

**Mendelova univerzita v Brně**

**Agronomická fakulta**

**Ústav chemie a biochemie**

---



**Agronomická  
fakulta**

**Mendelova  
univerzita  
v Brně**



## **Antioxidanty v bylinných čajích**

Diplomová práce

*Vedoucí práce*

prof. RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D

*Vypracovala:*

Bc. Pavla Fadrhoncevá

---

Brno 2015

## **PROHLÁŠENÍ:**

Prohlašuji, že jsem práci na téma Antioxidanty v bylinných čajích vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu § 47b zákona č. 111/1998 SB., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského práva.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy university, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně:

Podpis:

## PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu práce panu prof. RNDr. Bořivoji Klejdusovi, Ph.D. za pomoc, během zpracovávání této diplomové práce.

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce na téma antioxidanty v bylinných čajích je rozdělena do dvou částí. První teoretická část se zabývá popisem a rozdělením antioxidantů. Jsou zde zaznamenané některé syntetické antioxidanty, některé významné intracelulární antioxidanty a přírodní antioxidanty, které jsou zastoupeny polyfenolickými sloučeninami jakožto hlavních složek bylinných čajů. Dále je zde popsáno stanovení biologicky aktivních látek od extrakčních technik až po chromatografické metody. V teoretické části jsou popsány i jednotlivé vzorky bylin použitých pro analýzu. Druhá část praktická se zabývá stanovením polyfenolických kyselin ve vybraných vzorcích bylinných čajů. Pro extrakci byla zvolena Soxhletova urychlená extrakce a extrakce na třepačce. Pro detekci polyfenolických kyselin byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) propojena s detektorem diodového pole (DAD) a hmotnostním detektorem typu trojitý kvadrupól. Z naměřených výsledků vyplývá, že u většiny vzorků bylin byla nejvíce zastoupena kyselina chlorogenová a kyselina kávová.

**Klíčová slova:** Antioxidanty, polyfenolické látky, extrakce, kapalinová chromatografie

## **ABSTRACT**

Thesis on the topic Antioxidant in herbal teas is divided into two parts. The first part theoretical is concerned with the description and division of antioxidants. There are mentioned some synthetic antioxidants, some major intracellular antioxidant and natural antioxidant, which are represented by polyphenolic compounds as the main components of herbal teas. Furthermore, there is described the determination of biologically active compounds by extraction techniques to chromatographic methods. In the theoretical part are also described individual samples of herbs used for analysis. The second part is concerned with the practical determination of polyphenolic acids in selected samples of herbal teas. Two extraction techniques were chosen for separation of polyphenolics acids. The first was Soxhlet extraction accelerated and the second was extraction shaker. For the determination of polyphenolic acids was used high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with a diode array detector (DAD) and with mass detector type triple quadrupole. The measured results show that in most samples of herbs were the most represented chlorogenic acid and caffeic acid.

**Keywords:** Antioxidants, polyphenolic compounds, extraction, liquid chromatography

## OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	CÍL .....	9
3	ANTIOXIDANTY .....	10
3.1	Rozdělení antioxidantů.....	11
4	VÝZNAMNÉ INTRACELULÁRNÍ ANTIOXIDANTY .....	13
4.1	Melatonin .....	13
4.2	Glutathion.....	14
5	SYNTETICKÉ ANTIOXIDANTY .....	15
5.1	BHA (butylhydroxyanisol).....	15
5.2	BHT (butylhydroxytoluen).....	16
5.3	TBQH (terciální butylhydrochinon).....	16
6	POLYFENOLICKÉ LÁTKY .....	17
6.1	Flavonoidy.....	19
6.1.1	Flavonoly .....	20
6.1.1.1	Kvercetin .....	20
6.1.1.2	Kempferol.....	20
6.1.1.3	Myricetin .....	21
6.1.2	Flavanoly .....	21
6.1.2.1	Katechniny.....	22
6.1.3	Fenolové antioxidanty.....	22
6.1.3.1	Fenolové kyseliny a jejich deriváty.....	23
6.1.3.1.1	Kyselina gallová .....	23
6.1.3.1.2	Kyselina chlorogenová .....	24
6.1.3.1.3	Kyselina kávová .....	24
6.1.3.1.4	Kyselina ferulová.....	25
6.1.3.1.5	Kyselina sinapová.....	25
6.1.3.1.6	Kyselina vanilová .....	26
6.1.3.1.7	Kyselina syringová .....	26
6.1.3.1.8	Kyselina <i>p</i> -kumarová.....	26
6.1.3.1.9	Vanilin .....	27

6.1.3.1.10	Kyselina protokatechová .....	27
6.1.3.1.11	3,4- dihydroxybenzaldehyd .....	28
6.1.3.1.12	Kyselina salicylová.....	28
<b>7</b>	<b>STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK .....</b>	<b>29</b>
7.1	Extrakce.....	29
7.1.1	Konvenční extrakční techniky .....	30
7.1.1.1	Soxhletova metoda .....	30
7.1.2	Moderní extrakční techniky .....	31
7.1.2.1	Extrakce urychleným tokem rozpouštědla .....	31
7.1.2.2	Mikrovlnná extrakce.....	31
7.1.2.3	Modifikovaná Soxhletova reakce .....	32
7.2	CHROMATOGRAFICKÉ METODY.....	32
7.2.1	Kapalinová Chromatografie.....	33
7.2.2	Plynová chromatografie .....	33
<b>8</b>	<b>LÉČIVÉ BYLINY .....</b>	<b>34</b>
8.1	Přehled bylin .....	34
8.1.1	Stevie ( <i>Stevia rebaudiana</i> ).....	34
8.1.2	Kopřiva dvoudomá ( <i>Urtica dioica</i> ) .....	35
8.1.3	Šalvěj lékařská ( <i>Salvia officinalis</i> ) .....	36
8.1.4	Smetánka lékařská ( <i>Taraxacum officinale</i> ) .....	37
8.1.5	Dobromysl ( <i>Origanum vulgare</i> ).....	37
8.1.6	Mateřídouška obecná ( <i>Thymus serpyllum</i> ) .....	38
8.1.7	Čekanka obecná ( <i>Cichorium intybus</i> ).....	39
8.1.8	Jitrocel kopinatý ( <i>Plantago lanceolata</i> ) .....	40
<b>9</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>41</b>
9.1	Chemikálie .....	43
9.2	Přístrojové vybavení.....	43
9.3	Extrakce fenolových kyselin .....	43
9.4	Stanovení obsahu polyfenolických sloučenin .....	44
<b>10</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>45</b>
10.1	KALIBRACE.....	46

11	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ .....	47
12	DISKUZE .....	63
13	ZÁVĚR .....	67
14	SEZNAM LITERATURY .....	69
15	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	77
16	SEZNAM TABULEK .....	78
17	SEZNAM ZKRATEK .....	79

## 1 ÚVOD

Bylinné čaje patří mezi nejkonzumovanější nápoje rozšířené po celém světě. Oblibu si získaly hlavně díky svému obsahu účinných fytochemikálií s biologickými účinky, které blahodárně působí na lidský organismus. Bylinné čaje napomáhají snižovat riziko chronických onemocnění, jako jsou alergie, nespavost, bolesti hlavy, úzkost, střevní poruchy, deprese a vysoký krevní tlak. Dále mají protirakovinné, antioxidační a antimikrobiální vlastnosti. Bylinné čaje jsou bohatým zdrojem polyfenolických sloučenin. Nejvíce se v bylinných čajích vyskytují látky ze skupiny flavonoidů jako je např. kvercetin, myricetin, kempferol a polyfenolické kyseliny, ke kterým se řadí např. kyselina chlorogenová, kávová, vanilová, ferulová, sinapová a další. Tato práce se zaměří právě na stanovení obsahu polyfenolických kyselin u vybraných vzorků bylin. Polyfenolické kyseliny působí jako antioxidanty a vykazují protinádorové a protizánětlivé účinky. Z hlediska kladných účinků na lidský organismus je jejich nejvýznamnější vlastností právě antioxidační účinek. Tím totiž napomáhají organismu regulovat množství volných radikálů. Volné radikály jsou běžnou součástí metabolických pochodů v těle. Podílí se např. na polymeraci aminokyselinových řetězců, která vede k tvorbě bílkovin. Obdobnou funkci zastávají při tvorbě glykogenu. Jsou součástí imunitního systému a podílí se tedy na likvidaci škodlivých bakterií. Ve zdravém organismu jsou tyto procesy regulovány a lokalizovány pomocí enzymových antioxidantů. Tyto enzymy jsou součástí přirozeného mechanismu v těle při zneškodňování volných radikálů v organismu. Mezi tyto enzymy patří enzym superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza a kataláza. Pokud ovšem vznikne nadbytečné množství těchto volných radikálů, tak dochází k negativním účinkům na naše zdraví. Dochází tak k poškození a mutacím DNA, k poškození plazmatických membrán a bílkovinných struktur a vznikají tak choroby jako demence, šedý oční zákal, diabetes, kardiovaskulární onemocnění apod.

Právě proto je nutné přijímat dostatečné množství antioxidantů. Tyto látky eliminují nadměrné množství volných radikálů a udržují je tak v rovnováze. Některé antioxidanty jako je např. glutathion, melatonin či koenzym Q je organismus schopen vytvářet sám. Většinu je však nutno dodávat potravou. Bylinné čaje jsou právě díky obsahu polyfenolických kyselin a flavonoidů jedním z účinných zdrojů příjmu antioxidantů.



## **2 CÍL**

Cílem této práce bylo vypracovat literární rešerši na téma Antioxidanty v bylinných čajích. Práce je rozdělena do dvou částí. První teoretická část podává přehled o antioxidantech a o metodách stanovení biologicky aktivních látek. Dále jsou zde charakterizovány vybrané vzorky bylin. Druhá praktická část byla zaměřena na kvantitativní stanovení polyfenolických kyselin ve vybraných vzorcích bylinných čajů za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) propojené s detektorem diodového pole (DAD) a hmotnostním detektorem typu trojitý kvadrupól.

### 3 ANTIOXIDANTY

Antioxidanty se řadí mezi látky, které chrání potraviny před jejich znehodnocením způsobeným oxidací. Oxidace se projevuje žluknutím přítomných tuků a dalších snadno se oxidujících složek obsažených v potravinách. Antioxidanty tedy prodlužují údržnost potravin. Při oxidaci lipidů dochází k dalším chemickým změnám, které negativně ovlivňují výživovou, hygienicko-toxikologickou a senzorickou hodnotu (vůni, chuť, barvu). Oxidační proces nemusí být jen nežádoucí. Například oxidací esenciálních mastných kyselin dochází ke vzniku příznivého aroma v některých potravinách, jako jsou ovoce, zelenina a houby. (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Dále se antioxidanty podílí na regulaci oxidačních pochodů v živých buňkách. Kyslík je jedním z nejdůležitějších prvků nezbytných pro život. Může mít ovšem i negativní účinky a to v případě když jeho množství reaktivních sloučenin v podobě volných radikálů přesáhne potřebu buněk a není zablokováno. Při výrazné nadprodukcii reaktivních sloučenin kyslíku, je organismus vystaven tzv. oxidačnímu stresu. Na vzniku volných radikálů se podílí i vnější prostředí. Jako např. ultrafialové záření, jehož intenzita se zvyšuje vlivem narušování ochranného štítu ozonoféry, kouř z cigaret, znečištěné životní prostředí, nadměrná tělesná námaha, napadání mikroorganismy (Kalač, 2003). Tímto dochází v organismu k agresivním oxidačním pochodům, kterými je zasažena celá řada klíčových složek buněk. Radikály interferují s DNA, s nenasycenými mastnými kyselinami v buněčných membránách, s bílkovinami. Oxidace DNA způsobuje mutace, které zvyšují riziko vzniku nádorů. Oxidací bílkovin dochází k urychlování stárnutí a spolu s oxidací mastných kyselin se zvyšuje rozsah aterosklerózy (Kalač, 2003). Antioxidanty jsou tedy látky, které jsou schopné převést volné radikály na nereaktivní nebo aspoň méně reaktivní formy. Tímto zvyšují obranyschopnost organismu vůči nadměrnému výskytu těchto reaktivních forem radikálů (Kalač, 2003). Potravinářské podniky používají antioxidanty pro prevenci před zhoršením kvality produktů a pro zachování jejich nutriční hodnoty. Pro zabránění procesu autooxidace u potravin se využívá vakuové balení, chlazení či mražení. Z ekonomického a praktického hlediska se tyto metody právě kombinují s antioxidanty, které prodlužují trvanlivost výrobků a udržují jejich nutriční hodnotu tím, že zabraňují procesu oxidace (Shahidi a Naczka, 2004).

### 3.1 Rozdělení antioxidantů

Antioxidanty, které interferují s procesem oxidace lipidů a jiných oxylabilních sloučenin:

- Antioxidanty reagující s volnými radikály
- Antioxidanty vážící do komplexu katalyticky působící kovy
- Antioxidanty eliminující přítomný kyslík

Podle struktury:

- Fenolové- náleží k nim tokoferoly, fenolové antioxidanty, galláty a také celá řada jiných sloučenin obsažených v potravinách, koření nebo jiných přírodních materiálech.
- Endioly- z povolených přírodních látek k nim náleží askorbová kyselina a erythorbová kyselina, dále jejich soli aj. deriváty

Podle původu:

- Přírodní- Mezi povolené přírodní antioxidanty patří pouze tokoferoly
- Syntetické (Velíšek, 1999)

Podle funkce:

- Primární antioxidanty: Reagují s lipidovými radikály a převádí je na stabilnější produkty
- Sekundární: Jsou známé jako preventivní antioxidanty. Zpomalují rychlost iniciace řetězové reakce a to tím, že poškozují hydroperoxy (Shahidi a Naczka, 2004)

Podle způsobu vstupu do organismu:

- Endogenní– tvorba samotným organismem
- Exogenní – přijímané potravou

Podle rozpustnosti:

- Hydrofilní–rozpustné ve vodě
- Lipofilní–rozpustné v tucích
- Amfofilní– mají vlastnosti obou skupin

Podle lokalizace:

- Extracelulární–mimo buňku
- Intracelulární– hrají nejdůležitější roli v ochraně před volnými radikály (Racek, 2003)

## 4 VÝZNAMNÉ INTRACELULÁRNÍ ANTIOXIDANTY

### 4.1 Melatonin

Melatonin je endogenně produkován indolamin vylučovaný epifýzou. Melatonin je obvykle vylučován v noci a ve dne je jeho sekrece potlačena. Toto hraje klíčovou roli při regulaci cirkadiánního rytmu (biologického rytmu) (Bruni *et al.*, 2015).

Melatonin se tvoří z tryptofanu. Nejdříve z tryptofanu vzniká hydroxylací a následnou dekarboxylací serotonin. Ten následně podléhá působení enzymů serotonin-N-acetyltransferázy (limitující enzym syntézy melatoninu) a posléze hydroxiindol-O methyl transferázy (Šonka, 2008).

Kromě toho že melatonin působí jako chronobiotikum, tedy jako látka, která může ovlivňovat cirkadiánní systém, tak má také silné antioxidační účinky (Bruni *et al.*, 2015). Poskytuje ochranu buňkám před působením volných radikálů. Dokonce má mnohem silnější účinky než vitamin E. Melatonin také zvyšuje antioxidační aktivitu některých enzymů včetně superoxid dismutázy, glutathion reductázy a současně také inhibuje prooxidační enzym syntetázu oxidu dusnatého (Šonka, 2008).

U pacientů s onemocněním diabetes bylo zjištěno zvýšené množství melatoninu v plazmě a ve slinách. Spekulovalo se, že toto zvýšení je spojené s jeho schopností pohlcovat volné radikály. Později bylo předpokládáno, že melatonin ve slinách může mít ochranný účinek proti paradontóze. Díky jeho silným antioxidačním, imunomodulačním a protinádorovým vlastnostem, byl melatonin navržen pro léčbu mechanického poškození a pro léčbu bakteriální, plísňové a virové infekce sliznice dutiny ústní. Dále byl navržen pro léčbu rakoviny úst a při paradontóze (Watson, 2012).

Z přírodních zdrojů se melatonin nachází v rýži a obilovinách jako jsou ječmen, ovesné vločky nebo obilné klíčky. Dále jsou to potraviny, které mají vysoký obsah aminokyseliny tryptofanu jako dýňová semínka, mandle, sojový sýr, sýr Cottage. Z bylin jsou to třezalka, kopretina, řimbaba a šalvěj lékařská (Wildová, 2011).

## 4.2 Glutathion

Glutathion je významnou biomolekulou. Patří mezi nejdůležitější vnitrobuňčný antioxidant. Působí v řadě biologických procesů. Glutathion je rozhodujícím členem fyziologické obrany organismu proti oxidačnímu stresu a toxickým látkám. Jeho intracelulární přítomnost je velmi důležitým faktorem životaschopnosti buněk (Nýdlová *et al.*, 2014). Vyskytuje se přímo v živočišných buňkách, takže ho není nutné přijímat ve stravě (Mindell a Mundis, 2006).

Glutathion vzniká v játrech z 3 aminokyselin a to cysteinu, kyseliny glutamové a glycinu (Mindell a Mundis, 2006). Glutathion se nachází ve dvou formách a to v redukované jako thiol (GSH) a oxidované jako disulfid (GSSH) (Racek, 2003). Poměr těchto forem charakterizuje oxidační stav v buňce (Nýdlová *et al.*, 2014).

Glutathion patří mezi nejdůležitější buněčné antioxidanty. Antioxidační účinek glutathionu je založen na faktu, že jeho redukovaná forma (GSH) je slabé redukční činidlo vzhledem k obsahu sulfhydrylové skupiny v přítomném cysteinu. Při působení volných radikálů dochází k oxidaci sulfhydrylové skupiny na disulfidickou skupinu a z glutathionu vzniká dimer glutathion disulfid (GSSG). Oxidovaná forma glutathionu je přeměněna zpět na redukovanou formu (GSH) enzymem glutathion reduktázou (Kopřiva, 2010). Nejdůležitější enzymy podílející se na funkci glutathionu jsou glutathion-S-transferázy, glutathion peroxidázy a glutathion reduktázy (Nýdlová *et al.*, 2014).

Z tohoto děje vyplývá, že glutathion se dá použít jako marker oxidačního stresu. Za fyziologického stavu se více než 99 % glutathionu nachází v redukované formě. Pokud dojde ke zvýšené tvorbě kyslíkových radikálů nebo zátěži organismu toxickými látkami, tak se množství redukovaného glutathionu v buňkách a následně tkáních snižuje (Kopřiva, 2010).

Glutathion se nachází v ovoci a zelenině. Vařením se jeho účinnost nesnižuje. Proti jeho vyčerpání působí aminokyselina methionin, jejímž zdrojem je čočka, fazole, vejce, česnek, ryby a jogurt (Mindell a Mundis, 2006).

