dá antioxidační aktivitu extraktu vyhodnotit jako 50,1 µg VCEAC/mL extraktu

5.3 Chemické složení silice *A. petiolata*

Studie složení éterického oleje *Alliaria petiolata* prokázaly přítomnost velkého počtu sloučenin patřících do různých tříd.

Tabulka 3 ukazuje nejdůležitější složky éterického oleje z česnáčku lékařského, které jsou zajímavé z hlediska jejich biologické aktivity.

Tabulka 3 – složení éterického oleje *Alliaria petiolata*

RI	Složka	%
1104	Nonanal	1,49
1401	Hexahydropseudoionone	1,23
1475	(E)-β-ionone	6,20
1840	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl	27,12
2106	Phytol	51,11
2300	Tricosane	2,46
2500	Pentacosane	3,75
	Celkem identifikováno	93,35

Pomocí GC-MS analýzy se v silici *A. petiolate* podařilo identifikovat celkem 7 složek, které tvoří 93,35 % obsahových silice

Mezi sloučeninami nalezenými ve zkoumané rostlině jsou hlavní phytol (51,11%), Hexahydrofarnesyl acetone (27,12%) a (E)-β-ionone (6,20%)

6 Diskuze

Pomocí plynové chromatografie s následnou hmotnostní spektrometrií bylo možné získat informace o složení éterického oleje *A. petiolata*. Výsledky naší studie chemického složení éterických olejů získaných ze suchých rostlinných materiálů se jenom částečně shodují s dříve publikovanými výsledky.

Blažević & Mastelić (2008) analyzovali složení esenciálního oleje *A. petiolata* získaného z čerstvého i suchého rostlinného materiálu. Výsledek ukázal přítomnost 44 složek, z nichž hlavní byly organické sloučeniny nitrilu a síry. Byly to allylisothiokyanát (40,3–47,2%), 3,4-epithiobutannitril (3,8–10,2%), allylnitril (0,6–7,6%), alylthiokyanát (1,2–2,1%), které jsou uvolňovány při degradaci sinigrin glukosinolátu. V olejích z autolyzovaného rostlinného materiálu byly diallyl disulfid (7,2%), diallylsulfid (0,7%), 3-vinyl-3,4-dihydro-1,2-dithiin (0,5%) a 2 vinyl-4H-1,3- dithiin (0,3%), který se uvolňuje degradací S-alke (en) ylcytein sulfoxidu. Oleje, kromě výše uvedených těkavých látek, obsahují sloučeniny bez dusíku a síry: fytol (4,0–26,3%), kyselina palmitová (0–14,7%), (Z) -hex-3-en-1-ol (0,4–6,2%), nonanal (0–3,0%), fenylacetaldehyd (0–2,8%), â-ionon (0,3–1,9%), 4-vinyl-2-methoxy-fenol (0,2–1,6%), benzaldehyd (0,2–1,0%).

Rozdíl ve získaných výsledcích lze vysvětlit různými faktory. Zaprvé, byl rostlinný materiál autorů sbírán v Chorvatsku, kde se klimatické a přírodní podmínky lišily od našich. Sběr byl proveden také během květu - na jaře, ale vyšší sluneční záření, vyšší teploty a úrodná půda mohou mít významný vliv na složení éterického oleje.

Za druhé, autoři (Blažević & Mastelić 2008) zkoumali složení suchého i čerstvého materiálu. Jejich výsledky ukazují, že rozdíl mezi čerstvým a suchým materiálem je výrazně odlišný: obsah β -iononu v suchém materiálu je tedy téměř čtyřikrát vyšší než v čerstvém. Na druhé straně je obsah allylisothiokyanátu vyšší v čerstvém materiálu než v suchém materiálu. Některé látky se nacházejí pouze v éterickém oleji získaném ze sušeného materiálu, zatímco jiné naopak pouze v éterickém oleji z čerstvého materiálu. Na základě toho lze tvrdit, že naše analýza éterického oleje získaného pouze ze suchých surovin nedává úplný obraz o kvalitativním a kvantitativním složení rostliny.

Z izolovaných látek si zvláštní pozornost zaslouží složky s antibakteriální, fungicidní a antivirovou aktivitou hexanal (Komai et al. 2014), benzaldehyd, a-terpineol (Carson et al. 1995), caurenol, eugenol (obsažený v hřebíčkovém oleji), phytol, limonene (Chang et al. 2011).

Výsledky studie Santos et al. (2013) ukázaly, že fytol má antinociceptivní účinek v několika modelech nocicepce a antioxidační vlastnosti proti volným radikálům generovaným *in vitro*.

Fytol, který se také nachází v našem éterickém oleji, patří k mononenasyceným diterpénům, je součástí chlorofylu, vitamín E. Studie prokázaly (Renan et al. 2013), že fytol má farmakologickou aktivitu: protizánětlivé a oxidační (ochranné).

