

Hodnocení antioxidačních parametrů vybraných léčivých rostlin

Adéla Bagová

Bakalářská práce
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav chemie

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Adéla Bagová
Osobní číslo: T20327
Studijní program: B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin
Specializace: Chemie a analýza potravin
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Hodnocení antioxidačních parametrů vybraných léčivých rostlin

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

Charakteristika vybraných léčivých rostlin, jejich složení a vlastnosti.

Popis antioxidantů a metod vhodných pro stanovení antioxidačních vlastností.

II. Praktická část

Zhodnocení antioxidačních parametrů (obsah celkových polyfenolů, antioxidační aktivita) stanovených spektrofotometricky u extraktů vybraných léčivých rostlin.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. Danila, A. O., Gatea, F., Radu, G.L. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs. Chem. Nat. Comp. 2011, 47, 1, 22-26. doi.org/10.1007/s10600-011-9822-7.
2. Velíšek, Jan. Chemie potravin 3. Tábor: OSSIS, 1999, 342 s. ISBN 80-902-3912-9.
3. Janča, J., Zentrich, J.A. Herbář léčivých rostlin. Praha: EMINENT, 1994. ISBN 80-85876-02-7.
4. Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. Screening of 70 Medicinal Plant Extracts for Antioxidant Capacity and Total Phenols. Food Chemistry, 94, 2006, 550-557. dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Soňa Škrovánková, Ph.D.**
Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Michal Rouchal, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 28. února 2023

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užit své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Bakalářská práce se v teoretické části zabývá charakteristikou vybraných léčivých rostlin, jejich chemickým složením, antioxidační aktivitou a využitím. Dále je uveden popis metod stanovení antioxidační aktivity a celkového obsahu polyfenolů. Praktická část je zaměřena na zjištění antioxidační aktivity vodných extraktů léčivých rostlin (meduňka, saturejka, heřmánek, lípa, pelyněk a kopřiva), připravených při dvou teplotách, pomocí dvou spektrofotometrických metod (ABTS a DPPH) a určením hodnoty IC_{50} . Také byl stanoven celkový obsah polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla.

Klíčová slova: léčivé rostliny, antioxidační aktivita, DPPH, ABTS, polyfenoly

ABSTRACT

The theoretical part of the bachelor's thesis deals with the characteristics of selected medicinal plants, their chemical composition, antioxidant activity and utility. Methods used for determining antioxidant activity and the content of polyphenols are also described. The practical part is focused on determining the antioxidant activity of aqueous extracts of medicinal plants (lemon balm, sage, chamomile, linden, wormwood and nettle), which were prepared at two temperatures by two spectrophotometric methods (ABTS and DPPH) and the IC_{50} values. The total content of polyphenols was determined using Folin-Ciocalteu reagent.

Keywords: medicinal plants, antioxidant activity, DPPH, ABTS, polyphenols

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce Ing. Soni Škrovánkové, Ph.D. za velkou trpělivost a ochotu při zpracování této závěrečné práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 LÉČIVÉ ROSTLINY	11
1.1 HEŘMÁNEK PRAVÝ	11
1.1.1 Chemické složení	12
1.1.2 Antioxidační aktivita	12
1.1.3 Využití.....	13
1.2 MEDUŇKA LÉKAŘSKÁ	14
1.2.1 Chemické složení	14
1.2.2 Antioxidační aktivita	15
1.2.3 Využití.....	15
1.3 SATUREJKA ZAHRADNÍ	15
1.3.1 Chemické složení	16
1.3.2 Antioxidační aktivita	17
1.3.3 Využití.....	17
1.4 LÍPA OBECNÁ.....	17
1.4.1 Chemické složení	18
1.4.2 Antioxidační aktivita	18
1.4.3 Využití.....	19
1.5 KOPŘIVA DVOUDOMÁ.....	19
1.5.1 Chemické složení	20
1.5.2 Antioxidační aktivita	20
1.5.3 Využití.....	21
1.6 PELYNĚK ČERNOBÝL	21
1.6.1 Chemické složení	22
1.6.2 Antioxidační aktivita	22
1.6.3 Využití.....	23
2 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	24
2.1 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU DPPH.....	24
2.2 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POMOCÍ METODY ABTS.....	25
3 METODY STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU POLYFENOLŮ	27
3.1 STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU POLYFENOLŮ POMOCÍ FOLIN- CIOCALTEUOVOVA ČINIDLA	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
4 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	30
5 MATERIÁL A PŘÍSTROJE	31
5.1 MATERIÁL.....	31

5.2	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	31
5.3	CHEMIKÁLIE.....	32
6	METODIKA STANOVENÍ.....	33
6.1	PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ BYLIN	33
6.2	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POMOCÍ METODY DPPH.....	33
6.2.1	Kalibrační křivka troloxu ke stanovení AA (DPPH)	34
6.2.2	Hodnoty IC ₅₀	35
6.3	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POMOCÍ METODY ABTS.....	35
6.3.1	Kalibrační křivka troloxu ke stanovení AA (ABTS)	36
6.4	STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU POLYFENOLŮ.....	37
6.4.1	Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu polyfenolů	37
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
7.1	HODNOCENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY EXTRAKTŮ STANOVENÉ METODOU S DPPH PŘI RŮZNÝCH TEPLOTÁCH EXTRAKCE	39
7.2	HODNOCENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY EXTRAKTŮ STANOVENÉ METODOU S ABTS PŘI RŮZNÝCH TEPLOTÁCH EXTRAKCE	44
7.3	HODNOCENÍ CELKOVÉHO OBSAHU POLYFENOLŮ EXTRAKTŮ PŘI RŮZNÝCH TEPLOTÁCH	47
7.4	KORELAČNÍ ANALÝZA PRO CELKOVÝ OBSAH POLYFENOLŮ A ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITU.....	49
	ZÁVĚR	51
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	53
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	59
	SEZNAM OBRÁZKŮ	60
	SEZNAM TABULEK.....	61