## 5 SYNTETICKÉ ANTIOXIDANTY

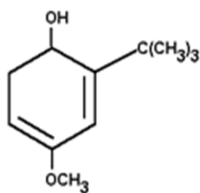
Antioxidanty hrají významnou roli při zpomalení reakce oxidace lipidů v potravinářských výrobcích, jako jsou oleje a tuky. Právě tyto složky jsou nedílnou součástí lidské stravy a jsou velmi náchylné k procesu oxidace a žluknutí. Tyto procesy mají vliv na kvalitu potravin a mohou poškodit lidské zdraví. Pro zabránění vzniku těchto nežádoucích procesů, výrobci používají syntetické fenolové antioxidanty, jako je butylhydroxytoluen (BHT), butylhydroxianisol (BHA) a butylhydrochinon (TBQH). Tyto syntetické antioxidanty jsou hojně využívány díky snadné dostupnosti, nízké ceně a chemické stabilitě (Ding a Zou, 2012).

Nicméně, bezpečnost těchto syntetických antioxidantů byla vzhledem k jejich možnému karcinogennímu účinku zpochybňována. Proto je použití těchto antioxidantů přísně regulováno vládami a příslušnými předpisy, které udávají nejvyšší povolené množství těchto látek. V každé zemi se většinou hodnota nejvyššího povoleného množství liší (Ding a Zou, 2012).

### 5.1 BHA (butylhydroxyanisol)

Butylhydroxyanisol (BHA) je směsí dvou izomerů. 90 % představuje 3-terc-butyl-4-hydroxyanisol (3-BHA) a 10 % jeho isomer 2-terc-butyl-4-hydroxyanisol (2-BHA). BHA je účinný zejména pro ochranu tuků, které obsahují mastné kyseliny s kratším řetězcem (kokosový, palmojadrový olej), aróma a barvy silic. Používá se i v obalových materiálech odkud se může dostat do potravin. Sloučenina se však může (na rozdíl od málo těkavých gallátů) projevovat pachem připomínajícím fenoly. BHA je také účinným antioxidantem v produktech po konečném tepelném zpracování. Během oxidace lipidů dochází k degradaci BHA. Nejběžnějšími produkty jsou dimery, bifenyly a jejich ethery. Většina primárních oxidačních produktů si zachovává antioxidační aktivitu (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Nicméně po provedení výzkumu bylo zjištěno, že 3-terc-butyl-4-hydroxyanisol může narušit endokrinní systém a také by mohl být karcinogenní (Runzeng *et al.*, 2014).



**Obrázek 1** 2-*tert.*butyl-4-hydroxyanisol (Velíšek a Hajšlová, 2009)

## 5.2 BHT (butylhydroxytoluen)

Butylhydroxytoluen je 3,5-di-*tert.*-butyl-4-hydroxytoluen. Ve srovnání s BHA je mnohem účinnější jako antioxidant živočišných tuků. Mezi významné produkty degradace BHT patří 3,5-di-*tert.*butyl-4-hydroxybenzaldehyd a 3,5,3',5'-*tert.*-butyl-4,4'-dihydroxy-1,2-difenylethan. Kromě nich vznikají také fenoly, chinony a stilbeny (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Studie toxicity prováděné na myších a potkanech ukázaly, že některé metabolity BHT jako je např. 3,5-di-*tert.*-butyl-4-hydroxybenzaldehyd (BHT-CHO), 2,6-di-*tert.*-butyl-1,4-benzochinon (BHT-Q) a 2,6-di-*tert.*-butyl-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyklohexadienon (BHT-chinolin), by mohly vytvářet peroxidy a vyvolat tak poškození buněčné DNA (Runzeng *et al.*, 2014).

## 5.3 TBQH (terciální butylhydrochinon)

Tato látka je velmi dobrým antioxidantem. Obsahuje ropné deriváty butanu. Může se používat buď samostatně, nebo se kombinuje s antioxidanty BHA a BHT. Zabraňuje žluknutí tuků a je konzervantem proti některým plísním a bakteriím. Tato látka se používá při výrobě tuků, margarínů, klobás, rostlinných olejů, hamburgerů, cereálních výrobků (Vrbová, 2001).

Nicméně tato látka může vyvolat i negativní účinky. Při konzumaci již 1 gramu této látky se mohou dostavit nevolnosti, zvracení, dušení. Při styku s pokožkou může dojít k alergické reakci. Může také dojít ke zvýšení účinnosti karcinogenů, které jsou spojené především s rakovinou močového měchýře (Vrbová, 2001).



## 6 POLYFENOLICKÉ LÁTKY

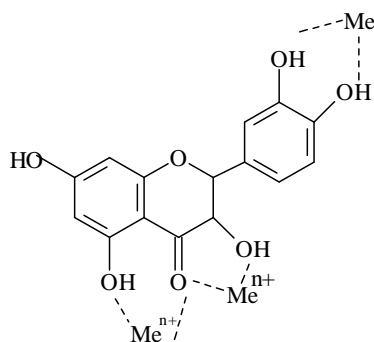
V rostlinné a živočišné říši bylo identifikováno více jak 8000 polyfenolických látek (Klejdus, 2004). Fenolické látky mají ve své struktuře jeden nebo více aromatických kruhů, na kterém je navázána jedna nebo více hydroxylových skupin. Některé hydroxylové skupiny mohou být oxidovány, methylovány nebo konjugovány na cukry, karboxylové skupiny a jiné fenoly (Velíšek a Cejpek, 2008).

Mnohé z nich jsou meziproductem při biosyntéze živočišného pigmentu (např. melaninu), strukturální složky rostlinných buněk (např. lignin, suberin), zatímco jiné zahrnují široké spektrum rostlinných pigmentů (např. antokyany). Některé fenoly jsou redukovány na alkoholy, aldehydy, alkany, alkeny nebo tvoří ethery a estery, které jsou běžnou složkou vůně a chuti u ovoce a zeleniny (Velíšek a Cejpek, 2008).

Mnoho fenolů a jejich derivátů se vyznačují hormonálními, antimikrobiálními, antioxidačními a antikarcinogenními účinky (Velíšek a Cejpek, 2008). Polyfenolické látky působí preventivně a to zejména před onemocněním jako je rakovina prsu, prostaty, plic, konečníku a tlustého střeva. Dále působí preventivně před srdečně-cévním onemocněním, Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou. Průměrný denní příjem polyfenolů má být asi 1g (Jarošová, 2012).

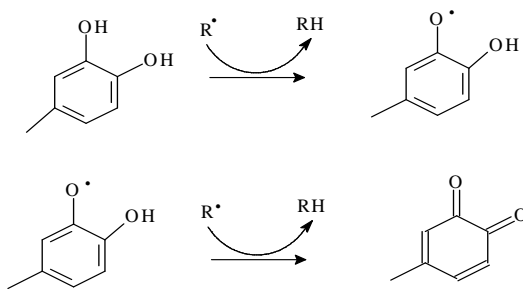
Antioxidační účinky polyfenolů lze objasnit některými mechanismy:

- 1) Řada flavonoidů i dalších polyfenolů pozastavují činnost enzymů, které se podílí na tvorbě superoxidového anion-radikálu (např. xantinoxidázu, proteinkinázu C). Inhibují i další enzymy, které jsou zodpovědné za tvorbu volných radikálů (např. cyklooxygenáza, lipoxygenáza) (Trna a Táborská, 2011).
- 2) Mnoho polyfenolů se pomocí chelátových vazeb spojuje s kovy, především s mědí a dvojmocným železem. Volné ionty těchto kovů se podílí na tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů (Trna a Táborská, 2011).



**Obrázek 2** Vazebná místa pro kovy v molekulách flavonoidů

- 3) Řada polyfenolů se snadno oxiduje. Snadnost oxidace se odvíjí od redoxního potenciálu látky, které mají hodnotu redoxního potenciálu  $< 0,75$  V. Redukují některé volné radikály s oxidačními účinky, např. superoxidový, peroxylový, alkoxylový a hydroxylový. Během reakce poskytují vodík a většinou se přitom sami přeměňují na málo reaktivní fenoxyllový radikál nebo neradikálové chinoidní struktury. Celý význam reakce je v tom, že radikály jsou degradovány dříve, než stihnou reagovat s dalšími buněčnými komponenty (Trna a Táborská, 2011).

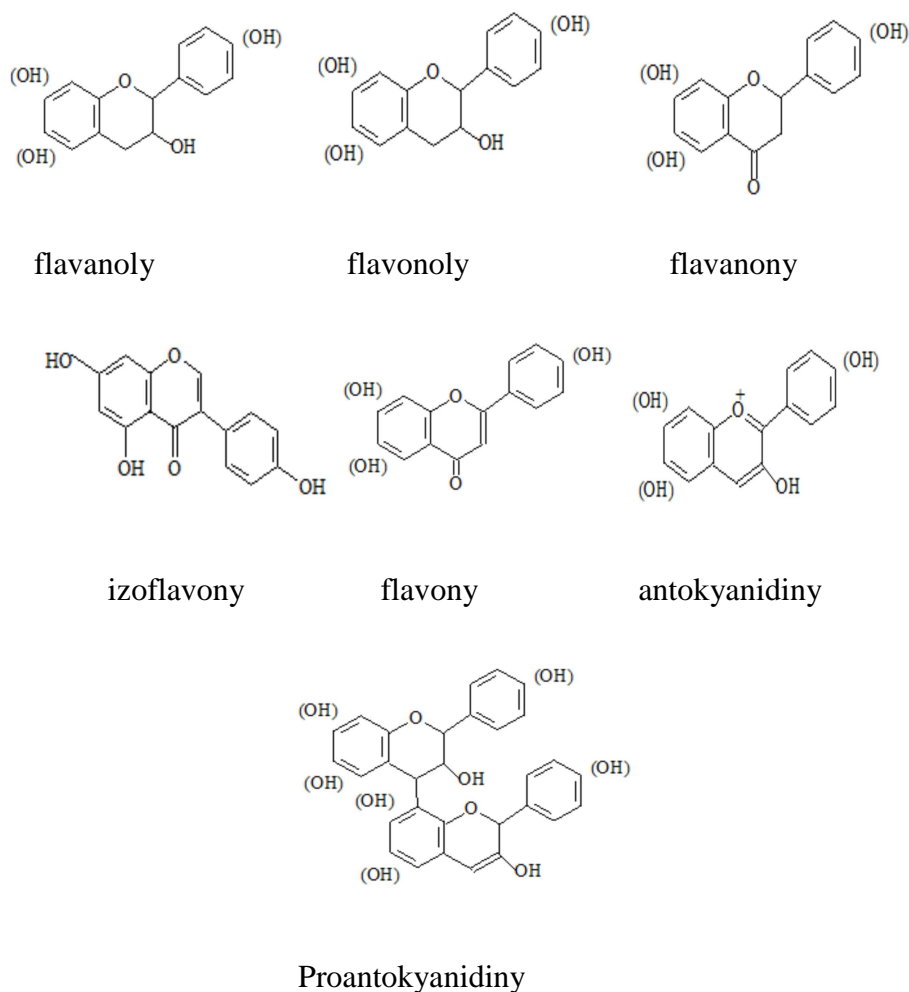


**Obrázek 3** Oxidačně redukční reakce polyfenolů s volnými radikály

Je však nutno podotknout, že za určitých okolností mohou některé fenolické látky vystupovat jako prooxidanty. V přítomnosti většího množství přechodných kovů reaguje aroxylový radikál i s kyslíkem za tvorby superoxidu a chinonu (Trna a Táborská, 2011).

## 6.1 Flavonoidy

Tyto látky jsou ve vodě rozpustné a vyskytují se ve formě barviv jako flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly, chalkony, aurony, isoflavony, antokyanidiny, proantokyanidiny v zelenině, ovoci, zrninách, v listech a kůře stromů. Jako přirozené barviva potravin jsou nejvíce významné flavony a flavonoly (Velíšek a Hajšlová, 2009). Existuje mnoho typů těchto látek, které se nacházejí v celé rostlinné říši v různých koncentracích. Některé z nich jsou biologicky aktivní a souhrně se nazývají bioflavonoidy. Některé bioflavonoidy vykazují oproti vitamínu C a E až 50krát větší antioxidační aktivitu a speciálně bioflavonoidy obsažené v tmavočervených hroznech mají až 1000krát větší aktivitu při potlačování oxidace LDL cholesterolu (to znamená při ochraně před infarktem) než vitamin E (Mindel a Mundis, 2006).



**Obrázek 4** Zástupci flavonoidů (Trna a Táborská, 2011)

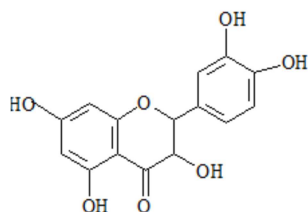
### 6.1.1 Flavonoly

Flavonoly se řadí mezi důležitá žlutá barviva. Tyto látky mají ve své struktuře v poloze C-3, C-4, C-5, C-7 a C-4' navázanou hydroxyskupinu a vzájemně se liší substitucí v poloze C-3' a C-5'. Mezi nejznámější flavonoly patří kempferol, kvercetin, a myricetin vyskytující se zejména jako glykosidy a jako kopigmenty doprovázející anthokyany (Velíšek a Hajšlová, 2009). Kvercetin, myricetin a kempferol tvoří 15 až 25 % hmotnosti čaje v sušeném stavu (Shahidi a Naczki, 2004).

#### 6.1.1.1 Kvercetin

Kvercetin se v potravě nachází jak ve formě volné, tak ve formě vázané s cukernými jednotkami, např. jako kvercetin-3-O-glukosid, kvercetin-4'-O-glukosid, kvercetin-3-O-rhamnosid (Trna a Táborská, 2011).

Kvercetin patří mezi nejsilnější biologicky aktivní flavonoly. Je jedním z nejvýznamnějších protirakovinných látek. Eliminuje několik protirakovinných látek a potlačuje poškození buněčné DNA. Kvercetin je účinný v boji proti zánětům, bakteriím, houbovým infekcím a virům. Napomáhá imunitnímu systému potlačovat alergické reakce a to tak, že brání uvolňování histaminu z buněk. Podle všeho tímto napomáhá bojovat s alergiemi jako je např. senná rýma. Kvercetin dále zabraňuje tromboze a vzniku krevní sraženiny. Kvercetin je silným antioxidantem, který pohlcuje volné kyslíkové radikály a zabraňuje oxidaci tuku. Dále kvercetin svými antioxidačními účinky napomáhá udržovat čisté a průchodné cévy. Výhodou je, že tepelnou přípravou a mražením se kvercetin neničí (Pazdera, 2011).

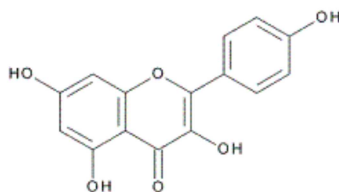


**Obrázek 5** Kvercetin (Trna a Táborská, 2011)

#### 6.1.1.2 Kempferol

Kempferol patří do skupiny látek s nízkou molekulovou hmotností fenylnbenzopyronového charakteru (Jirásek, 2011).

Kempferol neboli 3,4',5,7 tetrahydroflavon se nachází v čaji, brokolici, grapefruitu, propolisu, vilínu a v jiných rostlinných zdrojích. Nejvýznamnější biologické funkce kempferolu jsou antioxidační, protizánětlivé účinky a schopnost pohlcovat volné radikály. Díky těmto vlastnostem je tato látka hojně využívána v tradiční čínské medicíně (Mohammadi a Moheeni, 2015). Bylo také zjištěno, že kempferol vykazuje osteogenní aktivitu. Kempferol má stejné účinky jako ipriflavon. Ipriflavon patří mezi syntetické isoflavony a využívá se ke snížení osteoresorpce při osteoporóze. Kempferol je tedy užitečný jako preventivní přípravek před osteoporózou (Mazaki *et al.*, 2014). Dále má kempferol schopnost vázat se na syrovátkový protein  $\alpha$ -laktalbumin. V důsledku této interakce tak může být ovlivněna jeho antioxidační aktivita a biologická dostupnost (Mohammadi a Moheeni, 2015).



**Obrázek 6** Kempferol (Trna a Táborská, 2011)

### 6.1.1.3 Myricetin

Myricetin je flavonol složený z 3-hydroxyflavonové struktury a 6 hydroxylových skupin. Myricetin se v přírodě vyskytuje ve formě glykosidů. Tato látka se nachází v potravinách, jako jsou ořechy, cibule, jahody, bylinky a červené hrozny (Kyle, 2011).

Myricetin vykazuje celou řadu biologických účinků, z nichž nejvýznamnější je jeho antioxidační aktivita, kterou zachycuje volné radikály. Dále má protirakovinné a protizánětlivé vlastnosti. Tato látka je prevencí před onemocněním srdce, protože zabraňuje oxidaci LDL cholesterolu a také snižuje absorpci oxidovaného LDL makrofágy. Myricetin je také účinný pro pacienty, u kterých byla diagnostikována Alzheimerova a Parkinsonova choroba (Kyle, 2011).

### 6.1.2 Flavanoly

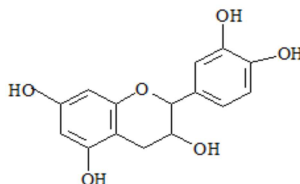
Flavan-3-oly se nachází v rostlinných materiálech jako monomery, oligomery a polymery. Narozdíl od jiných flavonoidů nejsou v potravinách glykosylovány. Jsou odolné vůči varu (Stratil, 2007). Polyfenolické látky tvoří asi 35 % hmotnosti čaje

v sušeném stavu. S toho flavanoly tvoří 90 % ze všech polyfenolů. Nicméně jejich složení závisí na druhu čaje, zemi původu a životních podmínkách (Shahidi a Naczka, 2004).

#### **6.1.2.1 Katechniny**

Katechniny jsou látky, které se nacházejí ve velkých koncentracích v různých potravinách rostlinného původu a nápojích. Podle struktury jsou katechniny řazeny mezi flavanoly a zahrnují látky katechin, epikatechin, epigallokatechin, epikatechin gallát, epigallokatechin gallát (Heneman a Zidenberg-Cherr, 2008). Katechniny jsou hlavní složkou zeleného čaje a představují 90 % polyfenolové frakce, kdežto u černého čaje pouze 25 % (Belitz *et al.*, 2009).

Sloučeniny, které se řadí do této skupiny, potlačují bakteriální růst kmenů stafylokoků, kteří jsou imunní vůči penicilinu a způsobují tak životu nebezpečné infekční onemocnění. Dále snižují hladinu LDL cholesterolu. Poskytují také ochranu před zubním kazem, krvácením dásní a tlumí začátek arterosklerózy. Dále bylo prokázáno, že účinně působí v boji proti rakovině žaludku a plic a chrání buněčnou DNA před poškozením (Mindell a Mundis, 2004).