Protože esenciální olej česnáčku lékařského sestává z téměř poloviny fytolu, můžeme předpokládat, že má podobné účinky.

Je známo, že fytol inhibuje růst of *Staphylococcus aureus* (Inoue et al. 2005). Vysoký obsah fytolu v *A. petiolata* však nezajišťoval antimikrobiální aktivitu proti tomuto bakteriálnímu kmeni.

Sekundární metabolity α -ionon a β -ionon jsou terpenové sloučeniny s fialkovou vůní. Alfa-ionon se v přírodě vyskytuje jen velmi zřídka ve specifických kvetoucích rostlinách, beta-ionon je rozšířený noterpenoid, který se nachází v květech *Boronia megastigma*

Článek Maćzka et al. (2016) popisuje protirakovinovou aktivitu beta-iononu, prokázanou proti široké škále nádorů, a je založen na mnoha experimentech *in vitro* a *in vivo*. Vysoká účinnost beta-iononu dává naději pro jeho širší uplatnění při prevenci a léčbě rakoviny

Na základě toho lze předpokládat, že éterický olej *A. petiolata* může mít teoreticky podobný účinek.

Výzkum (Faezizadeh et al. 2016) ukázal, že beta-ionon má antiproliferativní a apoptotické účinky na buňky K562 a v budoucnu může být použit při léčbě některých podtypů leukémie.

Esenciální olej obsahující manol, 6,10,14-trimethyl-2-pentadekan, eikosanol, má antibakteriální aktivitu (Radulovic et al. 2011)

Esenciální olej *A. petiolata* obsahuje významné množství této látky (27,12%), avšak výsledky antimikrobiální aktivity neprokázaly vysokou aktivitu proti většině kmenů což by mohlo být způsobeno tím, že byly použity pouze extrakty ze sušeného materiálu. Předpokládáme, že extrakty z čerstvého materiálu by byly vůči použitým mikroorganismům aktivnější.

Výsledky studia složení éterického oleje *A. petiolata* tedy ukázaly přítomnost velkého množství biologicky aktivních látek, které patří do různých skupin chemických sloučenin: uhlovodíky, alkoholy, aldehydy a další látky.

Antibakteriální ataktivita česnáčku byla studována pouze nepřímo. Burke & Chan (2010) potvrdili invazivní účinky *Alliaria petiolata* na bakteriální komunity v severní lesní půdě a Cipollini & Cipollini (2016) diskutují o tom, do jaké míry může alelopatie versus jiné mechanismy přispět k invazivnímu úspěchu této rostliny.

Přes své široké rozšíření a nenáročné podmínky růstu *A. petiolata* nepřitahovala pozornost vědců, a proto je její biologická aktivita v současné době málo studována. V tomto ohledu se nám zdá logické porovnat naše výsledky s výsledky studií rostlin téže čeledi *Brassicaceae*.

Například v práci Yetgin et al. (2018) byla prokázána antimikrobiální aktivita ethanolových extraktů česneku *Allium sativum* proti *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* P1, *Listeria innocua*, *K. pneumoniae*, několik kmenů enterokoků a salmonel i *C. albicans*. Předpokládáme, že nižší antimikrobiální aktivita česnáčku lékařského *Alliaria petiolata* v porovnání s česnekem je s největší pravděpodobností spojena s nižším obsahem látek obsahujících síru, zejména allicinem.

Motsei et al. (2003) použili ke studiu antimikrobiální aktivity sušený česnek, který byl resuspendován ve vodě a extrahován v sonické lázni. Pozitivní výsledky byly získány proti *C. albicans* pomocí bujonové diluční metody. V naší studii extrakt a éterický olej *A. petiolata* neinhibovaly růst *C. albicans*.

Výsledky výzkumu se navíc liší v závislosti na tom, zda byly pro antimikrobiální testy použity suché nebo čerstvé suroviny. Kromě toho se výsledky v závislosti na způsobu přípravy extraktu mohou také lišit. V práci Awanem et al. (2007) byl zkoumán vliv těchto faktorů. Byl použit suchý a čerstvý česnek a jako extrakční látka byla použita voda, ethanol, methanol,

diethylether a chloroform. Antimikrobiální aktivita byla testována pomocí diskové difuzní metody vůči 7 bakteriálním kmenům, mezi nimi *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae*. Všechny typy extraktů byly účinné proti všem kmenům mikroorganismů. Účinnost se lišila v závislosti na kmenu použité bakterie.

V naší práci éterický olej nevykazoval tak vysokou antimikrobiální aktivitu, což by mohlo být způsobeno kvalitou použitých surovin a rozdílem v rodu rostliny. Kromě toho, jak ukazují experimenty Jang et al. (2017), sušené extrakty vykazovaly menší antimikrobiální aktivitu nebo nevykazovaly žádnou, což je v souladu s našimi výsledky.