**Obrázek 7** Katechin (Trna a Táborská, 2011)

#### **6.1.3 Fenolové antioxidanty**

Fenolové sloučeniny jsou látky, které mají ve své struktuře jeden nebo více benzenových kruhů, na které je navázána jedna nebo více hydroxylových skupin. Vyskytují se v potravinách rostlinného původu a díky svým protivirovým, protizánětlivým, antimikrobiálním a antialergenním účinkům, mají blahodárný vliv na lidský organismus (Stratil, 2007).

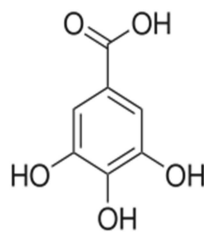
### **6.1.3.1 Fenolové kyseliny a jejich deriváty**

Fenolové kyseliny jsou součástí rostlinných polyfenolů. V rostlinách se nejběžněji vyskytují ve formě esterů (Slanina a Táborská, 2004). Jejich aktivita se odvíjí od počtu hydroxylových skupin v molekule. To znamená, že čím víc OH-skupin sloučenina má, tím vyšší je její účinnost. Především je známá kyselina benzoová a její deriváty jako je např. kyselina gallová a kyselina hydroxyskořicová a její deriváty jako je např. kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina ferulová a kyselina sinapová. (Velíšek, 1999). V rostlinných materiálech jsou deriváty hydroxyskořicové kyseliny obsaženy mnohem více jak deriváty kyseliny benzoové (Stratil, 2007).

#### **6.1.3.1.1 Kyselina gallová**

Kyselina gallová je derivát kyseliny benzoové. Je přítomna v duběnkách, ořešících, dubové kůře, čajových lístcích a dalších rostlinách. Vyskytuje se jak ve volné formě, tak i vázané formě do taninů, ze kterých je izolována kyselou hydrolýzou. Vyskytuje se i v esterově vázané formě na glukózu (gallotaniny a ellagotaniny), katechiny (gallokatechin, epigallokatechin a epigallokatechin gallát) nebo proantokyanidiny (Stratil, 2007).

Kyselina gallová má antimikrobiální vlastnosti (Sarjit, 2015). Dále vykazuje protiplísňové, protinádorové a antioxidační účinky (Kee *et al.*, 2014). Kyselina gallová je nejvíce obsaženým polyfenolem v černém čaji. Při výzkumech byl také identifikován metabolit kyseliny gallové v lidském těle, kterým je 4-O-methylgallová kyselina. Později byly v lidské moči identifikovány tři metabolity kyseliny gallové a to po čtyřtýdenním pití 5 šálků černého čaje za den. Tyto metabolity byly popsány jako 4-O-methylgallová kyselina, 3-O-methylgallová kyselina a 3,4-O-dimethylgallová kyselina. Celková exkrece těchto metabolitů byla 1,5 mg za den, což představuje pouze 7,5 % požití volné kyseliny gallové a 1,5 % celkové požití kyseliny gallové. Poznatky s tohoto výzkumu by mohly být použity jako potenciální marker příjmu fenolů z černého čaje (Shahidi, Naczki, 2004).

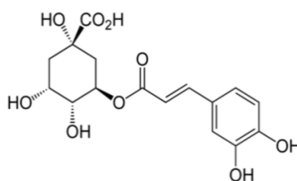


**Obrázek 8** Kyselina gallová (Stratil, 2007)

#### 6.1.3.1.2 Kyselina chlorogenová

Kyselina chlorogenová neboli 5-caffeoylchinová kyselina se řadí do skupiny polyfenolických kyselin s antioxidační aktivitou (Le-Bail *et al.*, 2015). Tato kyselina se nachází hlavně v kávě, bramborách a mnoha dalších druzích zeleniny a ovoce (Slanina a Táborská, 2004).

Kyselina chlorogenová vykazuje protinádorové účinky, snižuje krevní tlak a horečku, tlumí bolesti při onemocnění (Le-Bail *et al.*, 2015).



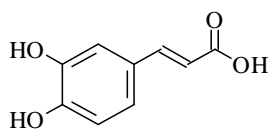
**Obrázek 9** Kyselina chlorogenová (Trna a Táborská, 2011)

#### 6.1.3.1.3 Kyselina kávová

Kyselina kávová je derivát hydroxyskořicové kyseliny. Ve volné a vázané formě je nejvíce se vyskytující fenolovou kyselinou. V ovoci představuje 75-100 % obsahu hydroxyskořicové kyseliny. Během zrání se její koncentrace sice snižuje, ale její celkový obsah se zvětšováním plodů zvyšuje (Stratil, 2007). Kyselinu kávovou lze najít v bylinkách, kávě, vínu, ovoci a zelenině (David *et al.*, 2015).

Kyselina kávová vykazuje antioxidační, protizánětlivé, protinádorové, protivirové, antimikrobiální, antialergické, hepatoprotektivní, antikarcinogenní účinky (Rodrigues *et al.*, 2015).



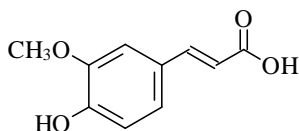


**Obrázek 10** Kyselina kávová (David et al., 2015)

#### **6.1.3.1.4 Kyselina ferulová**

Kyselina ferulová neboli 4-hydroxy-3-methoxyskořicová kyselina patří mezi deriváty hydroxyskořicové kyseliny. Tato přírodní polyfenolická látka se nachází v listech a plodech jak ve formě volné, tak ve formě vázané přes kovalentně konjugovanou vazbu s polysacharidy, glykoproteiny, polyaminy, ligninem a hydroxy mastnými kyselinami v buněčné stěně rostlin (Kumar a Pruthi, 2014).

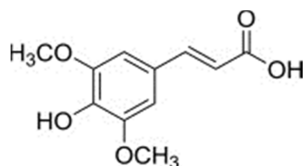
Tato fenolická látka má silné antioxidační vlastnosti a působí preventivně před onemocněním jako je rakovina, diabetes, kardiovaskulární onemocnění a neurodegenerativní onemocnění (Choi a Park, 2015).



**Obrázek 11** Kyselina ferulová (Trna a Táborská, 2011)

#### **6.1.3.1.5 Kyselina sinapová**

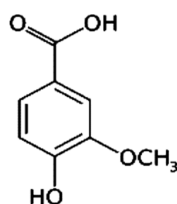
Kyselina sinapová patří mezi deriváty kyseliny skořicové. Tato kyselina je široce rozšířená v rostlinné říši a lze ji nalézt v ovoci, zelenině a žitu. Vykazuje silné antioxidační, protizánětlivé účinky a chrání mozkové buňky (neurony) před poškozením a odumíráním (Roy a Prince, 2012).



**Obrázek 12** Kyselina sinapová (Roy a Prince, 2012)

#### 6.1.3.1.6 Kyselina vanilová

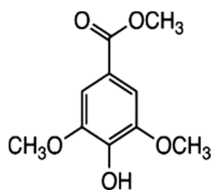
Kyselina vanilová neboli 4-hydroxy-3-methoxybenzoová kyselina je oxidovaná forma vanilinu. Je také meziproduktem výroby vanilinu z kyseliny ferulové. Její největší množství se nachází v kořenovém systému byliny pocházející z Číny zvané ženšen (Swislocka *et al.*, 2013). Tato kyselina vykazuje antimikrobiální, antibakteriální, hepatoprotektivní, protirakovinné účinky. V tradiční čínské medicíně se tato kyselina využívá při cukrovce, vředech, horečce a při vysokém krevním tlaku (Sindhu *et al.*, 2015).



**Obrázek 13** Kyselina vanilová (Sindhu *et al.*, 2015)

#### 6.1.3.1.7 Kyselina syringová

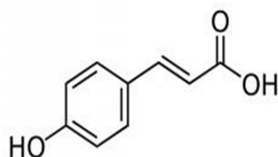
Kyselina syringová neboli 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoová kyselina je kyselina vyskytující se v obilovinách jako je ječmen, kukuřice, proso, oves, rýže, žito, čirok a pšenice. Tato kyselina vykazuje antioxidační, protirakovinné, antiproliferační, protirakovinné a hepatoprotektivní účinky (Karthik *et al.*, 2014)



**Obrázek 14** Kyselina syringová (Karthik *et al.*, 2014)

#### 6.1.3.1.8 Kyselina p-kumarová

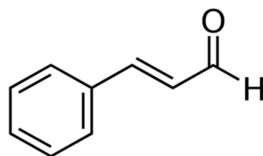
Kyselina p-kumarová neboli 3-(4-hydroxyfenyl)-2-propenová kyselina patří mezi deriváty kyseliny skořicové. Vyskytuje se v ovoci a zelenině. Ma silné antioxidační účinky. Je prevencí před onemocněním rakoviny žaludku prostřednictvím inhibice tvorby karcinogenných nitrosaminů (Zitka *et al.*, 2011).



**Obrázek 15** Kyselina p-kumarová (Zitka *et al.*, 2011)

#### 6.1.3.1.9 Vanilin

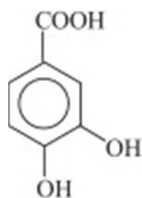
Vanilin neboli 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd tvoří hlavní složku ve směsi látek dodávající chuť a aroma vanilce. V potravinářství je velmi rozšířenou látkou využívanou k ochucování jídel. Vanilin potlačuje riziko nádorového onemocnění tlustého střeva a inhibuje tvorbu bakterií (Zitka *et al.*, 2011).



**Obrázek 16** vanilin (Zitka *et al.*, 2011)

#### 6.1.3.1.10 Kyselina protokatechová

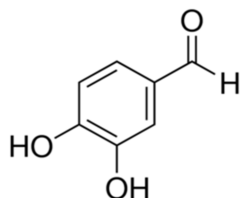
Neboli 3,4-dihydroxybenzoová kyselina vzniká při oxidaci adrenalinu. Je obsažena v rostlinných produktech, jako jsou např. hrozny, cibule a v pryskyřicích. Tato kyselina má antioxidační, protizánětlivé, protirakovinné, neuroprotektivní a antiapoptické účinky (Zhang *et al.*, 2015).



**Obrázek 17** Kyselina protokatechová (Zhang *et al.*, 2015)

#### 6.1.3.1.11 3,4- dihydroxybenzaldehyd

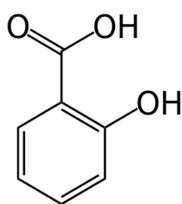
Tato kyselina patří do skupiny derivátů kyseliny benzoové. Inhibuje oxidační poškození DNA a apoptózy a to tím, že potlačuje indukci peroxidu vodíku, která vyvolává oxidační stres. V lékařství se hojně využívá jako činidlo, které působí jako prevence před vznikem rakoviny (chemopreventivní činidlo) (Jeong *et al.*, 2009).



**Obrázek 18** 3,4- dihydroxybenzaldehyd (Jeong *et al.*, 2009)

#### 6.1.3.1.12 Kyselina salicylová

Jejím derivátem je kyselina acetylsalicylová kyselina známá jako aspirin. Vykazuje silné protizánětlivé účinky a používá se ke snížení horečky. Vyskytuje se v kůře vrby bílé. Zvyšuje biochemickou obranu rostlin proti poškození a to tím, že indukuje expresi proteinů souvisejících s patogenezí. Tyto účinky byly zaznamenány již v roce 1987, kdy byla rostlina tabáku ošetřena aspirinem a vykazovala větší odolnost proti viru tabákové mozaiky (Kumar *et al.*, 2014).



**Obrázek 19** kyselina salicylová (Kumar *et al.*, 2014)

## 7 STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

V současné době je k dispozici rozsáhlá škála moderních instrumentálních technik, které lze využívat při laboratorním stanovení různých látek. Je ovšem nutností tyto laboratorní techniky znát a vědět kdy a za jakých okolností každou z nich uplatnit.

Pokud je např. jako matrice zvolena rostlina, tak v ní se nachází obrovská směs různých látek. Nejprve je potřeba si z této směsi vybrat pouze tu skupinu látek nebo jednu danou látku, která má být stanovena, a po té je tedy důležité vybrat nejvhodnější laboratorní techniku, která je schopna danou skupinu látek nebo jednu konkrétní látku spolehlivě identifikovat (Klejduš, 2004).

Postup při stanovení biologicky aktivních látek:

- 1) Vážení, nebo zjišťování objemu daného vzorku
- 2) Úprava vzorku- v případě tekutiny se používá centrifugace, filtrace, vymrazování a v případě pevné látky se používá homogenizace
- 3) Extrakce - pevnou, tuhou matrici jako je např. maso a rostliny je nutno převést do roztoku
- 4) Přečišťování techniky - např. extrakce pevnou fází
- 5) Instrumentální metody- např. kapalinová chromatografie, plynová chromatografie (Klejduš, 2004)

### 7.1 Extrakce

Jde o separační proces (dělící) proces, kdy se dostávají do kontaktu dvě nemísitelné fáze. Látky (analyty) se rozdělují mezi tyto dvě vzájemně nemísitelné fáze. Látky (analyty) se mezi tyto dvě fáze dělí na základě různé rozpustnosti (rozdílných rozdělovacích koeficientů) v použitých rozpouštědlech. Čím vyšší je rozdíl mezi rozdělovacími koeficienty látek, tím lepší je jejich oddělení (Borkovcová a Kostrhounová, 2013).

Cílem extrakce je selektivní až specifické oddělení látky od ostatních složek nebo naopak separace rušících látek od dané látky (Borkovcová a Kostrhounová, 2013).

V rostlinných materiálech v čerstvém stavu mohou být flavonoidy působením enzymů rozkládány. Vzorky je proto vhodné použít v sušeném, lyofilizovaném nebo

zmrazeném stavu. Pro extrakci rozpouštědlem se rozpouštědlo volí dle závislosti na typu stanovovaného flavonoidu. Velice důležitou roli zde hraje polarita dané látky. Méně polární flavonoidy (např. isoflavony, flavanony, methylované flavony a flavanoly) jsou extrahovány v rozpouštědlech chloroformu, dichlormethanu, diethyletheru nebo ethylacetátu. Zatímco glykosidické flavonoidy a více polární aglykony jsou extrahovány alkoholem nebo ve směsi alkoholu s vodou. Glykosidy mají zvýšenou rozpustnost ve vodě, a proto je vhodné použít směs vodného roztoku s alkoholem. Flavan-3-oly (katechiny, proanthokianidiny a kondenzované taniny) mohou být extrahovány přímo vodou (Andersen a Markham, 2006).

### **7.1.1 Konvenční extrakční techniky**

Principem konvenčních extrakčních technik je přímá extrakce vzorku z tuhé matrice (např. rostlinné matrice, tablety, některé potravinové matrice) do rozpouštědla. Výtěžnost a rychlost reakce závisí na teplotě a tlaku. Nejznámějšími metodami jsou extrakce na třepačce a Soxhletova extrakce (Nováková, 2014).

#### **7.1.1.1 Soxhletova metoda**

Tato metoda probíhá v Soxhletově extraktoru. Vzorek je umístěn v extrakční patroně, která je vyrobena z papíru nebo celulozy (Klejdus, 2004). Pod extrakční patronou je umístěna varná baňka, která je naplněna vhodným rozpouštědlem. Varná baňka se zahřívá k varu rozpouštědla a jeho páry stoupají do chladiče, kde kondenzují. Rozpouštědlo kape na vzorek obsažený v patroně. Střední část extraktoru se postupně plní zkondenzovaným rozpouštědlem, jehož hladina stoupá i v tenké přepadové trubičce. Vystoupá-li hladina rozpouštědla ve střední části extraktoru k nejvyšší části přepadové trubičky, tak roztok přeteče do destilační baňky, z které se těkavé rozpouštědlo znovu destiluje. Nakonec se získá roztok jedné nebo více složek v destilační baňce, z níž se po ukončení extrakce rozpouštědlo vydestiluje. V baňce tak zůstane jen izolovaná složka, popř. složky (Borkovcová a Kostrhounová, 2013).

Výhodou Soxhletovy extrakce je, že vzorek je neustále v kontaktu s čerstvým extraktem, což usnadňuje posun fázové rovnováhy. Další výhodou je, že po skončení extrakce není potřeba provést filtraci, což umožňuje použít vzorek pro souběžné paralelní extrakce. S tímto jsou spojeny nízké náklady na základní vybavení (Castro *et al.*, 2010).

Ve srovnání s dalšími technikami velkou nevýhodou této extrakce je dlouhá doba potřebná k extrakci a tím i velká spotřeba rozpouštědla, což zvyšuje náklady a také může způsobit i problémy životního prostředí. Vzorky jsou extrahovány při bodu varu rozpouštědla po dlouhou dobu, a tím může dojít k tepelnému rozkladu teplotně nestabilních vzorků (Castro *et al.*, 2010). Extrakční čas se pohybuje od 3-48 hodin (Klejduš, 2004).

## **7.1.2 Moderní extrakční techniky**

### **7.1.2.1 Extrakce urychleným tokem rozpouštědla**

Extrakce urychleným tokem rozpouštědla je plně automatizovaný proces, který slouží pro rychlou a snadnou extrakci látky (analytu). Při této extrakci se využívá zvýšené teploty a tlaku, čímž dochází ke zkrácení doby extrakce a snižuje se spotřeba rozpouštědla. Extrakce probíhá při teplotě nad bodem varu daného rozpouštědla (400-200 °C). Celý děj probíhá za vysokého tlaku (10-15 MPa.) Působením tlaku dochází ke snížení povrchového napětí rozpouštědla a to tak může pronikat hluboko do pórů matrice. Tímto dochází k narušení matrice a zvyšuje se přenos látky (analytu) z roztoku do rozpouštědla. Výsledkem je zvýšená účinnost celé extrakce (Saha *et al.*, 2015).

### **7.1.2.2 Mikrovlnná extrakce**

Mikrovlnnou extrakcí se rozumí neionizující záření, které je dáno pohybem molekul způsobených migrací iontů a otáčením dipólů. Mikrovlnnou extrakci lze použít pro širokou škálu biologicky aktivních látek. Tlaková mikrovlnná extrakce je jedním z nejčastěji používaných systémů, který poskytuje rychlou extrakci s nízkou spotřebou rozpouštědla a zároveň umožňuje extrakci až 16 vzorků současně (Chen *et al.*, 2008). Doba extrakce se pohybuje od 12-30 min. Mikrovlnná extrakce může probíhat v uzavřeném a otevřeném systému. Používáním uzavřených extrakčních nádob mikrovlnné záření eliminuje problémy s přehříváním a minimalizuje tak degradaci vzorku (Biesaga, 2011). Extrakce v tomto systému probíhá pod vyšším tlakem i teplotou a proto se extrakce urychluje. Nicméně před samotným otevřením je potřeba mikrovlnný extraktor vychladit na pokojovou teplotu, takže tím se extrakční čas vyrovná (Klejduš, 2004).

Velkou výhodou této extrakce je, že mikrovlnné záření proniká do materiálu a dohromady s polárními molekulami rozpouštědla se vytváří teplo, které stejnoměrně ohřívá celý materiál. Tímto se navyšuje migrační rychlost a také se urychluje průchod rozpouštědla do tuhé matrice a to usnadňuje uvolnění analytů (Wang a Weller, 2006).

### **7.1.2.3 Modifikovaná Soxhletova reakce**

Rozdílem mezi konvenční Soxhletovou metodou je v umístění vzorku. Vzorek se zde neextrahuje v extrakční patroně za atmosferického tlaku, ale je vložen za identických podmínek mezi extrakční nádobu a chladič. Celá extrakce probíhá nad teplotou varu rozpouštědla. Tím se zvyšuje účinnost extrakce a zkracuje se extrakční čas na 60 min (Vacek *et al.*, 2008).

## **7.2 CHROMATOGRAFICKÉ METODY**

Chromatografické metody patří mezi nejvýznamnější články mezi moderními separačními technikami. Spolu s elektromigračními metodami jsou schopny separovat velice složité směsi a získat tak jednotlivé složky směsi ve vysoce čistém až homogenním stavu (Králová, 2008).

Moderní chromatografické techniky slouží nejen k preparativním účelům, ale i k účelům analytickým. Za pomoci chromatografických technik lze tedy získat kvalitativní i kvantitativní informace, tzn. kromě identifikace složení směsi se dá stanovit i koncentrace jednotlivých složek. Pro úplnou identifikaci je však potřeba propojení s dalšími metodami analytické chemie např. hmotnostní spektrometrií, UV-Vis spektrometrií apod. (Králová, 2008).

Chromatografie se řadí mezi separační metody. Principem je tedy metoda, kdy se oddělují (separují) složky obsažené ve vzorku. Vzorek se vkládá mezi dvě navzájem nemísitelné fáze. Tyto fáze se nazývají mobilní, která je pohyblivá a stacionární, která je nepohyblivá. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek unášen touto soustavou. Ty složky, které mají největší afinitu ke stacionární fázi, jsou zachycovány a zadržovány. Tímto postupně dochází k separaci jednotlivých složek ve směsi, kdy se nejprve oddělují složky s menší afinitou ke stacionární fázi a po té složky s větší afinitou (Klouta, 2003).



### 7.2.1 Kapalinová Chromatografie

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Oproti plynové chromatografii rozhoduje o separaci složek vzorku nejen jejich afinita ke stacionární fází, ale také použitá mobilní fáze. Během separace se analyt dělí mezi mobilní a stacionární fází. Čas, který stráví v jedné nebo druhé fází, závisí na afinitě analytu ke každé z nich (Klouda, 2003).

V počátcích 70. let se vyvinula z plynové chromatografie vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). Vysoké účinnosti je docíleno využitím stacionární fáze, jejichž kolony jsou homogenně vyplněné malými částicemi jednotného tvaru a stejné velikosti. Mobilní fáze protéká kolonou pod vysokým tlakem (jednotky až desítky MPa). Někdy je tedy metoda nazývána vysokotlaká kapalinová chromatografie. Dále se dávkuje mála množství vzorku (řádově mikrolitry) (Adam, 2011).

Výhodou HPLC je široké spektrum použitelnosti. Analyzovat se mohou např. ionty, polární látky i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Další obrovskou výhodou je možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze.

Nevýhodou oproti plynové chromatografii je náročnější instrumentace a složitější mechanismus separace (Adam, 2011).

### 7.2.2 Plynová chromatografie

V plynové chromatografii dochází k distribuci složek vzorku mezi dvě nemísitelné fáze. Mobilní fází je nosný plyn, stacionární fází je pevná látka (Kolb a Ettre, 2006). Vzorek se vstříkne do proudu plynu, který jej dále unáší kolonou. V koloně se složky oddělují na základě různé afinity ke stacionární fází. Složky, které opouštějí kolonu, jsou detekovány pomocí detektoru, jehož signál se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se identifikuje druh a množství zastoupení složek (Klouda, 2003).

Z důvodu přeměny analytu v plyny se mohou separovat pouze takové látky, které mají dostatečný tlak syté páry, jsou tepelně stálé a mají relativní molekulovou hmotnost menší než 1000. Obecně se plynová chromatografie používá k separaci plynů, většinou nedisociovatelných kapalin, pevných organických molekul a mnoha organokovových látek (Klouda, 2003).

Plynová chromatografie není použitelná pro separaci makromolekul, organických a anorganických solí (Klouda, 2003).

## 8 LÉČIVÉ BYLINY

Byliny jsou konzumovány ve formě čajů jako výluh ze sušených bylin v teplé nebo horké vodě nebo jsou vařeny z listů, květů, plodů, semen a kořenů rostlin. Bylinné čaje jsou široce známy, protože obsahují celou řadu účinných fytochemikálií s biologickými účinky, které kladně působí na lidské zdraví (Oh *et al.*, 2013).

Napomáhají snižovat riziko chronických onemocnění, jako jsou alergie, nespavost, bolesti hlavy, úzkost, střevní poruchy, deprese a vysoký krevní tlak. Bylinné čaje mají antikarcinogenní, chemopreventivní, antioxidantní a antimikrobiální aktivitu. Tímto působí blahodárně při onemocnění souvisejících s životním stylem (Oh *et al.*, 2013).

Každá léčivá bylina samozřejmě s výjimkou těch jedovatých, je současně také potravinou. A proto není tělu dobré předkládat byliny ve stále stejné formě s nepřetržitě se opakujícími účinnými látkami. Navíc tělo si po nějaké době na tyto látky navykne a tím se oslabí i ten nejintenzivnější účinek. Není tedy zcela správné zvykat si jen na některé druhy bylin a jiné už neužívat (Hirsch, 2013).

Je známo, že každá potravina, kterou jíme nebo pijeme příliš dlouho nebo příliš jednostranně připravenou, ztrácí svoji zázračnou vlastnost přírodního léčebného prostředku. Kromě přípravy čaje z léčivých rostlin existuje i celá řada jiných možností podávání (Hirsch, 2013).

### 8.1 Přehled bylin

#### 8.1.1 Stevie (*Stevia rebaudiana*)

Stevie je rozvětvený hustý keř z čeledi hvězdnicovitých, pocházející z oblasti Amambay v severovýchodní Paraguay. Vyskytuje se také v sousedních částech Brazílie a Argentiny. Dnes se její pěstování rozšířilo i do dalších oblastí světa, včetně Kanady a některých částí Evropy a Asie (Simonsohnová, 2013).

*Stevia* patří mezi vytrvalé byliny s rozsáhlým kořenovým systémem a křehkými stonky produkujícími malé eliptické listy. Rostlina dorůstá výšky až 1 m. *Stevia rebaudiana* Bertoni byla botanicky klasifikována v roce 1899 panem Moisé Santiago Bertoni, který ji i podrobněji popsal. Z počátku ji volal *Eupatorium rebaudianum*. Její název změnil na *Stevia rebaudiana* Bertoni v roce 1905 (Simonsohnová, 2013).

Vsoučasné době je stevia dobře známá díky svému vysokému obsahu diterpenických glykosidů, které jsou zodpovědné za sladkou chuť. Souhrnně se tyto látky nazývají

steviosid. Z hlediska chemické struktury je steviosid popisován jako glykosid. Je tedy složený ze tří molekul glukózy, které jsou spojeny s aglykonovou složkou steviolem (Lemus-Mondaca, 2012).

Steviosid je asi 300 krát sladší než sacharóza. To je výhodné zejména pro ty osoby, které trpí obezitou, cukrovkou, zubními kazy nebo onemocněním srdce. Rod *stevia* obsahuje asi 250 specifických druhů, ale pouze dva druhy jsou schopné produkovat diterpenické glykosidy. Je to *rebaudiana* a *phlebophylla* (Lemus-Mondaca, 2012).



**Obrázek 20** *Stevia* (Simonsohnová, 2013)

### **8.1.2** Kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*)

Kopřiva se řadí do čeledi kopřivovitých. Kopřiva je zimuvzdorná rostlina dorůstající výšky až 150 cm s výrazně pilovitě zubatými listy. Vyskytuje se téměř po celém světě. Vyjma mladých výhonků (březen až květen) celou rostlinu pokrývají žahavé chloupky. Od května do července má rostlina bíloželené květenství (Wenzel, 2014).

Kopřiva obsahuje karotenoidy, flavonoidy, vysoké množství chlorofylu, vitamin A a C, minerální soli (draslík, vápník, železo), třísloviny, tuky, sacharidy a bílkoviny (Górnicka, 2014).

Kopřiva má blahodárné čistící a detoxikační účinky. Tato rostlina obsahuje i protizánětlivé látky a látky tišící bolest. Proto se kopřiva hojně využívá při léčbě revmatu a artritidy. Kopřiva je podávána i při potížích s močovým měchýřem, močovými cestami a při problémech s prostatou (Wenzel, 2014). Kopřiva je také doporučována při chudokrevnosti a anémii (Górnicka, 2014).



**Obrázek 21** *Kopřiva dvoudomá (Korbelář et al., 1973)*

### **8.1.3** Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*)

Šalvěj je rozšířenou rostlinou v jižní Evropě a Malé Asii. U nás je často pěstována jako léčivka. Šalvěj se řadí do čeledi hluchavkovitých (Gato, 2013).

Šalvěj je vytrvalý, rozvětvený (polo)keř vysoký až 80 cm se zdřevnatělými v horní části jemně ochlupenými větvíčkami. Listy jsou plstnaté, oválné zprvu se šedozeleným a později spíše stříbřitým zabarvením (Wenzel, 2014). Tato bylina kvete počátkem léta (Gato, 2013)

Šalvěj obsahuje glykosidy, kumariny, třísloviny, enzymy, silice, flavonoidy, saponiny a minerální látky (Gato, 2013). Co se týče účinků, tak šalvěj rozpouští hleny a má antibakteriální účinky. Proto je velmi ceněna v přírodní medicíně při kašli, nachlazení a bolestech krku. Používá se i při žaludečně-střevních potížích, průjmu, nechutenství, také k výplachům a kloktání při zánětech zubů a poranění ústní sliznice. Ženy účinky šalvěje využívají při nadměrném pocení, návalech horka a jiných klimakterických potížích. Kromě toho má tato bylina zlepšovat paměť (Wenzel, 2014).



**Obrázek 22** *Šalvěj (Korbelář et al., 1973)*

#### 8.1.4 Smetánka lékařská (*Taraxacum officinale*)

Smetánka lékařská je vytrvalá bylina, která se řadí do čeledi čekankovitých. Smetánka divoce roste ve většině oblastí světa. V některých zemích Evropy se pěstuje pro léčebné účely i jako zelenina na salát (Wenzel, 2014).

Smetánka lékařská má lopatkovité listy, které jsou lesklé, hladké s hrubými pilovitými zářezy. Může dorůst až do výšky 30 cm. Dutý stvol obdobně jako list a kořen, obsahuje mléčnou šťávu. Na konci stvolu rostou žluté květy, které po odkvětu tvoří typické ochmýřené nažky, které jsou uspořádané do kulovitého tvaru. Rostlina kvete od jara do léta (Gato, 2013).

V tradiční a lidové medicíně je smetánka známá svými diuretickými, laxativními a choloretickými účinky. Bylo také prokázáno, že má antidiabetické, antikarcinogenní, protizánětlivé, antioxidační a prebiotické vlastnosti (Kenny *et al.*, 2014). Rostlina se také používá jako přírodní lék proti gastrointestinálním onemocněním (Huber *et al.*, 2015).



**Obrázek 23** Smetánka lékařská (Korbelář *et al.*, 1973)

#### 8.1.5 Dobromysl obecná (*Origanum vulgare*)

Dobromysl patří mezi vytrvalé byliny rozšířené v Evropě, Severní Africe, Americe a Asii (Zhang *et al.*, 2014). Řadí se do čeledi hluchavkovitých (Stompfová, 2012). V západní stravě je bylina široce využívána jako koření a dále se běžně používá v tradiční medicíně při léčbě různých onemocnění (Zhang *et al.*, 2014).

Dobromysl je vlnatě chlupatá rostlina dorůstající výšky od 25 cm až do 90 cm. Listy jsou řapíkaté, vejčité, celokrajné nebo mělce vroubkované. Květy jsou drobné, růžové a jsou nahloučeny na vrcholu hlavní lodyhy do lichoklasů nebo hlávek s 5 až 25 jednotlivými květy (Stompfová, 2012).

Nať dobromysli obsahuje silice, trísloviny, hořčiny, tannin, těkavý olej, gumopryskyřici a další látky (Iburg, 2004). Silice se v tradiční medicíně hojně využívají

pro léčbu nemocí jako je rýma, kašel a zažívací poruchy (Zhang *et al.*, 2014). Dále se silice využívají jako antidepresivum, při poruchách spánku, podporují také jaterní činnost, snižují revmatické bolesti a působí močopudně (Stompfová, 2012). Díky svému vysokému obsahu těkavých olejů a fenolických látek (flavonidy, fenolické kyseliny), rostlina vykazuje silné antimikrobiální a antioxidační účinky (Zhang *et al.*, 2014).



**Obrázek 24** Dobromysl (Korbelář *et al.*, 1973)

#### **8.1.6** Mateřídouška obecná (*Thymus serpyllum*)

Mateřídouška se řadí do čeledi hluchavkovitých. Je to vytrvalý keřík dorůstající výšky asi 25 cm. Roste v trsech. V dolní části má zdřevnatělé, částečně poléhavé a částečně vystoupavé větvičky. Černohnědé lodyhy mají na hranách chloupky. Listy jsou řapíkaté a mají vejčité čárkovaný tvar. Květy jsou růžové až fialové. Rostlina kvete od června do srpna (Gato, 2013).

Z celé rostliny se využívá kvetoucí nať, která se sbírá těsně před plným květem. Účinnými látkami jsou silice, hořčiny a třísloviny. Silice pomáhají uvolňovat křeče a dezinfikují. Hořčiny a třísloviny napomáhají trávení a podporují tvorbu trávicích šťáv (Iburg, 2004).

Mateřídouškový čaj tlumí bolesti břicha, křečovitě bolesti v nadbřišku a snižuje pocit plnosti. Kloktání čaje z mateřídoušky, stejně jako pití tohoto čaje po malých doušcích, pomáhá při dráždivém a dávivém kašli. Dále se mateřídouška používá zevně ve formě tinktury při bolestech revmatických kloubů (Iburg, 2004). Koupele s mateřídouškou posílují nervovou soustavu a hojí hnisavé rány. V dětském léčitelství se mateřídouška hojně využívá při nervozitě, všeobecné slabosti a při nachlazení (Au, 2006).



**Obrázek 25** *Mateřídouška* (Korbelář et al., 1973)

### **8.1.7** Čekanka obecná (*Cichorium intybus*)

Čekanka se řadí do čeledi čekankovitých. Tato rostlina má tuhou, větvenou, hranatou lodyhu, která je vysoká až metr a půl. Listy má podlouhlé, dolní chobotnatě peřenolaločnaté, horní kopinaté. Čekanka kvete od června do září jasně modrými květy (Gato, 2013).

Z celé rostliny se využívá kořen a nať. Čekanka má vysoký obsah organické vody, kterou buňky v organismu nejlépe vstřebávají. Dále obsahuje stopové množství sacharidů a je bohatým zdrojem draslíku, vápníku, fosforu, hořčíku, manganu, vitamínu C, A a betakarotenu. Nahořklou chuť jí dodávají látky inulin a intibin (Górnicka, 2011). Dalšími důležitými obsahovými látkami jsou třísloviny a silice. Třísloviny zneškodňují choroboplodné bakterie ve sliznicích. Hořčiny pozitivně ovlivňují trávicí procesy (Iburg, 2004).

Čekanka podporuje zejména látkovou výměnu, činnost jater, žlučníku a tvorbu žluče. Podporuje trávení a pomáhá snižovat hladinu krevního cukru. Zevně se tato rostlina využívá k výplachům očí při zánětech spojivek a víček. Čekanka rovněž pomáhá při pocitu plnosti, nadýmání a bolestech břicha (Iburg, 2004).



**Obrázek 26** *Čekanka* (Korbelář et al., 1973)

### 8.1.8 Jitrocel kopinatý (*Plantago lanceolata*)

Jitrocel se řadí do čeledi jitrocelovitých. Je to vytrvalá bylina. Tato rostlina má listy v přízemní růžici, téměř lysé, většinou přímé, rozptýlené, chlupaté, úzce kopinaté. Květy jsou nahnědlé. Jitrocel roste na loukách a okrajích cest. Tato rostlina kvete od května do září (Stompfová, 2012). Z rostliny se využívají listy, celá nať a semena. Jitrocel obsahuje slizové látky, třísloviny, flavonoidy, kyselinu křemičitou a antibakteriální iridoidglykosid (aukubin) (Stompfová, 2012). Dále jitrocel obsahuje karoten, vitamin C, hořčiny, třísloviny, organické kyseliny a minerální soli včetně kyseliny křemičité a solí zinku a síry (Górnicka, 2011).

Čaj, šťáva nebo sirup z jitrocele jsou účinným prostředkem proti kašli. Dále jitrocel potlačuje záněty, uvolňuje hluboko usazené hleny a usnadňuje odkašlávání dokonce i při chronickém či černém kašli (Stompfová, 2012). Jitrocel je doporučován užívat zejména při nachlazení provázeném teplotou, při zánětech v ústní dutině a hltanu (Jahodář, 2010). Zevně se jitrocel používá jako první pomoc při popálení kopřivou, bodnutí hmyzem nebo při drobných odřeninách (Stompfová, 2012). Dále jitrocel zlepšuje srážlivost krve, čistí krev, plíce i žaludek, uvolňuje křeče hladkých svalů horních cest dýchacích a má močopudné účinky (Górnicka, 2011).



**Obrázek 27** Jitrocel (*Korbelář et al., 1973*)



## **9 MATERIÁL A METODIKA**

Vzorky čajů pro stanovení antioxidantů byly zakoupeny v prodejně Naturka v Brně. Naturka je prodejna, která se specializuje na zdravou výživu. Poskytuje širokou škálu výrobků, které působí blahodárně na lidské organismus. V prodejně lze zakoupit čaje, byliny, potraviny pro bezlepkovou dietu, DIA potraviny, přírodní kosmetiku a různé potravinové doplňky.