Extrakty ze sušeného česneku nevykazovaly významnou antimikrobiální aktivitu proti *S. aureus*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *B. cereus* nebo *L. monocytogens* (Jang et al. 2017). Podobné výsledky uvádí v práci Dziri et al. (2012). Výsledky ukazují, že antibakteriální aktivita růžového česneku (*Allium roseum* var. *Odoratissimum*) proti patogenním bakteriím nebyla většinou detekována.

Ve svých předchozích vědeckých studiích jsem zkoumal složení a antimikrobiální aktivitu *Brassica rapa* L. (Satornik et al 2016) která také patří do čeledi *Brassicaceae*. Výsledky studie mikrobiologické aktivity ukázaly, že esenciální olej inhibuje růst testovaných kmenů *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella pneumoniae*. Ve vztahu k kmenům *Acinetobacter baumannii* a *Staphylococcus aureus*, éterický olej *Brassica rapa* L. vykazuje nulový efekt. Bylo zjištěno, že éterický olej *Brassica rapa* stimuluje množení kmenů *Escherichia coli*.

V této práci taky byla potvrzena nulová aktivita esenciálního oleje *Alliaria petiolate* vůči *Staphylococcus aureus*. Nicméně ani silice ani ethanolový extrakt růst *Escherichia coli* nepodporovaly.

Výsledky Mahomoodally et al. (2018) při studiu rostlin téže čeledi ukázaly, že methanolvý extrakt *C. draba* vykazoval nejvyšší antioxidační aktivitu v testech CUPRAC, FRAP a fosfomolybden, zatímco vodný extrakt vykazoval nejsilnější vychytávání DPPH a ABTS a inhibici p-karotenu. Pokud jde o extrakty *D. sophia*, acetonový extrakt vykazoval nejvyšší aktivitu v testech CUPRAC a fosfomolybden; Methanolvý extrakt byl nejúčinnějším vychytávačem DPPH, zatímco vodný extrakt vykazoval nejvyšší vychytávání ABTS a železitou redukční sílu a inhibiční účinek p-karotenu.

Výsledky Fusari et al. (2020) ukázaly, že všechny hodnocené druhy *Brassicaceae* měly antioxidační vlastnosti, přičemž nejaktivnějším antioxidačním druhem byla řeřicha a zelená hořčice.

Extrakty *Alliaria petiolate* také vykazovaly antioxidační aktivitu, což je v souladu s výsledky studií rostlin téže čeledi.

7 Závěr

Vzrůstající poptávka po biologicky aktivních látkách ve farmaceutickém, potravinářském a krmivářském průmyslu vyžaduje věnovat pozornost novým netradičním zdrojům obnovitelných surovin. Z tohoto hlediska lze rostlinu *A. petiolata* považovat za slibný objekt, protože má vysoký obsah jedinečných látek různého spektra účinku.

Hypotéza práce byla potvrzena, podařilo se prokázat mírný antibakteriální účinek silice a lihového extraktu česnáčku lékařského *in-vitro* proti *B. cereus*. Byla potvrzena také antioxidační aktivita extraktu metodou DPPH.

Získané materiály tvoří základ pro pokračování studia biologické aktivity česnáčku lékařského a hlavních aktivních složek s natimikrobiálním a antioxidačním účinkem.

8 Literatura

- Adams RP. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th edition Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Ill, USA
- Anilakumar KR, Nagaraj NS, Santhanam K. 2001. Effect of coriander seeds on hexachlorocyclohexane induced lipid peroxidation in rat liver. *Nutrition Res.* **1**: 1455–1462.
- Andini S, Araya-Cloutier C, Sanders M, Vincken JP. 2020. Simultaneous Analysis of Glucosinolates and Isothiocyanates by RP-UHPLC-ESI-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 10.1021/acs.jafc.9b07920.
- Alekseev Y. 1971. Herbal plants of SSSR. Thought, Moscow
- Awan UA, Ali S, Shahnawaz AM, Shafique I, Zafar A, Khan MAR. 2017. Biological activities of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important bacterial pathogens, their phytochemical and FT-IR spectroscopic analysis. *Pak J Pharm Sci* <http://ezproxy.muni.cz/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,cookie,uid&db=mdc&AN=28653916&lang=cs&site=edslive&scope=site>
- Azwanida NN. 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal and Aromatic Plants* 4: 196
- Baser KHC. 2010. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. Taylor and Francis Group: London, UK
- Butnariu M, Sarac I. 2018. Essential Oils from Plants. *Journal of Biotechnology and Biomedical Science* **1(4)**:35-43.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **46(2)**: 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Boesl R, Saarinen H. 2016. Essential Oil Education for Health Care Providers. *Integrative medicine (Encinitas, Calif.)*, **15(6)**: 38–40.
- Babar A, Al-Wabel, Naser, Shams, Saiba, Ahmad, Aftab, Khan, Shah, Anwar, Firoz. 2015. Essential oils used in aromatherapy, A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **5**: 589-598.