Pro analýzu zde bylo zakoupeno osm vzorků bylinných sypaných čajů. Mezi vybranými vzorky je šalvěj (nať), smetánka (list), stevie (list), jitrocel (list), čekanka (nať), mateřídouška (nať) a dobromysl (nať). Základní charakteristika těchto vzorků je popsána v tabulce č.1

**Tab. 1** Popis vzorků pro analýzu

Popis vzorků pro analýzu							
Název byliny	latinský název	část rostliny	číslo šarže	hmotnost	cena	vyrobena	ozn. vz. pro analýzu
Šalvěj lékařská	<i>Salvia officinalis</i>	nať	140709	50 g	39,-Kč	ČR	1
Kopřiva dvoudomá	<i>Urtica dioica</i>	nať	140715	50 g	39,- Kč	ČR	2
Jitrocel kopinatý	<i>Plantago lanceolata</i>	list	140729	50 g	39,-Kč	ČR	3
Dobromysl obecná	<i>Origanum vulgare</i>	nať	140522	50 g	39,-Kč	ČR	4
Mateřídouška obecná	<i>Thymus serpyllum</i>	nať	140805	50 g	39,-Kč	ČR	5
Smetánka lékařská	<i>taraxacum officinale</i>	list	140325	50 g	39,-Kč	ČR	6
Stevie	<i>Stevia rebaudiana</i>	list	140512	50 g	39,-Kč	ČR	7
Čekanka obecná	<i>Cichorium intybus</i>	nať	140130	50 g	39,-Kč	ČR	8

## 9.1 Chemikálie

Chemikálie, které byly použity pro analýzu dosahovaly čistoty p. a. Rozpouštědla použité jako mobilní fáze dosahovaly čistoty HPLC gradient grade. Pro identifikaci kyseliny gallové, protokatechové, *p*-hydroxybenzoové, chlorogenové, vanilové, kávové, syringové, *p*-kumarové, salicylové, ferulové, sinapové, derivátů kyseliny benzoové a skořicové, 3,4-dihydroxybenzaldehydu a vanilinu, byly zakoupeny standardy u firmy Sigma-Aldrich, s.r.o (Praha, Česká republika). Kyselina octová, metanol a acetonitril byly pořízeny u firmy Labicom s.r.o (Olomouc, Česká republika). Demineralizovaná voda byla vyrobena v přístroji Milli Q RG (Millipore, Massachusetts, USA).

## 9.2 Přístrojové vybavení

Třepačka IKA KS 4000i (IkaWerke, Německo), Soxhletův extraktor KHS 1 (IkaWerke, Německo) K vlastní separaci byl použit chromatograf HP 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Chromatograf se skládá z vakuové odplyňovací jednotky (model G1379B), binární pumpy, mobilní fáze (G1312B) a automatického dávkovače vzorku (G1367D). Vysokoúčinný kapalinový chromatograf byl propojen s DAD detektorem (G1315C) a hmotnostním detektorem typu trojitý kvadrupól s ESI (6460 Triple Quad LC/MS/G6460A).

## 9.3 Extrakce fenolových kyselin

Pro extrakci fenolových kyselin z pevného materiálu do roztoku byla použita extrakce na třepačce a Soxhletova urychlená extrakce. Pro extrakci na třepačce byla použita teplota 30 °C a 50 °C při konstantních kmitech 140 otáček/min. Z každého vzorku sypaného čaje se navážilo 0,5 g. Navážka se kvantitativně převedla do Erlenmeyerovy baňky o objemu 50 ml a byla smíchána s 20 ml rozpouštědla metanolu o 50 % koncentraci (200 ml dest. vody a 200 ml metanolu). Takto připravené vzorky byly dány na třepačku a extrahovaly se po dobu 60 min. Po té se vzorky zfiltrovaly, převedly do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplnily po rysku metanolem. Po té bylo odebráno automatickou pipetou 1 ml takto připraveného vzorku do vialky pro analýzu na chromatografu.

Při Soxhletově extrakci bylo použito rozpouštědlo metanolu o koncentraci 50% a 80%. Z každého vzorku se navážilo 0,5 g. Navážka se kvantitativně převedla do Soxhletovy trubice, do lahvičky se odměřilo 40 ml rozpouštědla metanolu a navážka v trubici se převrstvila 10 ml rozpouštědla metanolu. Samotná extrakce probíhala ve dvou

30 minutových cyklech při teplotě 150 °C. Po té se vzorky zfiltrovaly a kvantitativně převedly do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplnily po rysku metanolem. Po té bylo odebráno automatickou pipetou 1 ml takto připraveného vzorku do vialky pro analýzu na chromatografu.

#### **9.4 Stanovení obsahu polyfenolických sloučenin**

Stanovení proběhlo na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu HP 1200 na reverzní fázi. Pro separaci byla využita kolona Zorbax Porscell EC 18 o rozměrech 3.0x50 mm a velikosti částic 2,7 µm (Agilent Technologies, USA). Pro separaci byl použit lineární gradient o složení mobilní fáze metanol (A) a 0,2% kyselina octová (v/v) (B), při průtoku 0,6 ml/min. Lineární gradient v čase: 0 min 85 % složky (B) do 0,17 min 85 % složky (B); v čase 0,51 min 75 % složky (B); v čase 1,70 min 70 % složky (B) do 4 min; v čase 6 min návrat na 85 % složky (B).

Jednotlivé látky byly identifikovány v trojitém kvadrupólu, který pracoval v ESI v negativním modu. Teplota sušícího plynu byla 300 °C, průtok sušícího plynu 12 l/min, nebulizační tlak 45 psi, teplota zaostřovacího plynu 250 °C, průtok zaostřovacího plynu 11 l/min, napětí na kapiláře 3500 V.

## 10 VÝSLEDKY

Pro separaci polyfenolických látek ve vybraných vzorcích sypaných bylinných čajů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie propojená s DAD detektorem a hmotnostním detektorem typu trojitý kvadrupól. Ve stanovovaných vzorcích byly analyzovány tyto polyfenolické sloučeniny: kyselina gallová, protokatechová, *p*-hydroxybenzoová, chlorogenová, vanilová, kávová, syringová, *p*-kumarová, salicylová, ferulová, sinapová, deriváty kyseliny benzoové a skořicové 3,4-dihydroxybenzaldehyd a vanilin. Retenční časy, přechody, fragmentace a kolizní energie analyzovaných látek jsou uvedeny v tabulce č. 2

**Tab. 2** Přehled retenčních časů, přechodů, fragmentací a kolizních energií stanovovaných látek

tr [min]	Sloučenina	Přechod [V]	Fragmentace [V]	Kolizní energie
0,64	kyselina gallová	169→125	100	10
1,05	kyselina protokatechová	153→109	100	10
1,48	3,4-dihydroxybenzaldehyd	137→108	120	20
1,75	kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	137→93	100	10
2	kyselina chlorogenová	353→191	100	10
2,39	kyselina vanilová	167→152	100	20
2,27	<i>p</i> -hydroxybenzaldehyd	121→92	120	10
2,43	kyselina kávová	179→135	100	10
2,77	kyselina syringová	197→182	100	10
2,86	vanilin	151→136	100	10
3,36	kyselina <i>p</i> -kumarová	163→119	100	10
3,84	kyselina ferulová	193→134	100	10
3,82	kyselina salicylová	137→93	100	10
4,05	kyselina sinapová	223→208	100	10

## 10.1 KALIBRACE

Před analýzou vybraných fenolových kyselin a jejich derivátů byla udělána kalibrace na koncentraci těchto látek. Pro kalibrace byla vybrána metoda přímého stanovení. Rozpětí koncentrací bylo od 0,2 do 5 ng/ml. Parametry provedených kalibrací jsou zaznamenány v tabulce č. 3.

*Tab. 3 Parametry pro kvantitativní HPLC-MS/MS analýzu (n=3) v MRM modu*

Sloučenina [ng/ml]	Kalibrační rovnice [ng/ml]	R2	LOD	LOQ
kyselina gallová	$y = 3135,647x - 36,405$	0,9999	0,34	1,02
kyselina protocatechová	$y = 8139,601x - 195,621$	0,9999	0,23	0,69
3,4-dihydroxybenzaldehyd	$y = 2346,704x - 2,823$	0,9982	0,08	0,24
Kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	$y = 16089,319x - 213,725$	0,9999	0,45	1,35
kyselina chlorogenová	$y = 4643,531x - 109,358$	0,9940	0,22	0,66
kyselina vanilová	$y = 3113,317x + 13,799$	0,9992	0,28	0,84
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyd	$y = 8240,279x + 385,310$	0,9971	0,25	0,75
kyselina kávová	$y = 6975,404x - 158,357$	0,9920	0,23	0,69
kyselina syringová	$y = 1236,169x + 35,623$	0,9962	0,21	0,63
vanilin	$y = 13236,850x + 65,638$	0,9984	0,43	1,29
kyselina <i>p</i> -kumarová	$y = 11118,755x - 293,445$	0,9999	0,53	1,59
kyselina ferulová	$y = 1881,317x - 83,309$	0,9961	0,30	0,90
kyselina salicylová	$y = 42852,142x - 2422,165$	0,9981	0,45	1,35
kyselina sinapová	$y = 1086,551x - 19,476$	0,9989	0,16	0,48

### Statistická analýza dat

Výsledky měření byly statisticky vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) s následným Tukeyovým testem (STATISTICA ver. 10). Počet opakování (*n*) uvedených v tabulkách označuje počet individuálních bylin proměřovaných na každou extrakční metodu. Pro zajištění reprodukovatelnosti byly provedeny dvě nezávislá opakování experimentu.

## 11 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

**Tab. 4** Extrakční techniky pro bylinu šalvěj

EXTRAKČNÍ TECHNIKY				
organická kyselina	Třepačka (30°C)	Soxhlet (50%)	Třepačka (50°C)	Soxhlet (80%)
3,4- dihydroxybenzaldehyd	9,313 ± 0,594 d	17,788 ± 0,735 c	42,571 ± 2,041 a	36,081 ± 1,790 b
kyselina kávová	66,279 ± 1,988 c	186,399 ± 4,124 a	60,557 ± 2,098c	92,131 ± 3,266 b
kyselina chlorogenová	2,714 ± 0,082 c	4,652 ± 0,125 b	37,141 ± 0,869 a	2,613 ± 0,080 c
kyselina ferulová	47,581 ± 2,190 a	46,536 ± 1,155 a	20,207 ± 1,052 c	26,887 ± 1,150 b
kyselina gallová	1,422 ± 0,082 b	2,156 ± 0,082 a	1,440 ± 0,056 b	1,425 ± 0,080 b
kyselina <i>p</i> -kumarová	12,302 ± 0,572 b	14,869 ± 0,572 a	8,592 ± 0,327 c	8,391 ± 0,407 c
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyd	0,793 ± 0,028 b	0,928 ± 0,021 a	0,932 ± 0,028 a	0,889 ± 0,019 b
kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	9,051 ± 0,490 b	10,649 ± 0,408 a	7,330 ± 0,245 c	6,165 ± 0,327 c
kyselina protokatechová	7,152 ± 0,327 c	12,035 ± 0,812 ab	13,447 ± 0,572 a	11,969 ± 0,490 b
kyselina salicylová	11,370 ± 0,654 ab	12,933 ± 0,535 a	14,135 ± 0,860 a	13,438 ± 0,605 a
kyselina sinapová	2,682 ± 0,082 b	2,671 ± 0,163 b	3,389 ± 0,163 a	n.d
kyselina syringová	9,582 ± 0,490 a	9,266 ± 0,327 a	2,825 ± 0,082 b	1,329 ± 0,051 c
kyselina vanilová	19,127 ± 0,816 b	22,393 ± 1,225 a	5,771 ± 0,245 c	5,638 ± 0,245 c
vanilin	9,170 ± 0,571 b	11,490 ± 0,735 a	6,464 ± 0,327 c	5,446 ± 0,245 c

Data jsou vyjádřena v průměrných hodnotách v  $\mu\text{g/g}$  sušené hmoty  $\pm s_x$ . Hodnoty v řádcích následované stejnými písmeny, se signifikantně neliší dle Tukeyova testu ( $P < 0,05$ ). Počet opakování  $n = 3$ .

V tabulce č. 4 z uvedených hodnot polyfenolických kyselin pro bylinu šalvěj vidíme, že nejvyšší hodnoty dosáhla kyselina kávová 186,399  $\mu\text{g/g}$  a to při použití Soxhletovy extrakční metody s koncentrací rozpouštědla metanolu 50%. Vyšší množství bylo naměřeno i u kyseliny 3,4-dihydroxybenzaldehyd s průměrnou hodnotou 42,571  $\mu\text{g/g}$  za použití extrakční techniky třepačky při 50 °C a u kyseliny ferulové s hodnotami 47,581  $\mu\text{g/g}$  a 46,536  $\mu\text{g/g}$  při použití extrakce na třepačce za teploty 30 °C a Soxhletovy extrakce v rozpouštědle metanolu o koncentraci 50%. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo při extrakční metodě Soxhletovy extrakce v rozpouštědle metanolu o koncentraci 50%.



**Tab. 5** Extrakční techniky pro bylinu kopřivu

EXTRAKČNÍ TECHNIKY				
organická kyselina	Třepačka (30 °C)	Soxhlet (50%)	Třepačka (50 °C)	Soxhlet (80%)
3,4-dihydroxybenzaldehyd	10,834 ± 0,689 d	16,671 ± 0,898 c	40,519 ± 1,405 a	36,840 ± 1,263 b
kyselina kávová	101,236 ± 1,547 d	445 ± 2,021 b	158,654 ± 0,857 c	565,123 ± 1,633 a
kyselina chlorogenová	365,372 ± 33,309 d	953,620 ± 38,282 b	498,541 ± 167,805 c	1111,231 ± 180,261 a
kyselina ferulová	30,408 ± 1,138 b	37,428 ± 1,358 a	24,428 ± 1,523 c	25,439 ± 1,225 c
kyselina gallová	7,952 ± 0,327 a	7,236 ± 0,327 a	1,455 ± 0,086 c	4,733 ± 0,163 b
kyselina <i>p</i> -kumarová	23,926 ± 1,061 d	43,643 ± 2,039 b	31,418 ± 1,025 c	48,964 ± 2,582 a
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyd	1,911 ± 0,088 c	3,887 ± 0,127 a	1,853 ± 0,081 c	2,960 ± 0,081 b
kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	12,879 ± 0,653 a	14,550 ± 0,653 a	8,742 ± 0,408 b	9,342 ± 0,572 b
kyselina protocatechová	22,395 ± 1,223 a	21,301 ± 1,441 a	23,596 ± 0,981 a	25,027 ± 1,225 a
kyselina salicylová	7,522 ± 0,327 c	11,285 ± 0,245 a	10,250 ± 0,492 b	10,664 ± 0,327 ab
kyselina sinapová	n.d	n.d	n.d	3,041 ± 0,163 a
kyselina syringová	1,688 ± 0,076 b	4,791 ± 0,163 a	n.d	1,525 ± 0,082 b
kyselina vanilová	8,179 ± 0,327 c	45,145 ± 2,754 b	2,536 ± 0,082 d	90,812 ± 0,163 a
vanilin	2,313 ± 0,082 d	3,034 ± 0,163 c	4,965 ± 0,163 a	3,611 ± 0,163 b

Data jsou vyjádřena v průměrných hodnotách v µg/g sušené hmoty ± s<sub>x</sub>. Hodnoty v řádcích následované stejnými písmeny, se signifikantně neliší dle Tukeyova testu (P < 0,05). Počet opakování *n* = 3.

Z tabulky č. 5 je vidět, že v bylině kopřivě bylo naměřeno vysoké množství kyseliny chlorogenové 1111,231  $\mu\text{g/g}$ . Tohoto množství bylo dosaženo Soxhletovou extrakcí v rozpouštědle metanolu o koncentraci 80%. Druhou nejvíce zastoupenou kyselinou je kyselina kávová, která zde byla identifikována v množství 565,123  $\mu\text{g/g}$ . Tohoto množství bylo rovněž dosaženo Soxhletovou extrakcí s koncentrací rozpouštědla metanolu 80%. Vyšší množství bylo také identifikováno u kyseliny vanilové 90,812  $\mu\text{g/g}$  při Soxhletově extrakci obsahující rozpouštědlo metanol o koncentraci 80%. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo při Soxhletově extrakci v rozpouštědle metanolu o koncentraci 50%.

**Tab. 6** Extrakční techniky pro bylinu jitrocel

EXTRAKČNÍ TECHNIKY				
organická kyselina	Třepačka (30 °C)	Soxhlet (50%)	Třepačka (50 °C)	Soxhlet (80%)
3,4- dihydroxybenzaldehyd	3,588 ± 0,205 c	5,331 ± 0,163 b	11,633 ± 0,455 a	12,140 ± 0,573 a
kyselina kávová	17,366 ± 0,694 d	59,466 ± 1,764 a	14,744 ± 0,616 b	17,031 ± 0,735 c
kyselina chlorogenová	302,634 ± 7,229 d	2081,646 ± 43,396 a	640,408 ± 16,649 b	530,097 ± 8,849 c
kyselina ferulová	24,625 ± 1,280 a	15,149 ± 0,653 b	12,307 ± 0,572 c	15,784 ± 0,490 b
kyselina gallová	1,402 ± 0,082 b	5,255 ± 0,163 a	1,393 ± 0,082 b	1,626 ± 0,084 b
kyselina <i>p</i> -kumarová	18,739 ± 1,023 a	13,629 ± 0,735 b	9,024 ± 0,408 c	9,531 ± 0,245 c
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyd	2,105 ± 0,084 a	0,806 ± 0,021 c	1,841 ± 0,063 b	1,727 ± 0,079 b
kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	4,925 ± 0,163 a	4,210 ± 0,163 b	3,917 ± 0,163 bd	3,920 ± 0,163 bcd
kyselina protokatechová	5,861 ± 0,163 d	12,351 ± 0,572 a	8,422 ± 0,490 b	7,952 ± 0,245 bc
kyselina salicylová	6,124 ± 0,245 c	9,568 ± 0,490 a	5,871 ± 0,327 b	6,595 ± 0,245 b
kyselina sinapová	n.d	n.d	2,697 ± 0,082 a	n.d
kyselina syringová	12,319 ± 0,735 a	4,411 ± 0,237 b	n.d	1,753 ± 0,047 c
kyselina vanilová	123,939 ± 6,428 a	6,069 ± 0,245 d	42,543 ± 1,531 c	54,339 ± 1,592 b
vanilin	5,127 ± 0,245 b	8,924 ± 0,245 a	4,033 ± 0,245 c	3,394 ± 0,245 cd

Data jsou vyjádřena v průměrných hodnotách v µg/g sušené hmoty ± s<sub>x</sub>. Hodnoty v řádcích následované stejnými písmeny, se signifikantně neliší dle Tukeyova testu (P < 0,05). Počet opakování *n* = 3.

V tabulce č. 6 v bylině jitrocel vykazovala nejvyšší množství kyselina chlorogenová 2081,466 µg/g při Soxhletově extrakci v rozpouštědle metanolu o koncentraci 50%. Druhou nejvíce zastoupenou kyselinou je kyselina vanilová 123,939 µg/g při použití třepačky za teploty 30 °C. Vyšší množství bylo identifikováno i u kyseliny kávové 59,466 µg/g při Soxhletově extrakci v rozpouštědle metanolu o koncentraci 50%. Naopak nejnižší hodnoty byly naměřeny u kyseliny *p*-hydroxybenzaldehyd, které se ve všech extrakčních technikách pohybovaly v rozmezí od 0,806-2,105 µg/g. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo při použití Soxhletovy extrakce v rozpouštědle metanolu o koncentraci 50% a při použití třepačky za teploty 30 °C.