- Banerjee S, Sharma R, Kale RK, Rao AR. 1994. Influence of certain essential oils on carcinogen-metabolizing enzymes and acidsoluble sulfhydryls in mouse liver. *Nutrition and Cancer* **3**: 263–269.
- Bhattacharjee S, Rana T, Sengupta A. 2007. Inhibition of lipid peroxidation and enhancement of GST activity by cardamom and cinnamon during chemically induced colon carcinogenesis in Swiss albino mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **4**: 578–582.
- Burlakova E, Molochkina E, Nikiforov G. 2008. Hybrid antioxidants. *Chemistry & chemical technology* **31**: 123-137
- Blažević I, Mastelić J. 2008. Free and Bound Volatiles of Garlic Mustard (*Alliaria petiolata*). *Croatia Chemica Acta* **81**: 607-613.
- Blažević I, Radonić A, Mastelić J, Marina Z. 2010. Glucosinolates, glycosidically bound volatiles and antimicrobial activity of *Aurinia sinuata* (*Brassicaceae*). *Food Chemistry* **121**: 1020-1028. 10.1016/j.foodchem.2010.01.041
- Blinova NP. 1988. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии: Учебное пособие. Медицина, Москва.
- Buffington R, Wilson MK. 1989. Detektoren für die Gaschromatographie (Detectors for Gas Chromatography), ewlett-Packard, Avondale, PA.
- Burke DJ, Chan CR. 2010. Effects of the invasive plant garlic mustard (*Alliaria petiolata*) on bacterial communities in a northern hardwood forest soil. *Canadian journal of microbiology*, **56**(1): 81–86. <https://doi.org/10.1139/w09-100>
- Brawn DV. 1993 Aromatherapy. Press Publish, NY
- Cecilia M.FusaridMónica A.NazarenobDaniela A.Locatelli 2020. Phytochemical profile and functionality of Brassicaceae species. *Food Bioscience* **3**: 12-15
- Carlsen MH, Halvorsen B, Holte K. 2010. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal* **1**: 1–11.
- Carson, C.F. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* / C.F. Carson, K.A. Hammer, T.V. Riley // *J Appl Bacteriol.* – 1995. – Vol. 78(3). – P. 264-269.
- CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and

Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012

Cipollini D, Cipollini K. 2016. A review of garlic mustard (*Alliaria petiolata*, *Brassicaceae*) as an allelopathic plant. *The Journal of the Torrey Botanical Society*. **143**: 339-348. 10.3159/TORREY-D-15-00059

Chebanash MV. 1973. Вопросы гигиены труда и возделывания мяты, лаванды, шалфея в Молдавии. Матер. конф. гигиенистов, организаторов здравоохранения, эпидемиологов и инфекционистов Молдавской ССР **2**: 37-38

Chistyakova AS, Brezhnev TA, Maltseva AA. 2012. Изучение антиоксидантной активности некоторых групп БАВ методом ТСХ. Сборник научных трудов Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции **67**: 289–290.

Craig WJ, Am J. 1999. Health-promoting properties of common herbs *Clinical Nutrition* **3**: 491–499.

Cuppett SL. 1998. Antioxidant activity of the labiatae. *Advanced Food Nutrition Resources* **42**: 245–271.

Daxenbichler ME, Spencer GF, Carlson DG, Rose GB, Brinker AM, Powell RG. 1991. Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. *Phytochemistry* **30**: 2623–2638.

Danh LT., Han LN., Triet NDA., Zhao J., Mammucari R., Foster N. 2013. Comparison of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of lavender (*Lavandula angustifolia* L.) Essential oils extracted by supercritical CO₂, hexane and hydrodistillation. *Food Bioprocess Technol.***6**:3481–3489.

Duschatzky CB, Possetto ML, Talarico LB, Garcia CC, Michis F, Almeida NV, de Lampasona MP, Schuff C, Damonte EB. 2005. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **16(4)**: 247-251

Duarte, MCT. Duarte, RMT. Rodrigues, RAF. Rodrigues, M.V.N. 2017. Essential Oils and Their Characteristics. *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications* **2**: 1-19

Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W. 2016. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 3(4), 25. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>

Dobrochaeva DN, Kotov MI. 1987. Определитель высших растений Украины. Наукова думка, Киев.