**Tab. 7** Extrakční techniky v bylině dobromysl

EXTRAKČNÍ TECHNIKY				
organická kyselina	Třepačka (30 °C)	Soxhlet (50%)	Třepačka (50 °C)	Soxhlet (80%)
3,4-dihydroxybenzaldehyd	30,804 ± 1,027 d	44,537 ± 1,921 c	148,752 ± 5,710 a	85,173 ± 1,807 b
kyselina kávová	264,074 ± 5,996 c	356,023 ± 7,284 a	299,535 ± 9,927 b	148,236 ± 8,185 d
kyselina chlorogenová	203,711 ± 7,675 d	384,760 ± 13,272 c	639,412 ± 15,399 a	496,192 ± 12,670 b
kyselina ferulová	12,423 ± 0,468 a	12,482 ± 0,287 a	9,156 ± 0,327 b	8,313 ± 0,245 b
kyselina gallová	13,153 ± 0,408 b	19,969 ± 0,776 a	5,475 ± 0,163 c	14,382 ± 0,439 b
kyselina <i>p</i> -kumarová	16,248 ± 0,898 a	18,303 ± 0,863 a	12,841 ± 0,490 b	17,262 ± 0,765 a
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyd	5,524 ± 0,247 c	6,804 ± 0,245 b	7,517 ± 0,327 a	6,711 ± 0,163 ab
kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	35,436 ± 1,675 b	45,389 ± 2,264 a	30,448 ± 1,313 b	21,479 ± 1,089 c
kyselina protokatechová	135,992 ± 4,213 c	194,100 ± 8,456 b	290,030 ± 8,550 a	143,754 ± 5,091 c
kyselina salicylová	11,327 ± 0,490 c	20,650 ± 1,191 ab	17,625 ± 1,232 b	20,012 ± 0,860 a
kyselina sinapová	n.d	2,909 ± 0,128 a	n.d	2,986 ± 0,082 a
kyselina syringová	12,885 ± 0,572 b	8,785 ± 0,408 c	16,226 ± 0,823 a	7,682 ± 0,408 c
kyselina vanilová	14,637 ± 0,653 a	15,224 ± 0,572 a	3,653 ± 0,163 b	3,705 ± 0,082 b
vanilin	3,601 ± 0,163 b	2,203 ± 0,082 d	2,916 ± 0,082 c	4,703 ± 0,163 a

Data jsou vyjádřena v průměrných hodnotách v µg/g sušené hmoty ± s<sub>x</sub>. Hodnoty v řádcích následované stejnými písmeny, se signifikantně neliší dle Tukeyova testu (P < 0,05). Počet opakování *n* = 3.

V tabulce č. 7 v bylině dobromysl bylo identifikováno nejvyšší množství kyseliny chlorogenové 639,12 µg/g při použití třepačky za teploty 50 °C. Druhou nejvíce obsaženou kyselinou je kyselina kávová 356,023 µg/g při využití Soxhletovy extrakce v rozpouštědle metanolu o koncentraci 50%. Vyšší množství bylo naměřeno také u kyseliny protokatechové 290,030 µg/g při použití třepačky za teploty 50 °C a u kyseliny 3,4-dihydroxybenzaldehyd 148,752 µg/g také při extrakci na třepačce za teploty 50 °C. Nejúčinnější extrakční technikou zde byla Soxhletova extrakce s koncentrací rozpouštědla metanolu 50%.

**Tab. 8** Extrakční techniky pro bylinu mateřídoušku

EXTRAKČNÍ TECHNIKY				
organická kyselina	Třepačka (30 °C)	Soxhlet (50%)	Třepačka (50 °C)	Soxhlet (80%)
3,4- dihydroxybenzaldehyd	20,424 ± 0,818 d	34,564 ± 2,325 c	97,419 ± 2,449 a	80,119 ± 2,653 b
kyselina kávová	241,736 ± 5,547 b	412,205 ± 8,454 a	219,996 ± 7,171 bc	260,020 ± 8,318 b
kyselina chlorogenová	117,121 ± 3,071 b	71,643 ± 4,775 c	219,937 ± 8,929 a	208,176 ± 9,692 a
kyselina ferulová	21,480 ± 1,242 b	30,720 ± 1,337 a	13,044 ± 0,821 c	15,684 ± 0,572 c
kyselina gallová	25,303 ± 0,531 a	19,204 ± 0,658 b	1,952 ± 0,082 c	21,415 ± 1,143 b
kyselina <i>p</i> -kumarová	19,998 ± 0,898 b	30,701 ± 1,061 a	16,458 ± 0,819 c	17,394 ± 0,735 c
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyd	2,532 ± 0,150 a	1,617 ± 0,074 b	0,868 ± 0,025 d	1,235 ± 0,072 c
kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	15,918 ± 0,408 b	18,266 ± 0,878 a	11,277 ± 0,735 c	10,810 ± 0,408 c
kyselina protokatechová	20,445 ± 1,088 b	24,482 ± 1,061 b	32,813 ± 0,987 a	35,289 ± 1,777 a
kyselina salicylová	16,351 ± 0,835 c	22,508 ± 1,218 b	23,470 ± 1,174 ab	25,499 ± 0,944 a
kyselina sinapová	2,957 ± 0,164 b	3,731 ± 0,245 a	n.d	3,174 ± 0,156 b
kyselina syringová	21,284 ± 1,174 b	30,918 ± 1,147 a	7,291 ± 0,327 d	11,047 ± 0,653 c
kyselina vanilová	6,796 ± 0,162 b	13,649 ± 0,411 a	2,214 ± 0,082 c	2,703 ± 0,082 c
vanilin	2,753 ± 0,082 c	4,731 ± 0,163 a	2,825 ± 0,086 c	4,155 ± 0,245 b

Data jsou vyjádřena v průměrných hodnotách v  $\mu\text{g/g}$  sušené hmoty  $\pm s_x$ . Hodnoty v řádcích následované stejnými písmeny, se signifikantně neliší dle Tukeyova testu ( $P < 0,05$ ). Počet opakování  $n = 3$ .

V tabulce č. 8 vidíme, že v bylině mateřídoušce má největší zastoupení kyselina kávová 412,205 µg/g při Soxhletově extrakci v rozpouštědle metanolu s koncentrací 50%. Druhou nejvíce zastoupenou kyselinou je kyselina chlorogenová v množství 219,937 µg/g při extrakci na třepačce za teploty 50 °C. Výrazně vyšší množství bylo naměřeno i u kyseliny 3,4-dihydroxybenzaldehyd 97,419 µg/g při využití třepačky za teploty 50 °C. Nejúčinnější extrakční technikou zde byla Soxhletova extrakce v rozpouštědle metanolu o koncentraci 50%.



**Tab. 9** Extrakční techniky pro bylinu smetánku

EXTRAKČNÍ TECHNIKY				
organická kyselina	Třepačka (30 °C)	Soxhlet (50%)	Třepačka (50 °C)	Soxhlet (80%)
3,4- dihydroxybenzaldehyd	26,001 ± 0,898 c	37,586 ± 1,872 b	88,156 ± 4,749 a	81,281 ± 1,641 a
kyselina kávová	494,119 ± 10,272 b	588,153 ± 28,139 a	299,921 ± 11,967 d	365,267 ± 9,187 c
kyselina chlorogenová	826,895 ± 17,252 c	1156,407 ± 27,001 b	1580,354 ± 89,760 a	1637,351 ± 92,021 a
kyselina ferulová	21,497 ± 1,164 b	27,162 ± 1,225 a	12,829 ± 0,408 c	5,881 ± 0,163 d
kyselina gallová	7,469 ± 0,163 a	6,362 ± 0,245 b	6,059 ± 0,245 b	6,468 ± 0,327 b
kyselina <i>p</i> -kumarová	85,129 ± 3,868 a	86,591 ± 2,748 a	62,597 ± 2,197 b	54,701 ± 2,181 b
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyd	1,311 ± 0,072 b	1,353 ± 0,085 b	1,695 ± 0,086 a	1,852 ± 0,091 a
kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	10,768 ± 0,490 a	11,842 ± 0,287 a	7,635 ± 0,245 b	9,772 ± 0,327 a
kyselina protokatechová	28,541 ± 1,051 c	33,136 ± 1,173 b	42,247 ± 1,862 a	39,573 ± 2,952 ab
kyselina salicylová	9,063 ± 0,408 b	10,236 ± 0,408 b	10,682 ± 0,408 b	15,739 ± 0,898 a
kyselina sinapová	2,367 ± 0,163 b	n.d	2,744 ± 0,163 a	n.d
kyselina syringová	4,954 ± 0,163 b	8,562 ± 0,490 a	0,749 ± 0,016 d	2,036 ± 0,125 c
kyselina vanilová	5,478 ± 0,205 b	6,857 ± 0,163 a	1,228 ± 0,082 d	2,156 ± 0,047 c
vanilin	2,523 ± 0,073 b	3,035 ± 0,082 a	2,139 ± 0,080 c	1,977 ± 0,082 c

Data jsou vyjádřena v průměrných hodnotách v  $\mu\text{g/g}$  sušené hmoty  $\pm s_x$ . Hodnoty v řádcích následované stejnými písmeny, se signifikantně neliší dle Tukeyova testu ( $P < 0,05$ ). Počet opakování  $n = 3$ .

V tabulce č. 9 pro bylinu smetánku je možné pozorovat, že největší zastoupení má kyselina chlorogenová s hodnotami 1637,351  $\mu\text{g/g}$  a 1580,354  $\mu\text{g/g}$  při použití Soxhletovy extrakce s koncentrací rozpouštědla metanolu 80% a extrakce na třepačce při teplotě 50 °C. Druhou nejvíce zastoupenou kyselinou je kyselina kávová v množství 588,153  $\mu\text{g/g}$  při použití Soxhletovy extrakce v rozpouštědle metanolu o koncentraci 50%. Vyšší množství zaujímá i kyselina 3,4-dihydroxybenzaldehyd s hodnotami 88,156  $\mu\text{g/g}$  a 81,281  $\mu\text{g/g}$  při použití extrakce na třepačce za teploty 50 °C a Soxhletovy extrakce v rozpouštědle metanolu o koncentraci 80%. Vyšší množství bylo identifikováno i u kyseliny *p*-kumarové s hodnotami 86,591  $\mu\text{g/g}$  a 85,129  $\mu\text{g/g}$  při použití Soxhletovy extrakce s koncentrací rozpouštědla metanolu 50% a třepačky za teploty 30 °C. Nejúčinnější extrakční technikou zde byla Soxhletova extrakce s koncentrací rozpouštědla metanolu 50%.

**Tab. 10** Extrakční techniky pro bylinu stevii

EXTRAKČNÍ TECHNIKY				
organická kyselina	Třepačka (30 °C)	Soxhlet (50%)	Třepačka (50 °C)	Soxhlet (80%)
3,4 dihydroxybenzaldehyd	17,961 ± 0,616 d	30,666 ± 0,947 c	70,292 ± 3,266 a	58,339 ± 2,008 b
kyselina kávová	237,665 ± 6,222 b	320,005 ± 6,716 a	169,977 ± 7,118 d	216,909 ± 4,899 c
kyselina chlorogenová	7620,917 ± 162,168 c	8098,765 ± 163,537 c	15452,469 ± 343,580 b	17313,355 ± 359,963 a
kyselina ferulová	9,041 ± 0,450 b	12,830 ± 0,327 a	7,133 ± 0,245 c	7,077 ± 0,327 c
kyselina gallová	4,833 ± 0,165 c	11,964 ± 0,653 b	11,286 ± 0,653 b	45,639 ± 1,378 a
kyselina p-kumarová	16,269 ± 0,408 b	23,167 ± 1,306 a	10,031 ± 0,408 d	12,557 ± 0,594 c
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyd	1,005 ± 0,035 c	1,616 ± 0,066 b	2,152 ± 0,082 a	2,166 ± 0,082 a
kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	12,118 ± 0,717 a	12,416 ± 0,327 a	8,129 ± 0,490 b	8,550 ± 0,245 b
kyselina protokatechová	80,814 ± 2,065 d	96,170 ± 3,583 c	146,124 ± 2,953 b	170,329 ± 8,112 a
kyselina salicylová	13,881 ± 0,572 b	15,642 ± 1,001 ab	16,468 ± 1,135 ab	18,091 ± 0,780 a
kyselina sinapová	n.d	2,301 ± 0,082 a	n.d	n.d
kyselina syringová	1,075 ± 0,054 a	n.d	n.d	0,661 ± 0,032 b
kyselina vanilová	3,994 ± 0,082 b	6,216 ± 0,327 a	1,317 ± 0,054 d	3,053 ± 0,163 c
vanilin	6,605 ± 0,327 a	4,421 ± 0,245 b	3,521 ± 0,081 c	5,067 ± 0,163 b

Data jsou vyjádřena v průměrných hodnotách v µg/g sušené hmoty ± s<sub>x</sub>. Hodnoty v řádcích následované stejnými písmeny, se signifikantně neliší dle Tukeyova testu (P < 0,05). Počet opakování *n* = 3.

V tabulce č. 10 pro bylinu stevii vidíme, že nejvyšší zastoupení má kyselina chlorogenová 17313,355  $\mu\text{g/g}$  při Soxhletově extrakci s koncentrací rozpouštědla 80%. Druhou nejvíce obsaženou kyselinou je kyselina kávová 320,005  $\mu\text{g/g}$  při využití Soxhletovy extrakce s koncentrací rozpouštědla 50%. Výšší množství bylo identifikováno i u kyseliny protokatechové 170,329  $\mu\text{g/g}$  rovněž při použití Soxhletovy extrakce s koncentrací rozpouštědla 80% a u kyseliny 3,4- dihydroxybenzaldehyd 70,292  $\mu\text{g/g}$  při extrakci na třepačce za teploty 50 °C. Nejúčinnější extrakční technikou zde byla Soxhletova extrakce s koncentrací rozpouštědla metanolu 50%.

**Tab. 11** Extrakční techniky pro bylinu čekanku

EXTRAKČNÍ TECHNIKY				
organická kyselina	Třepačka (30 °C)	Soxhlet (50%)	Třepačka (50 °C)	Soxhlet (80%)
3,4- dihydroxybenzaldehyd	4,719 ± 0,125 c	6,053 ± 0,245 c	23,299 ± 1,371 b	30,778 ± 1,440 a
kyselina kávová	39,506 ± 1,187 b	68,623 ± 1,530 a	37,615 ± 1,177 b	64,531 ± 1,697 a
kyselina chlorogenová	1357,738 ± 28,196 d	1976,109 ± 40,280 c	2936,351 ± 129,289 b	3748,641 ± 116,342 a
kyselina ferulová	12,033 ± 0,488 a	11,581 ± 0,490 ab	13,192 ± 0,735 a	9,954 ± 0,245 b
kyselina gallová	3,822 ± 0,080 b	3,398 ± 0,082 b	2,433 ± 0,082 c	5,592 ± 0,245 a
kyselina <i>p</i> -kumarová	10,410 ± 0,368 b	11,641 ± 0,326 a	5,625 ± 0,205 c	10,627 ± 0,487 ab
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyd	0,563 ± 0,017 c	0,763 ± 0,018 b	0,756 ± 0,035 b	1,517 ± 0,087 a
kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	3,649 ± 0,135 b	4,008 ± 0,082 ab	3,829 ± 0,082 ab	4,369 ± 0,163 a
kyselina protocatechová	9,618 ± 0,490 c	12,862 ± 0,408 b	14,853 ± 0,735 b	32,303 ± 1,743 a
kyselina salicylová	7,739 ± 0,163 c	8,471 ± 0,327 c	10,137 ± 0,245 b	12,154 ± 0,408 a
kyselina sinapová	n.d	2,415 ± 0,125 a	n.d	n.d
kyselina syringová	3,425 ± 0,124 a	1,398 ± 0,082 b	0,708 ± 0,016 c	1,228 ± 0,081 b
kyselina vanilová	4,576 ± 0,163 a	3,925 ± 0,082 b	0,629 ± 0,023 d	1,246 ± 0,082 c
vanilin	8,284 ± 0,408 a	4,029 ± 0,163 c	4,301 ± 0,163 c	6,195 ± 0,245 b

Data jsou vyjádřena v průměrných hodnotách v µg/g sušené hmoty ± s<sub>x</sub>. Hodnoty v řádcích následované stejnými písmeny, se signifikantně neliší dle Tukeyova testu (P < 0,05). Počet opakování *n* = 3.

V tabulce č. 11 pro bylinu čekanku vidíme, že největší zastoupení má kyselina chlorogenová 3748,641  $\mu\text{g/g}$  při Soxhletově extrakci s koncentrací rozpouštědla metanolu 80%. Vyšší množství bylo identifikováno také u kyseliny kávové s hodnotami 68,623  $\mu\text{g/g}$  a 64,531  $\mu\text{g/g}$  při Soxhletově extrakci s koncentrací rozpouštědla metanolu 50% a 80%. Nejúčinnější extrakční technikou je zde Soxhletova extrakce s koncentrací rozpouštědla metanolu 80%.

## 12 DISKUZE

Bylinkové a zelené čaje jsou jedny z nejvíce spotřebovávaných nápoju ve světě. Obsahují polyfenolické sloučeniny a to zejména flavonoidy a fenolické kyseliny (Dulce *et al.*, 2011). Polyfenolické kyseliny tvoří komplexní skupinu látek, která si v posledních letech získala pozornost díky svým biologickým účinkům. Bylo prokázáno, že polyfenolické kyseliny působí jako antioxidanty a vykazují protizánětlivé a protinádorové účinky. Dále mají schopnost vychytávat volné radikály a působí preventivně před kardiovaskulárním onemocněním (Sanli *et al.*, 2005). Pro stanovení polyfenolických kyselin existuje celá řada různých analytických metod jako je plynová chromatografie, kapalinová chromatografie a spektrofotometrické metody (Dulce *et al.*, 2011). V této práci byla zvolena kapalinová chromatografie propojená s detektorem diodového pole (DAD) a hmotnostním detektorem typu trojitý kvadrupól.