- Dziri S, Hassen I, Fatnassi S, Mrabet Y, Casabianca H, Hanchi B, Hosni K. Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*). *J Funct Foods*. **4(2)**:423–432 (2012)
- Erbaş S, Baydar H. 2016. Variation in Scent Compounds of Oil-Bearing Rose (*Rosa damascena* Mill .) produced by headspace solid phase microextraction, hydrodistillation and solvent extraction. *Records of Natural Products* **10(5)**:555-565
- Ermakov AI. 1972. Методы биохимического исследования растений. Колос, Ленинград.
- Eremeeva NB, Makarova NV, Platonov IA. 2016. Антиоксидантная активность экстрактов черноплодной рябины, полученных в надкритических условиях. *Техника и технология пищевых производств* **3**: 12–18.
- Efremov A.A., Zyкова ID. 2013. Компонентный состав эфирных масел хвойных растений Сибири. Сиб. федер. ун-т, Красноярск.
- Efremov AA. 2013. Метод исчерпывающей гидропародистилляции при получении эфирных масел дикорастущих растений. *Успехи современного естествознания* **7**: 88-94.
- Faezizadeh Z, Gharib A, Godarzee M. 2016. Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of Beta-Ionone in Human Leukemia Cell Line K562, *Zahedan J Res Med Sci*. **18(6)**:e7364. doi: 10.17795/zjrms-7364
- Fedoseeva AA, Lebedkova, Kanibolotskaya. 2008 Антиоксидантная активность настоев чая. *Химия растительного сырья* **3**: 123–12
- Fowke J.H., Chung F.L., Jin F., Qi D., Cai Q., Conaway C., et al. 2003. Urinary isothiocyanate levels, brassica, and human breast cancer. *Cancer Res* **63**:3980–6.
- Gordon M. 1996. Dietary antioxidants in disease prevention *Natural Product Reports* **4**: 265–273
- Günther E. 1948. *The essential oils: History and origin in plants production analysis*. Krieger Publishing, New York.
- Grinkevich NI, Safronich LN. 1983. *Химический анализ лекарственных растений*. Высшая школа, Москва.
- Handa SS, Khanuja S, Longo G, Rakesh DD. 2008. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. *International centre for science and high technology* 21-25.
- Hasanov VV, Ryzhova, Maltseva. 2004. Методы исследования антиоксидантов. *Химия растительного сырья* **3**: 63–75

- Hesham H, Rassem A, Abdurahman H. 2016. Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **10(16)**: 117-127
- Harold M. McNair James M. Miller Nicholas H. 2019. *Basic Gas Chromatography, Third Edition*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- Heber D. 2004. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. *Medicine* **2**: 145–149.
- Halliwell B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society transactions*, **35**:, 1147–1150. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* **86(6)**: 985-990
- Hood JR, Wilkinson JM, Cavanagh HMA. 2003. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *Journal of Essential Oil Research* **15(6)**: 428-433
- Hostettmann K. 2014. *Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods*. John Wiley and Sons
- Higdon, J. V., Delage, B., Williams, D. E., & Dashwood, R. H. (2007). Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological research*, **55(3)**, 224–236. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.009>
- Inoue Y, T. Hada, A. Shiraishi, K. Hirose, H. Hamashima, and S. Kobayashi, “Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 49, no. 5, pp. 1770–1774, 2005
- Janča J. 1994. *Herbář léčivých rostlin*. Eminent, Ostrava.
- Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Stoilova, I.; Stoyanova, A.; Krastanov, A.; Schmidt, E. 2006. Chemical Composition and Antioxidant properties of clove leaf essential oil. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 6303–6307
- Jorgensen HJ, Ferraro MJ. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices *Clin. Infect. Dis.*, **49**: 1749-1755
- Jang, H. J., Lee, H. J., Yoon, D. K., Ji, D. S., Kim, J. H., & Lee, C. H. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of fresh garlic and aged garlic by-products extracted with different solvents. *Food science and biotechnology*, 27(1), 219–225. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0246-4>

- Kang CG, Hah DS, Kim CH, Kim YH, Kim E, Kim JS. 2011. Evaluation of antimicrobial activity of the methanol extracts from 8 traditional medicinal plants. *Toxicol Res.* **27(1)**:31-36. doi:10.5487/TR.2011.27.1.031
- Kapoor IPS, Singh B, Singh G. 2010. Chemistry and antioxidant activity of essential oil and oleoresins of black caraway (*Carum bulbocastanum*) fruits: *Journal of the Science of Food and Agriculture* **3**: 385–390.
- Kayser O, Wim J. Quax. 2006. *Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kreger BE, Craven DE, McCabe WR. 1980. Gram-negative bacteremia. IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients *Am. J. Med.*, **68**: 344-355
- Komai I. Green leaf volatiles affect the resveratrol production stimulated by ultraviolet C irradiation in grape leaf discs / I. Komai, K. Boushita, S. Shiozaki // *Vitis*. – 2014. – Vol. 53 (3). – P. 133–137.
- Korovkina, N.V., Bogdanovich, N.I., & Kutakova, N.A.. (2007). Исследование состава бурых водорослей Белого моря с целью дальнейшей переработки. *Химия растительного сырья*, (1), 59-64.
- Kornievskiy YI, Kornievskaya VG, Fursa NS. 2004. Растительность плавневой части национального заповедника "Хортица". *Запорожский медицинский журнал* **2**: 83-91.
- Koukalová D, Kolář M, Vágnerová I, Hejnar P, Hamal P, Došlík V, et al. 2013. Určování citlivosti mikrobů na antibiotika. *Praktická cvičení z lékařské mikrobiologie I*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Korotkova EI, Avramchik, M.S. Yusubov et al. 2003. Opredelenie antioksidantnoi aktivnosti ekstraktov rastitel'nogo syr'ya metodom katodnoi vol'tamperometrii // *Khim.-farm. zhurn.* 9. 55-56.
- Kerr J. 2002. The use of essential oils in healing wounds. *International J. of Aromatherapy* **4**: 202-206
- Kustova SD. 1978. *Справочник по эфирным маслам*. Пищевая промышленность, Москва.
- Kondratenko EI, Velikorodov AV, Mohamad Ahmed El Sayed Awad. 2012. Химический состав и антиоксидантная активность экстрактов семян *Nelumbo nucifera*. *Химия растительного сырья* **3**: 115–120.
- Liu RH. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition* **12**: 3479–3485