U šalvěže, která je jednou ze zkoumaných bylin v této práci, měla z naměřených a statisticky zpracovaných hodnot největší zastoupení kyselina kávová v množství 186,399  $\mu\text{g/g}$  sušené hmoty. Této hodnoty bylo dosaženo při použití extrakční techniky třepačky za teploty 50 °C. Další významné množství bylo identifikováno u kyseliny ferulové s hodnotami 47,581  $\mu\text{g/g}$  a 46,536  $\mu\text{g/g}$  při extrakci na třepačce za teploty 30 °C a při Soxhletově extrakci s koncentrací rozpouštědla metanolu 50%. Ze studie podle (Farhat *et al.*, 2013) kteří stanovovali obsah polyfenolických kyselin ve 4 různých druzích šalvěže, byl největší obsah kyseliny kávové naměřen u druhu *Salvia officinalis* v množství 695,04  $\mu\text{g/g}$  sušené hmoty při Soxhletově extrakci v rozpouštědle metanolu. Nejvyšší množství kyseliny ferulové 703,29  $\mu\text{g/g}$  bylo naměřeno také u druhu *Salvia officinalis* při Soxhletově extrakci v rozpouštědle metanolu. Mezi dalšími druhy šalvěže vybraných pro analýzu byla *Salvia argentea*, *Salvia aegyptiaca* a *Salvia verbenaca*. Z této studie vyplývá, že obsah polyfenolických kyselin závisí i na druhu a místě sběru bylin. Což je možný důvod rozdílných hodnot u těchto kyselin ve srovnání s naší prací. U druhu *Salvia aegyptiaca* byl např. obsah kyseliny kávové naměřen 117,64  $\mu\text{g/g}$ . U druhu *Salvia officinalis* činil obsah kyseliny kávové ve vzorku získaného z oblasti kolem města Kelibia (Tuniská oblast) 695,04  $\mu\text{g/g}$  a u vzorku získaného ze stejného druhu z oblasti kolem města Sers (Tuniská oblast) jen 222,24  $\mu\text{g/g}$ .

U byliny kopřivy byla naměřena nejvyšší hodnota u kyseliny chlorogenové 1111,231  $\mu\text{g/g}$  při Soxhletově extrakci s koncentrací rozpouštědla 80%. Významné množství vykazuje i kyselina vanilová 90,812  $\mu\text{g/g}$  při Soxhletově extrakci s

koncentrací rozpouštědla 80%, kyselina kávová 565,123 µg/g při Soxhletově extrakci s koncentrací rozpouštědla 80%. Podle studie (Orčić *et al.*, 2014) byla u kopřivy kyselina chlorogenová identifikovaná v množství 570 µg/g, kyselina kávová v množství 360 µg/g a kyselina vanilová identifikována nebyla. Z výsledků vidíme, že obsah kyseliny chlorogenové byl v naší práci ve srovnání se studií více jak dvojnásobně vyšší. Vyšší hodnoty byly i u kyseliny kávové a vanilové, která ve studii dokonce ve vzorku této byliny identifikována nebyla. Rozdílný obsah těchto kyselin by mohl být dán použitím různé extrakční techniky. Kdy ve studii byla použita extrakce na třepačce v rozpouštědle metanolu o koncentraci 80% po dobu 48 hodin při pokojové teplotě a v naší práci jsme nejvyšších hodnot dosáhli použitím Soxhletovy extrakce s koncentrací rozpouštědla metanolu 80%. Nícméně rozdílný obsah těchto hodnot ve srovnání se studií může být v rozdílnosti původu vzorku. Ve studii vzorky pro analýzu pocházejí z oblasti Srbska, kdežto vzorky v této práci pocházejí z oblasti ČR.

U byliny jitrocel byla detekována v nejvyšším množství kyselina chlorogenová 2081,466 µg/g a to při využití Soxhletovy extrakce v rozpouštědle metanolu o koncentraci 50%. Významné množství zaujímá i kyselina vanilová 123,939 µg/g při použití třepačky za teploty 30 °C a kyselina kávová v množství 59,466 µg/g při Soxhletově extrakci s koncentrací rozpouštědla metanolu 50%. Ve studii podle (Beara *et al.*, 2012) byla kyselina chlorogenová v jitroceli detekována v množství 5549,10 µg/g. Dále kyselina vanilová zde byla naměřena v množství 343,87 µg/g a kyselina kávová byla identifikována v množství 121,70 µg/g. Na první pohled je vidět významný rozdíl mezi naměřenými výsledky kyseliny chlorogenové, kdy ve studii je hodnota více jak dvojnásobně vyšší. Totéž lze pozorovat i u kyseliny kávové. U kyseliny vanilové je detekováno dokonce trojnásobně vyšší množství oproti zjištěné hodnotě v naší práci. Rozdílnost výsledků může být dána použitím různých druhů vzorků jitrocele. My jsme v této práci použili druh *Plantago lanceolata* a ve studii použili druh *Plantago altissima*.

V bylině dobromysl byla druhou nejvíce zastoupenou kyselinou kyselina kávová v množství 356,023 µg/g při použití Soxhletovy extrakce v rozpouštědle metanolu o koncentraci 50%. Podle studie (Hossain *et al.*, 2011) se kyselina kávová v dobromysli pohybovala v rozmezí 140-640 µg/g. Těchto hodnot bylo dosaženo extrakcí urychleným tokem rozpouštědla (ASE). Optimální podmínky ASE extrakce byly u této byliny zjištěny při použití rozpouštědla metanolu o koncentraci 33% za teploty 129 °C. Po té byla teplota postupně zvednuta na 150 °C, 175 °C a 200 °C. Pro srovnání se



provedla i konvenční extrakce pevné látky rozpouštědlem. Nejvyšší výtěžnosti u kyseliny kávové bylo dosaženo u ASE extrakce při 175 °C a 200 °C s hodnotami 630 a 640 µg/g. Nejnižší hodnota kyseliny kávové 140 µg/g byla naměřena u konvenční extrakce. Pozoruhodné bylo i množství kyseliny gallové, které se pohybovalo v rozmezí 483-1491 µg/g. V této práci bylo identifikováno množství kyseliny gallové ve všech čtyřech extrakčních technikách v rozmezí hodnot od 5,475-19,969 µg/g. To je zřejmě dáno právě použitím rozdílné extrakční techniky. Oproti Soxhletově extrakci a třepačce je extrakce urychleným tokem rozpouštědla znatelně účinnější.

U mateřídoušky byla nejvíce zastoupenou kyselinou kyselina kávová v množství 412,205 µg/g sušené hmoty. Této hodnoty bylo dosaženo při Soxhletově extrakci s koncentrací rozpouštědla metanolu 50%. Druhou nejvíce zastoupenou kyselinou je kyselina chlorogenová v množství 219,937 µg/g při extrakci na třepačce za teploty 50 °C. Podle studie (Fecká a Turek, 2008) se v mateřídoušce množství kyseliny kávové pohybovalo v množství 480 µg/g sušené hmoty. Kyselina kávová účinně chrání biologické systémy proti různým oxidačním stresům a to tím, že inhibuje tvorbu superoxidového aniontu v xanthin oxidázovém systému. Stanovené množství této kyseliny je přibližně srovnatelné se stanoveným množstvím v této práci. Ze studie podle (Kaliora *et al.*, 2014) byla kyselina chlorogenová v bylině mateřídoušce naměřena v množství 137 µg/g. Ze studie podle (Kaliora *et al.*, 2014) je rovněž potvrzena výrazná pozitivní korelace mezi obsahem kyseliny chlorogenové a antiradikálové aktivity.

U smetánky ze studie podle (Gil *et al.*, 2011) jsou hlavními polyfenolickými komponenty kyselina kávová, kyselina chlorogenová a luteolin-7-glukosid. V této práci bylo právě u této byliny ze 14 stanovovaných polyfenolických kyselin naměřeno nejvyšší množství kyseliny chlorogenové s hodnotami 1580,354 µg/g a 1637,351 µg/g při použití extrakce na třepačce za teploty 50 °C a Soxhletovy extrakce s koncentrací rozpouštědla 80% a u kyseliny kávové v množství 588,153 µg/g při použití Soxhletovy extrakce v rozpouštědle metanolu o koncentraci 50%.

U byliny čekanky byla nejvíce zastoupenou kyselinou kyselina chlorogenová 3748,641 µg/g. Tohoto množství bylo dosaženo Soxhletovou extrakcí s koncentrací rozpouštědla metanolu 80%. Ve studii podle (Heimler *et al.*, 2009) byla kyselina chlorogenová zjištěna v množství 1020 µg/g. Tento rozdílný obsah může být dán použitím různých extrakčních rozpouštědel. Ve studii podle (Heimler *et al.*, 2009) se vzorek extrahoval 70 % roztokem rozpouštědla etanolu. A my jsme v této práci použili 80 % roztok metanolu.

U stevie bylo nejvyšší množství zaznamenáno u kyseliny chlorogenové 17313,355 µg/g při Soxhletově extrakci s koncentrací rozpouštědla metanolu 80%. Vyšší množství bylo zaznamenáno i u kyseliny kávové 320,005 µg/g při Soxhletově extrakci o koncentraci rozpouštědla metanolu 80%. Ve studii podle (Fu *et al.*, 2000) bylo potvrzeno, že v listech byliny stevie se nachází vysoké množství kyseliny chlorogenové. V této studii byla tato kyselina detekována v množství 22 500 µg/g. V této práci jsme v listech stevie také naměřili výrazně vysoké množství.

Ve studii podle (Muanda *et al.*, 2011) bylo potvrzeno, že fenolické sloučeniny se nejlépe extrahují ve směsi vodného roztoku a alkoholu metanolu. My jsme v této práci zvolili také směs vodného roztoku a metanolu o koncentraci 50% a 80%.

### 13 ZÁVĚR

Bylinné čaje patří ve světě mezi nejrozšířenější konzumované nápoje. Všeobecné je známo, že bylinné čaje vykazují spoustu účinků, které blahodárně působí na lidský organismus. Mezi tyto účinky patří antioxidační, protizánětlivé, antimikrobiální, protirakovinové, protistárnoucí vlastnosti. Působí také preventivně před onemocněním jater a nervového systému. Tímto mohou snižovat riziko chronických onemocnění. Bylinné čaje obsahují polyfenolické sloučeniny. Polyfenolické sloučeniny vykazují spoustu vlastností, které mají pozitivní vliv na lidský organismus z nichž nejvýznamnější je antioxidační účinek. Ten je pro organismus člověka velmi důležitý, protože v těle se tvoří volné radikály, které jsou přirozeným meziproduktem při látkové výměně v buňkách. A právě množství těchto volných radikálů je nutné regulovat pomocí antioxidantů. Dostatečné množství antioxidantů přijímané potravou, napomáhá snižovat riziko srdečně cévních onemocnění a některých typů rakoviny. Účinnost přirozených antioxidantů přijímaných z ovoce, zeleniny, čajů a celozrnných obilovin, je ve srovnání se stejnou dávkou čistých látek užívaných ve formě potravinových doplňků výrazně vyšší. V této práci z velké skupiny polyfenolických sloučenin byly pro stanovení vybrány polyfenolické kyseliny. Mezi 14 vybranými standardy pro analýzu to byly konkrétně kyseliny gallová, protokatechová, chlorogenová, kávová, sinapová, syringová, vanilová, *p*-kumarová, ferulová, *p*-hydroxybenzoová, salicylová, *p*-hydroxybenzaldehyd, 3,4-dihydroxybenzaldehyd a vanilin. Pro extrakci vzorků bylin byla použita Soxhletova extrakce s koncentrací rozpouštědla 50% a 80% a extrakce na třepačce při teplotě 30 °C a 50 °C. Samotné stanovení polyfenolických kyselin v extraktech proběhlo za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie propojené s detektorem diodového pole (DAD) a hmotnostním detektorem typu trojitý kvadrupól. Z naměřených a statisticky zpracovaných dat podle ANOVA a post-hoc Tukey HSD testu  $P < 0,05$  byla ve všech vzorcích bylin kromě mateřídoušky a šalvěže nejvíce zastoupena kyselina chlorogenová. U byliny kopřivy byla identifikována v množství 1111,231  $\mu\text{g/g}$  při Soxhletově extrakci s koncentrací rozpouštědla metanolu 80%. U byliny jitrocel byla tato kyselina detekována v množství 2081,466  $\mu\text{g/g}$  při Soxhletově extrakci v rozpouštědle metanolu o koncentraci 50%. U byliny dobromysl činilo množství této kyseliny 639,12  $\mu\text{g/g}$  při použití extrakce na třepačce při teplotě 50 °C. U smetánky bylo dosaženo hodnot 1580,354  $\mu\text{g/g}$  a 1637,351  $\mu\text{g/g}$  při použití extrakce na třepačce při 50 °C a Soxhletovy extrakce s koncentrací rozpouštědla metanolu 80%. U

stevie dosáhla hodnota této kyseliny dokonce 17313,355 µg/g a to při Soxhletově extrakci s koncentrací rozpouštědla 80%. No a v čekance byl obsah kyseliny chlorogenové naměřen v množství 3748,641 µg/g rovněž při použití Soxhletovy extrakce s koncentrací rozpouštědla 80%. U byliny mateřídoušky a šalvěje byla nejvíce zastoupena kyselina kávová. U šalvěje byla obsažena v množství 186,399 µg/g při Soxhletově extrakci s koncentrací rozpouštědla 50%. U mateřídoušky byla tato kyselina identifikována v množství 412,205 µg/g při Soxhletově extrakci s koncentrací rozpouštědla metanolu 50%.

Ve srovnání se studii jsme v této práci zjistili, že obsah polyfenolických kyselin v jednotlivých bylinách závisí na druhu byliny, na geografickém původu daného vzorku a také na použití extrakční techniky, kdy důležitou roli hraje zvolené rozpouštědlo a jeho koncentrace. Bylo zjištěno, že nejvhodnějším rozpouštědlem pro extrakci polyfenolických kyselin je vodný roztok metanolu. My jsme v této práci jako rozpouštědlo zvolili také vodný roztok metanolu o koncentraci 50% a 80%. V této práci se zdála být neúčinnější Soxhletova extrakce s koncentrací rozpouštědla 50%, ale tyto výsledky však nejsou potvrzeny.

## 14 SEZNAM LITERATURY

ADAM, V. *Pokročilé izolační, separační a detekční postupy v bioanalytické chemii*. Brno, 2011. 293 s. Habilitační práce Mendelova univerzita

BEARA, I., N., LESJAK, M., M., ORČIC, D., Z., SIMIN, N., D. ČETOJEVIC-SIMIN, D., D., BOŽIN, B., N, MIMICA-DUKIC, N., M. Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. *LWT - Food Science and Technology*. [online]. 2012, vol. 47 issue 1, s. 64-70, [cit. 2012-01-08]. doi:10.1016/j.lwt.2012.01.001

BELITZ H. D., GROSCH W., SCHIEBERLE P., 2009: Tea and Tea-Like Products. Food Chemistry. Springer-Verlag. Berlin. ISBN 978-3-540-69933-0

BIESAGA, Magdalena. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A* [online].2011, vol. 1218, issue 18, s. 2505-2512 [cit. 2015-02-26]. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.02.059.

BORKOVCOVÁ, I.,KOSTRHUNOVÁ,R. 2013: *Extrakční metody*, Databáze online [cit. 2013-11-25]. Dostupné z: <http://www.vfu.cz/>

BRUNI, Oliviero, Daniel ALONSO-ALCONADA, Frank BESAG, Valerie BIRAN, Wiebe BRAAM, Samuele CORTESE, Romina MOAVERO, Pasquale PARISI, Marcel SMITS, Kristiaan Van der HEIJDEN a Paolo CURATOLO. Current role of melatonin in pediatric neurology: Clinical recommendations. *European Journal of Paediatric Neurology* [online]. 2015, vol. 19, issue 2, s. 122-133 [cit. 2015-02-26]. DOI: 10.1016/j.ejpn.2014.12.007.

CASTRO, M.D. Luque de a F. PRIEGO-CAPOTE. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A* [online].2010, vol. 1217, issue 16, s. 2383-2389 [cit. 2015-02-26]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.027.

DING, Mingzhen a Jiankai ZOU. Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic–mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils.*Food Chemistry* [online]. 2012, vol. 131, issue 3, s. 1051-1055 [cit. 2015-02-26]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.09.100.

GIL, Dulce M.A., Pedro L.V. FALÉ, Maria L.M. SERRALHEIRO a Maria J.F. REBELO. Herbal infusions bioelectrochemical polyphenolic index: Green tea – The gallic acid interference. *Food Chemistry* [online]. 2011, vol. 129, issue 4, s. 1537-1543 [cit. 2015-04-22]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.06.003.

FARHAT, M., B., LANDOULSI, A., CHAOUCH-HAMADA, R., SOTOMAYOR, J., A., JORDÁN, M., J. Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia species* growing in different habitats. [online]. 2013, vol. 49, s. 904-914, [cit. 2013-06-26].

FECKA, I., TUREK, S. Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*. [online]. 2008, vol. 108, issue 3, [cit. 2007-11-23]. doi:10.1016/j.foodchem.2007.11.035

FRANZISKA VON, A. *Domáci recepty proti nemocem: nejlepší recepty z babiččiny lékarničky*. Praha: Ikar, 2000. 319 s. ISBN 80-7202-617-8

FU, Xiao, Zhong-Ping YIN, Ji-Guang CHEN, Xin-Chen SHANGGUAN, Xiaoqiang WANG, Qing-Feng ZHANG a Da-Yong PENG. Production of Chlorogenic Acid and Its Derivatives in Hairy Root Cultures of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2015, vol. 63, issue 1, s. 262-268 [cit. 2015-04-22]. DOI: 10.1021/jf504176r.

GIL, D., M., D., FALÉ, L., V., P., SERRALHEIRO, M., L., M., REBELO, M., J., F. Herbal infusions bioelectrochemical polyphenolic index: Green tea-The gallic acid interference. *Food Chemistry*. [online]. 2011, vol. 129, issue 4, s. 1537-1543, [cit. 2011-06-16]. doi:10.1016/j.foodchem.2011.06.003

GÓRNICKÁ, J. *Léčivé síly ze zahrádky*. Praha: Vašut, 2014. 160 s. ISBN978-80-7236-828-0

GUO, Yuan-Jin, Tao LUO, Fei WU, Yuan-Wu MEI, Jun PENG, Huan LIU, Hua-Rong LI, Shu-Ling ZHANG, Ji-Hua DONG, Yuan FANG a Lei ZHAO. Involvement of TLR2 and TLR9 in the anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in HSV-1-infected microglia. *Life Sciences* [online]. 2015 [cit. 2015-03-06]. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.01.036.

HEIMLER, Daniela, Laura ISOLANI, Pamela VIGNOLINI a Annalisa ROMANI. Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. *Food Chemistry* [online]. 2009, vol. 114, issue 3, s. 765-770 [cit. 2015-04-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.10.010.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460801220X>

HENEMAN, Karrie a Sheri ZIDENBERG-CHERR. Some facts about catechins. In: [ucdavis.edu](http://ucdavis.edu) [online]. Říjen 2008 [cit. 11.2.2013]. Dostupné z: <http://nutrition.ucdavis.edu/content/infosheets/fact-pro-catechin.pdf>

- HIRSCH, S. *Kniha osvědčených bylinkových receptů*. České Budějovice: DONA s.r.o, 2013. 191 s. ISBN 978-3-902540-00-3
- HUBER, Meret, Daniella TRIEBWASSER-FREESE, Michael REICHELT, Sven HEILING, Christian PAETZ, Jima N. CHANDRAN, Stefan BARTRAM, Bernd SCHNEIDER, Jonathan GERSHENZON a Matthias ERB. Identification, quantification, spatiotemporal distribution and genetic variation of major latex secondary metabolites in the common dandelion (*Taraxacum officinale* agg.). *Phytochemistry* [online]. 2015 [cit. 2015-02-26].
- CHOI, Y, E., PARK, E. Ferulic acid in combination with PARP inhibitor sensitizes breast cancer cells as chemotherapeutic strategy. *Biochemical and Biophysical*
- CHEN, Ligang, Haiyan JIN, Lan DING, Huarong ZHANG, Juan LI, Chenling QU a Hanqi ZHANG. Dynamic microwave-assisted extraction of flavonoids from *Herba Epimedii*. *Separation and Purification Technology* [online]. 2008, vol. 59, issue 1, s. 50-57 [cit. 2015-02-26]. DOI: 10.1016/j.seppur.2007.05.025.
- IBURG, A. *Léčivé rostliny od A do Z*. Čestlice: Rebo, 2014. 283 s. ISBN 978-80-255-0832-9
- JAHODÁŘ, L. *Léčivé rostliny v současné medicíně*. Havlíček Brain Team, 2010. 233 s. ISBN 978-80-87109-22-9
- JAROŠOVÁ, M., *Separáčnické metody pro stanovení polyfenolických látek ve vine*. Brno, 2012. 111 s. Diplomová práce Mendelova univerzita
- JEONG, Jin Boo, Se CHUL HONG, Hyung JIN JEONG a Annalisa ROMANI. 3,4-Dihydroxybenzaldehyde purified from the barley seeds (*Hordeum vulgare*) inhibits oxidative DNA damage and apoptosis via its antioxidant activity. *Phytomedicine* [online]. 2009, vol. 16, issue 1, s. 85-94 [cit. 2015-04-08]. DOI: 10.1016/j.phymed.2008.09.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711308001773>
- JIRÁSEK, R. *Rakytník nedoceněný zdroj biologicky aktivních látek*. [online]. [cit. 2011-01-12]. Dostupné z: [edukafarm.cz/soubory/farminews-2011/1/48-farmi01-11\\_rakytnik.pdf](http://edukafarm.cz/soubory/farminews-2011/1/48-farmi01-11_rakytnik.pdf)
- KALÁČ, P. *Funkční potraviny: kroky ke zdraví*. České Budějovice: Dona, 2003, 130 s. ISBN 80-732-2029-6
- KEE, Hae Jin, Soo-Na CHO, Gwi Ran KIM, Sin Young CHOI, Yuhee RYU, In Kyeom KIM, Young Joon HONG, Hyung Wook PARK, Youngkeun AHN, Jeong Gwan CHO, Jong Chun PARK a Myung Ho JEONG. Gallic acid inhibits vascular calcification

through the blockade of BMP2–Smad1/5/8 signaling pathway. *Vascular Pharmacology* [online]. 2014, vol. 63, issue 2, s. 71-78 [cit. 2015-02-26]. DOI: 10.1016/j.vph.2014.08.005.

KENNY, O., T.J. SMYTH, C.M. HEWAGE, N.P. BRUNTON a P. MCLOUGHLIN. 4-Hydroxyphenylacetic acid derivatives of inositol from dandelion (*Taraxacum officinale*) root characterised using LC–SPE–NMR and LC–MS techniques. *Phytochemistry* [online].2014, vol. 98, s. 197-203 [cit. 2015-02-26]. DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.11.022.

KOPŘIVA, V. *Glutathion-aktuální biomolekula*. [online]. [cit. 2011-07-12]. Dostupné z <http://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/GLUTATHION.pdf>

KORBELÁŘ, J., ENDRIS, Z., KREJČA, J. *Naše rostliny v lékařství*. Praha: Albatros, 1973. 439 s

KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

KUMAR, Dharendra, Chunli LI, Jun LI, Yingzhen XU, Shui GUAN a Mingshan ZHAO. Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science* [online]. 2014, vol. 228, issue 1, s. 127-134 [cit. 2015-04-08]. DOI: 10.1016/j.plantsci.2014.04.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016894521400096X>

KYLE, J. *Norton official site, health tips fort better living and living health*. Databáze online [cit.2013-11-10] Dostupné z: <http://kylejnorton.blogspot.ca/2013/11/phytochemicals-14-health-benefits-of.html>

KRÁLOVÁ, B., FUKAL, L., RAUCH, P., RUML, T. *Bioanalytické metody*. Praha: VŠCHT, 2008. 254 S. ISBN 978-807080-449-0

KUMAR, N., PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*. 2014, vol. 4, s 86-93.

KLEJDUS, B. Separace a identifikace isoflavonů v rostlinném materiálu. Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, 2004. 51 s.

LEMUS-MONDACA, Roberto, Antonio VEGA-GÁLVEZ, Liliana ZURA-BRAVO a Kong AH-HEN. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry* [online]. 2012, vol. 132, issue 3, s. 1121-1132 [cit. 2015-02-26]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.140



LE-BAIL, P., C. LORENTZ, G. PENCREAC'H, S. SOULTANI-VIGNERON, B. PONTOIRE, L.J. LÓPEZ GIRALDO, P. VILLENEUVE, J. HENDRICKX a V. TRAN. Trapping by amylose of the aliphatic chain grafted onto chlorogenic acid: Importance of the graft position. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2015, vol. 117, s. 910-916, [cit. 2015-03-06]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.10.029.

LIU, Runzeng, Ting RUAN, Shanjun SONG, Yongfeng LIN a Guibin JIANG. Determination of synthetic phenolic antioxidants and relative metabolites in sewage treatment plant and recipient river by high performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2015, vol. 1381, s. 13-21 [cit. 2015-02-26]. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.11.042.

.Lulia Gabriela DAVID, Ana-Maria Cristina BIZGAN, Dana Elena POPA, Michaela BULEANDRA, Zenovie MOLDOVA, Irinel Adriana BADEA, Tugce Ayca TEKINER, Huveyda BASAGA, Anton A. CIUCU. Rapid determination of total polyphenolic content in tea samples based on caffeic acid voltametric behaviour on a disposable graphite electrode. *Food Chemistry* [online]. 2015, vol. 173, s. 1059-1056 [cit. 2015-04-15]. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.139

MAZAKI, T., et al. In vitro and in vivo enhanced osteogenesis by kaempferol found by a high-throughput assay using human mesenchymal stromal cells. *Journal of Functional Foods*. 2014, vol 6, s 241-247.

MINDELL, Earl a Hester MUNDIS. Nová vitaminová bible: nejnovější informace o vitamínech, minerálních látkách, antioxidantech, léčivých rostlinách, o doplňcích stravy, léčebných účincích potravin i lécích používaných v homeopatii. 2. dopl. přeprac. vyd. Překlad Miloš Máček. Praha: Ikar, 2006, 572 s. ISBN 80-249-0744-5

MOHAMMADI, Fakhrossadat a Marzieh MOEENI. Analysis of binding interaction of genistein and kaempferol with bovine  $\alpha$ -lactalbumin. *Journal of Functional Foods* [online]. 2015, vol. 12, s. 458-467 [cit. 2015-02-28]. DOI: 10.1016/j.jff.2014.12.012.

MUANDA, F., N., SOULIMANI, R., DIOP, B., DICKO, A. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2011, vol. 44, issue 9, s. 1865-1872 [cit. 2015-04-08]. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.12.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643810004160>

- NOVÁKOVÁ, L. 2014: *Moderní trendy v přípravě vzorku k analýze s využitím instrumentálních technik*, Databáze online [cit. 2014-10-03]. Dostupné z <http://www.proglab.cz/>
- NÝDLOVÁ, E., VRBOVÁ, M., ROUŠAR, T. *Glutathione and glutathione-related enzyme system*. [online]. 2014, vol. 17, s. 202-208, [cit. 2014-04-06].
- NATARAJAPILLAI, S., VIJAYAKUMAR, A., ANGAPPAN, M., KARTHIK, G. Syringic acid exerts antiaangiogenic activity by downregulation of VEGF in zebrafish embryos. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. [online]. 2014, vol. 4, issue 2, s. 203-208, [cit. 2014-02-20]. doi:10.1016/j.bionut.2014.01.007
- OH, Jungmin, Heonjoo JO, Ah Reum CHO, Sung-Jin KIM a Jaejoon HAN. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control* [online]. 2013, vol. 31, issue 2, s. 403-409 [cit. 2015-02-26]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.10.021.
- PAZDERA, A. *O vitamínu A a antioxidantech*. [online]. [cit. 2011-05-10] Dostupné z [nutris.net/wp-content/uploads/2011/05/Vitamin-A-a-antioxidanty.doc](http://nutris.net/wp-content/uploads/2011/05/Vitamin-A-a-antioxidanty.doc)
- RACEK, Jaroslav. *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. 1. vyd. Praha: Galén, 2003, 89 s. Repetitorium, sv. 6. ISBN 80-726-2231-5
- RACEK, J., HOLEČEK, V., *Enzymy a volné radikály*. Databáze online [cit. 1997-10-03] Dostupné z [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999\\_12\\_774-780.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_12_774-780.pdf)
- RODRIGUES, J, L., ARAÚJO, R, G., PRATHER, K, L, J., KLUSKENS, L, D. Heterologous production of caffeic acid from tyrosine in Escherichia Coli. *Enzyme and Microbial Technology*. [online]. 2015, vol. 71, s. 36-44 , [cit. 2015-04-06]. doi:10.1016/j.enzmictec.2015.01.001
- ROY, S. J., PRINCE, P, S, M. Protective effects of sinapic acid on lysosomal dysfunction in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2012, vol. 50, s. 3984-3989, [cit. 2012-08-16]. DOI:10.1016/j.fct.2012.08.017
- SAHA, Supradip, Suresh WALIA, Aditi KUNDU, Khushbu SHARMA a Ranjit Kumar PAUL. Optimal extraction and fingerprinting of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* [online]. 2015, vol. 177, s. 369-375 [cit. 2015-02-26]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.01.039.
- SANLI, N., FONRODONA, G., BARBOSA, J., OZKAN, G., A., BELTRAN, J., L. Modelling retention in liquid chromatography of polyphenolics acids: Prediction of

solvent composition and pH of the mobile phase. *Analytica Chimica Acta*. [online]. 2005, vol. 537, issues 1-2, s. 53-61, [cit. 2005-02-04]. doi:10.1016/j.aca.2005.01.006

SARJIT, Amreeta, Yi WANG a Gary A. DYKES. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. *Food Microbiology* [online]. 2015, vol. 46, s. 227-233 [cit. 2015-02-26]. DOI: 10.1016/j.fm.2014.08.002.

SHAHIDI, F., NACZK, M. *Phenolics in food and nutraceuticals*. Boca Raton: CRC Press, 2004, ISBN 1-58716-138-9

SIMONSOHNOVÁ, B. *Stévie Přírodní alternativa cukru*. Praha: Euromedia Group, k.s-Ikar, 2013. 240s. ISBN 978-80-249-2127-3

SLANINA, Jiří a Eva TÁBORSKÁ. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2004, roč. 98, č. 5, s. 239-245. ISSN 0009-2770

STUMPFŮVÁ, U. *Naše léčivé rostliny*. Praha: Ikar, 2013. 255 s. ISBN 978-80-249-22072

STRATIL, P. *Fenolové látky v poživatinách a metody stanovení jejich antioxidační aktivity*. Brno, 2007. Habilitační práce, Mendelova univerzita

SWISLOCKA, R., PIEKUT, J., LEWANDOWSKI, W. The relationship between molecular structure and biological activity of alkali metal salts of vanillic acid: Spectroscopic, theoretical and microbiological studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. [online]. 2013, vol. 100, s. 31-40, [cit. 2013-06-13]

ŠONKA, K. *Úloha melatoninu u cirkadiálních poruch*. [online]. [cit. 2008-02-01]. Dostupné z [www.edukafarm.cz](http://www.edukafarm.cz)

TRNA, J., TÁBORSKÁ, E. *Přírodní polyfenolické antioxidanty* [online]. [cit. 2011-11-11]. Dostupné z WWW: <<http://bit.ly/H1pReR>>.

VACEK, J., KLEJDUS, B., LOJKOVÁ, L., KUBÁN, V. Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review. *Journal of separation Science*. 2008, vol. 31, 2054-2067 s.

VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3.1*. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 342 s. ISBN 80-902-39129

VELÍŠEK, J. HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin 1*. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. 580 s. ISBN 978-80-86659-15-2

VRBOVÁ, T. *Víme, co jíme?: aneb: průvodce "Ečky" v potravinách*. Praha: Eco-House, 2001, 268 s. ISBN 80-238-7504-3

- WANG, Lijun a Curtis L. WELLER. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2006, vol. 17, issue 6, s. 300-312 [cit. 2015-02-26]. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.12.004.
- WATSON, Ronald R. *Melatonin in the promotion of health*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, 2012, xvii, 566 p. ISBN 978-1-4398-3980-5.
- WENZEL, M. *Léčivé rostliny*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2014. 240 s. ISBN 978-80-247-5155-9
- WILDOVÁ, O. *Melatonin- spánkový hormon*. In: *medicína. cz* [online]. [cit. 2012-11-12]. Dostupné z:  
[http://www.medicina.cz/verejne/clanek.dss?s\\_id=8914&s\\_ts=40652,0742708333](http://www.medicina.cz/verejne/clanek.dss?s_id=8914&s_ts=40652,0742708333)
- ZHANG, X., LI, CH., JIN JEONG, H., XU, A. 3,4-Dihydroxybenzaldehyde purified from the barley seeds (*Hordeum vulgare*) inhibits oxidative DNA damage and apoptosis via its antioxidant activity. *International Immunopharmacology* [online]. 2015, vol. 16, issue 1, s. 85-94 [cit. 2015-04-08]. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.03.031.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711308001773>
- ZITKA, O., SOCHOR, J., ROP, O., SKALICKOVA, S., SOBROVA, P., ZEHNALÉK, J., BEKLOVA, M., KRŠKA, B., ADAM, V., KIZEK, R. Comparison of Various Easy-to-Use Procedures for Extraction of Phenols from Apricot Fruits. *Molecules* [online]. 2011, vol. 16, issue 12, s. 2914-2936 [cit. 2015-04-08]. DOI: 10.3390/molecules16042914. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/4/2914/>

## 15 SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1</b>	<i>2-terc.butyl-4-hydroxyanisol (Velíšek a Hajšlová, 2009)</i> .....	16
<b>Obrázek 2</b>	<i>Vazebná místa pro kovy v molekulách flavonoidů</i> .....	18
<b>Obrázek 3</b>	<i>Oxidačně redukční reakce polyfenolů s volnými radikály</i> .....	18
<b>Obrázek 4</b>	<i>Zástupci flavonoidů (Trna a Táborská, 2011)</i> .....	19
<b>Obrázek 5</b>	<i>Kvercetin (Trna a Táborská, 2011)</i> .....	20
<b>Obrázek 6</b>	<i>Kempferol (Trna a Táborská, 2011)</i> .....	21
<b>Obrázek 7</b>	<i>Katechin (Trna a Táborská, 2011)</i> .....	22
<b>Obrázek 8</b>	<i>Kyselina gallová (Stratil, 2007)</i> .....	24
<b>Obrázek 9</b>	<i>Kyselina chlorogenová (Trna a Táborská, 2011)</i> .....	24
<b>Obrázek 10</b>	<i>Kyselina kávová (David et al., 2015)</i> .....	25
<b>Obrázek 11</b>	<i>Kyselina ferulová (Trna a Táborská, 2011)</i> .....	25
<b>Obrázek 12</b>	<i>Kyselina sinapová (Roy a Prince, 2012)</i> .....	25
<b>Obrázek 13</b>	<i>Kyselina vanilová (Sindhu et al., 2015)</i> .....	26
<b>Obrázek 14</b>	<i>Kyselina syringová (Karthik et al., 2014)</i> .....	26
<b>Obrázek 15</b>	<i>Kyselina p-kumarová (Zitka et al., 2011)</i> .....	27
<b>Obrázek 16</b>	<i>vanilin (Zitka et al., 2011)</i> .....	27
<b>Obrázek 17</b>	<i>Kyselina protokatechová (Zhang et al., 2015)</i> .....	27
<b>Obrázek 18</b>	<i>3,4- dihydroxybenzaldehyd (Jeong et al., 2009)</i> .....	28
<b>Obrázek 19</b>	<i>kyselina salicylová (Kumar et al., 2014)</i> .....	28
<b>Obrázek 20</b>	<i>Stevia (Simonsohnová, 2013)</i> .....	35
<b>Obrázek 21</b>	<i>Kopřiva dvoudomá (Korbelář et al., 1973)</i> .....	36
<b>Obrázek 22</b>	<i>Šalvěj (Korbelář et al., 1973)</i> .....	36
<b>Obrázek 23</b>	<i>Smetánka lékařská (Korbelář et al., 1973)</i> .....	37
<b>Obrázek 24</b>	<i>Dobromysl (Korbelář et al., 1973)</i> .....	38
<b>Obrázek 25</b>	<i>Mateřídouška (Korbelář et al., 1973)</i> .....	39
<b>Obrázek 26</b>	<i>Čekanka (Korbelář et al., 1973)</i> .....	39
<b>Obrázek 27</b>	<i>Jitrocel (Korbelář et al., 1973)</i> .....	40

## 16 SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1</i> Popis vzorků pro analýzu .....	42
<i>Tab. 2</i> Přehled retenčních časů, přechodů, fragmentací a kolizních energií stanovovaných látek .....	45
<i>Tab. 3</i> Parametry pro kvantitativní HPLC-MS/MS analýzu (n=3) v MRM modu .....	46
<i>Tab. 4</i> Extrakční techniky pro bylinu šalvěj .....	47
<i>Tab. 5</i> Extrakční techniky pro bylinu kopřivu .....	49
<i>Tab. 6</i> Extrakční techniky pro bylinu jitrocel .....	51
<i>Tab. 7</i> Extrakční techniky pro bylinu dobromysl .....	53
<i>Tab. 8</i> Extrakční techniky pro bylinu mateřídoušku .....	55
<i>Tab. 9</i> Extrakční techniky pro bylinu smetánku .....	57
<i>Tab. 10</i> Extrakční techniky pro bylinu stevii .....	59
<i>Tab. 11</i> Extrakční techniky pro bylinu čekanku .....	61

## **17 SEZNAM ZKRATEK**

DNA- deoxyribonukleová kyselina

GSH- redukovaná forma glutathionu (thiol)

GSSH- oxidovaná forma glutathionu (disulfid)

GSSG- dimer glutathiondisulfid

BHT- butylhydroxytoluen

BHA- butylhydroxyanisol

TBQH- butylhydrochinon

BHT-CHO- 3,5-di-terc-butyl-4-hydroxybenzaldehyd

BHT- chinolin- 2,6-di terc-butyl-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyklohexadienon

LDL- nízkodenzitní lipoprotein

HPLC- vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ACE- extrakce urychleným tokem rozpouštědla