- Lang, Q., & Wai, C. M. 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a practical review. *Talanta*, **53(4)**, 771–782. [https://doi.org/10.1016/s0039-9140\(00\)00557-9](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(00)00557-9)
- Ladas EJ, Jacobson JS, Kennedy DD, Teel K, Fleischauer A, Kelly KM. 2004. Antioxidants and cancer therapy: a systematic review. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **22(3)**: 517–528. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.03.086>
- Lapin AA, Borisenkov MF, Karmanov MV. 2007. Антиоксидантные свойства продуктов растительного происхождения. *Химия растительного сырья* **2**: 79–83
- Minina SA, Kaukhova IE. 2004. *Химия и технология фитопрепаратов*. Гэотар-мед, Москва.
- Misin MV, Sazhina NN, Korotkova EI. 2011. Измерение антиоксидантной активности экстрактов смесей чая электрохимическими методами. *Химия растительного сырья* **2**: 137–143
- Marsik FJ, Mister P. 2019. Antimicrobial Susceptibility Testing. *Textbook of diagnostic microbiology* **6**: 268–305
- Masada Y. 1976. *Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry*. United States.
- Motsei, M.L., Lindsey, K.L., Van Staden, J., Jäger, A.K., 2003. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology* **86**, 235–241.
- Mączka, Żołnierczyk W, Grabarczyk A, Wińska M. 2016. Beta-ionone as a potential anticancer drug. *Acta Scientiarum Polonorum. Biotechnology* **15**: 27-36.
- Milner JA, Nutr J. 2001. A historical perspective on garlic and cancer. *The Journal of Nutrition* **3**: 1027–1031.
- Modzelewska A, Sur S, Kumar KS., Khan SR. 2005. Sesquiterpenes: Natural products that decrease cancer growth. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **54**:477–499.
- Misharina TA, Fatkullina LD., Alinkina ES., Kozachenko AI., Nagler LG, Medvedeva IB, Goloshchapov AN, Burlakova EB. 2014. Effects of low doses of essential oil on the antioxidant state of the erythrocytes, liver, and the brains of mice. *Microbiology* **50(1)**: 101–107. <https://doi.org/10.7868/s0555109914010097>
- Misharina TA, Polshkov AN. 2005. Antioxidant Properties of Essential Oils: Autoxidation of Essential Oils from Laurel and Fennel and of Their Mixtures with Essential Oil from

- Coriander. *Appl Biochem Microbiol* **41**: 610–618. <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0111-8>
- Mostafa AA, Al-Askar A.A., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Sholkamy, EN, Bakri, MM. 2018. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi journal of biological sciences*, **25(2)**: 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.004>
- Matthäus B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, **50(12)**: 3444–3452. <https://doi.org/10.1021/jf011440s>
- Muraveva DA. 2002. Фармакогнозия. Медицина, Москва
- Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, De Feo V. 2017. Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals (Basel)* DOI: 10.3390/ph10040086
- Nakatani N. 2000. Phenolic antioxidants from herbs and spices. *BioFactors* **1**: 141–146.
- Nijs A, Cartuyvels R, Mewis A, et al. 2003. Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory *J. Clin. Microbiol.*, **4**: 3627-3630
- Nikitin VM. 1952. Химия терпенов и смоляных кислот. Гослесбумиздат, Москва.
- Nikoevsky VV. 2000. Ароматерапия (справочник). Медицина, Москва.
- Nuzzo V. 1999. Invasion Pattern of Herb Garlic Mustard (*Alliaria petiolata*) in High Quality Forests. *Biological Invasions* **1**: 169–179. <https://doi.org/10.1023/A:1010009514048>
- Oluyemisi EA, Olusegun JO, Bosede FO. 2016. Use of Essential Oils in Food Preservation. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* **4**: 71-84
- Olechnikov DN, Dudareva LV. 2011. Химический состав и антирадикальная активность эфирного масла российских образцов *Mentha piperita* L. *Химия растительного сырья* **4**: 109-114.
- Opende K. 2008. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints *Biopesticides International* **4**: 63-84
- Parry JW. 1953. The story of spices. Chemical Publishing Company, New York
- Pasdaran A, Sheikhi D. 2016. Volatile oils: Potential agents for the treatment of respiratory infections. *The Microbiology of Respiratory System Infections* **2**: 237–261. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804543-5.00016-6>

- Panfilov VA, S.T. Antipov, I. T. Kretov, A.N. Ostrikov. 2001. Машины и аппараты пищевых производств : в 2-х кн.: Учеб. для вузов. Высшая школа, Москва.
- Pranker RJ, Schulman SG. 1993. Analytical Methods in Biotechnology. *Biotechnology and Pharmacy* **2**: 71-96
- Pedersen-Bjergaard S, Gammelgaard B, Halvorsen T. 2019. Introduction to Pharmaceutical Analytical Chemistry, 2nd Edition. Wiley, New Jersey.
- Pisoschi, Aurelia & Negulescu, Gheorghe. 2012. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. 01. 10.4172/2161-1009.1000106.
- Polyakova AA. 1983. Молекулярный масс-спектральный анализ органических соединений. Химия, Москва.
- Племекон ВВ. 2006. Химия изопреноидов. Глава 5. Монотерпены. Химия растительного сырья **2**: 63-87.
- Prasad MP. 2014. Antimicrobial potential of Brassicaceae family against clinical isolates. *International journal of pure & applied bioscience* **2 (2)**: 158-162
- Renan, O. S. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress / Renan O. Silva, Francisca Beatriz M. Sousa, Samara R.B. Damasceno, Nathalia S. Carvalho, Valdelânia G. Silva, Francisco Rodrigo M.A. Oliveira, Damiao P. Sousa, Karoline S. Aragão, Andre L.R. Barbosa, Rivelilson M. Freitas, Jand Venes R. Medeiros // *Fundamental & Clinical Pharmacology*. – 2013. – P. 1-10.
- Radulovic, N. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Geranium columbinum* L. and *G. lucidum* L. (Geraniaceae) / Niko Radulovic, Milan Dekic, Zorica Stojanovic Radi, Radosav Palic // *Turk J Chem*. – 2011.– Vol. 35. – P. 499-512
- Regnault-Roger C. 1997. The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews* **2**: 25–34
- Reyes JF, Franco A, Ramírez-Corona N, Palou E, López-Malo A. 2014. Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Engineering Reviews*. 7. 10.1007/s12393-014-9099-2.
- Ryabinina EI, Zotova EE, Vetrova EN. 2012. Сравнение химико-аналитических методов определения танидов и антиоксидантной активности растительного сырья. *Аналитика и контроль* **2**: 202–208.

- Ryabinina EI, Zotova EE, Vetrova EN. 2011. Новый подход в оценке антиоксидантной активности растительного сырья при исследовании процесса аутоокисления адреналина. *Химия растительного сырья* 3: 117–12
- Sadgrove N, Jones G. 2015. A Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. *Agriculture* 5(1):48-102.
- Satornik AD, Zyкова ID., Tyrranen LS., Naymushina LV. 2016. Исследование компонентного состава и антимикробной активности эфирного масла *Brassica rapa L.* Вестник Красноярского государственного аграрного университета 5: 130-136.
- Satornik A, Zyкова ID, Naymushina LV. 2016. Перспективность репы (*Brassica rapa L.*) в качестве источника ценных биологически активных веществ. Вестник Красноярского государственного аграрного университета 4: 120-125.
- Satornik A, Zyкова ID, Naymushina LV. 2015. Ингибирование реакции аутоокисления адреналина биологически активными веществами помело (*Citrus maxima*). Вестник Красноярского государственного аграрного университета 7: 115-119.
- Saeb K, Gholamrezaee S. 2012. Variation of essential oil composition of *Melissa officinalis L.* leaves during different stages of plant growth. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(2):547–S549
- Safin RR, Voronin AE, Nazipova FV, Akhunova L.V. 2015. Повышение эффективности экстракции эфирных масел водяным паром. Вестник Казанского технологического университета 18 (8): 151-154.
- Stroganov AO, Leontyeva EA. 2015. Анализ места России на мировом рынке пищевых добавок. Территория новых возможностей. Вестник Владивостокского государственного университета экономики и сервиса, 4 (31): 155-164.
- Santos, C. C., Salvadori, M. S., Mota, V. G., Costa, L. M., de Almeida, A. A., de Oliveira, G. A., Costa, J. P., de Sousa, D. P., de Freitas, R. M., & de Almeida, R. N. (2013). Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol In Vivo and In Vitro Models. *Neuroscience journal*, 2013, 949452. <https://doi.org/10.1155/2013/949452>
- Scott RPW. 2005. Essential oils. *Encyclopedia of analytical science*. 2: 554–611
- Sell CS. 2006. *The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer*. 2nd ed. The Royal Society of Chemistry; Cambridge
- Shaderkina VA., Shaderkin IA. 2019. Terpenes and their application in clinical practice. *Experimental and clinical urology* 1: 77-81

- Sharafutdinova EN, Ivanova AV, Matern AI, Brainina HZ. 2011. Качество пищевых продуктов и антиоксидантная активность. Аналитика и контроль **3**: 281–286.
- Shilova IV, Krasnov EA, Avdeeva EY. 2006. Химический состав и антиоксидантные свойства растений рода лабазник и альфредия. Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». **6**: 217
- Shpichka AI, Semenova EF. 2016. Маркетинговый анализ разработки биотехнологии эромотецевого масла как инновационной технологии современного эфирномасличного производства. Научное обозрение. Биологические науки **5**: 28-49
- Silverstein R, Bassler H, Morrill T. 1974. Spectrometric Identification of Organic Compounds, Wiley
- Sweet, Earle C. 2003. Method for making herbal extracts using percolation. United States Patent Appl. Publ. within the TVPP US20030355034.
- Takoi K, Itoga Y, Takayanagi J, Kosugi T, Shioi T, Nakamura T, Watari J. 2014. Screening of Geraniol-Rich Flavor Hop and Interesting Behavior of β -Citronellol during Fermentation under Various Hop-Addition Timings. Journal of the American Society of Brewing Chemists **72**: 22-29
- Talati A. 2017. Extraction methods of natural essential oils. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.18744.34564>
- Tuley DS. 2006. A manual on the essential oil industry. United Nations Industrial Development Organization, Vienna.
- Tikhomirov A.A., Yarosh A.M.. 2007. Использование эфирных масел для профилактики инфекционных заболеваний в промышленном птицеводстве. Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада, **94**: 71-73.
- Tsarev NI, Tsarev VI, Katrakov IB. 2000. Практическая газовая хроматография: Учебно-методическое пособие для студентов химического факультета по спецкурсу «Газохроматографические методы анализа». Алт. ун-та, Барнаул.
- Tsyurko TG, Petrakova IS, Brilenok NS. 2011. Определение суммарного содержания антиоксидантов методом FRAP. Аналитика и контроль **3**: 287–298.
- Турков АГ. 2012. Антимикробная активность эфирных масел, выделенных из растений Астраханского региона. Вестник Алтайского государственного университета **2**: 57-59.
- Urbášková P. 1985. Vyšetření pro antimikrobiální terapii. Avicenum, Praha.

- Vaara M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological reviews*, **56(3)**: 395–411.
- Vallance C. 2017. *An Introduction to Chemical Kinetics*. Morgan & Claypool Publishers, San Rafael, California.
- Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current pharmaceutical design*, **10(14)**: 1677–1694. <https://doi.org/10.2174/1381612043384655>
- Vinatoru, Mircea & Paniwnyk, L & Mason, Timothy. 2001. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics sonochemistry*. **8**. 137-42. 10.1016/S1350-4177(00)00033-X.
- Wang L, Boh T. 2012. Health-promoting food ingredients and functional food processing. *Nutrition, Well-Being and Health from:* <http://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/health-promoting-foodingredientsdevelopment-and-processing>.
- Wei A, Shibamoto A. 2007. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **5**: 1737–1742.
- Yarskaya EV 2011. Получение эфирного масла и спиртовых экстрактов зопника клубненосного. Молодёжь и наука: Сборник материалов VII Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных, посвященной 50-летию первого полета человека в космос. <http://conf.sfu-kras.ru/sites/mn2011/section14.html>
- Yetgin, A., Canlı, K., & Altuner, E. M. (2018). Comparison of Antimicrobial Activity of *Allium sativum* Cloves from China and Taşköprü, Turkey. *Advances in pharmacological sciences*, 2018, 9302840. <https://doi.org/10.1155/2018/9302840>
- Zwenger S & Chhandak B. 200). Plant terpenoids: Applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* **3**. 1-7.
- Zaslavskaya AA, Dmitruk VI, Zlobinets AS. 2017. Использование ароматерапии для лечения и профилактики острых респираторных заболеваний у детей. *Актуальная инфектология*, **5 (2)**: 101-111.
- Zenkevich IG. 1996. Аналитические параметры компонентов эфирных масел для хроматографической и хромато-масс-спектрометрической идентификации. Моно- и сесквитерпеновые углеводороды. *Растит. ресурсы* **2**: 48 – 58