ÚVOD

Léčivé rostliny a jejich silice obsahují mnoho biologicky aktivních látek, které rostlina potřebuje ke své ochraně a růstu. Tyto sloučeniny jsou z rostlin získávány pomocí extrakce a využívány ve farmaceutickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu. Mnohé léčivé rostliny vykazují antioxidační, antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Antioxidační aktivitu z velké části ovlivňují polyfenolové sloučeniny. Látky s antioxidační aktivitou v lidském těle zabraňují vzniku zánětů a v potravinách jsou schopné zabraňovat oxidačním procesům, které způsobují znehodnocení tuků a tím i potravin.

K významným druhům čeledí, které se řadí mezi léčivé rostliny s antioxidačními účinky, patří čeledi hluchavkovité, hvězdicovité, slézovité a kopřivovité.

Meduňka lékařská (*Melissa officinalis*) a saturejka zahradní (*Satureja hortensis*) patří do čeledě hluchavkovitých, které se vyznačují silicemi s využitím v tradičním léčitelství k přípravě nálevů, odvarů a čajů na podporu léčby astmatu, nachlazení, tlumení bolesti nebo uvolnění od stresu. V kosmetickém průmyslu se využívají jako tonikum. Do čeledi hvězdicovitých patří např. heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*) a pelyněk černobýl (*Artemisia vulgaris*). Květy heřmánku se využívají na podporu léčby nachlazení nebo astmatu, zažívacích a nervových poruch na zmírnění úzkostí, nespavosti, kožních onemocnění. Pelyněk má diuretické, antiseptické a analgetické vlastnosti a v tradiční medicíně se využívá na léčbu revmatismu, astmatu a také se využívá v kosmetickém průmyslu jako tonikum. Listy pelyňku se využívají jako koření na maso a ryby. Zástupcem čeledi slézovitých je lípa obecná (*Tilia vulgaris*). Květy lípy se v tradiční medicíně využívají jako odvary a nálevy na léčbu kašle a nachlazení. Kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*), která patří do čeledi kopřivovitých, je používána na přípravu odvarů. Její extrakty mají diuretický účinek a využívají se na potlačení alergických reakcí a tradiční léčbu revmatismu.

Antioxidanty, které se vyskytují i ve zmíněných rostlinách, jsou schopné reakcí s volnými radikály zabraňovat oxidaci lipidů a díky tomu prodlužovat údržnost potravin. Na stanovení antioxidační aktivity existuje několik metod, které měří schopnost reakčního činidla vychytávat volné radikály (ABTS, DPPH, ORAC, HORAC) nebo schopnost redukovat další sloučeniny (CUPRAC, FRAP). Výsledná reakce se projeví barevnou změnou, která je měřena na spektrofotometru při specifické vlnové délce nebo chromatografickými metodami.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 LÉČIVÉ ROSTLINY

Léčivé rostliny jsou považovány za důležité průmyslové plodiny a jsou pěstovány po celém světě. Mnoho druhů rostlin je používáno už od středověku například jako koření nebo čaj, díky jejich výrazné chuti a vůni. Rostliny obsahují silice, které jsou směsí sekundárních metabolitů a rostlina je využívá jako ochranu před predátory a pro svůj růst. Obsahují silice, které jsou těkavé a mají různorodé složení chemických sloučenin v závislosti na způsobu pěstování a na klimatických podmínkách. Tyto sloučeniny působí synergicky a vykazují antimikrobiální a antioxidační aktivitu a díky tomu dokážou neutralizovat volné radikály. Silice mohou být extrahovány a využívány v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Jsou využívány v tradiční medicíně například na úlevu od bolesti, podpůrnou léčbu pro nachlazení, astmatu, nespavost, na uvolnění od stresu a úzkostí. Díky silné vůni silic se v kosmetickém průmyslu využívají například do parfémů a přírodní kosmetiky. V potravinářském průmyslu se využívá jejich antioxidační aktivity, která může zvyšovat údržnost potravin [1, 2].

Extrakce a její účinnost u rostlinných extraktů závisí na různých faktorech jako je teplota, rozpouštědlo, doba extrakce, rostlinný materiál a další. Aplikace silic je závislá na tom, jaká část rostliny byla použita (květy, listy, stonek) a na způsobu přípravy (inhalace par, odvar, obklad) [3, 4].

1.1 Heřmánek pravý

Heřmánek pravý, latinsky *Matricaria chamomilla*, je jedna z nejznámějších a nejvíce používaných léčivých bylin. Je to jednoletá bylina, která se řadí do čeledi hvězdnicovitých, roste na všech typech půdy a je velice odolná vůči nízkým teplotám. *M. chamomilla* původně pochází z jižní a východní Evropy a severní a západní Asie. Díky vysokému obsahu biologicky aktivních látek, které jsou nejvíce obsažené v květech této byliny, má mnoho benefitů pro člověka. Je známý svými antioxidačními, neuroprotektivními a antimikrobiálními účinky [4, 5].



Obrázek 1: Heřmánek pravý [6]

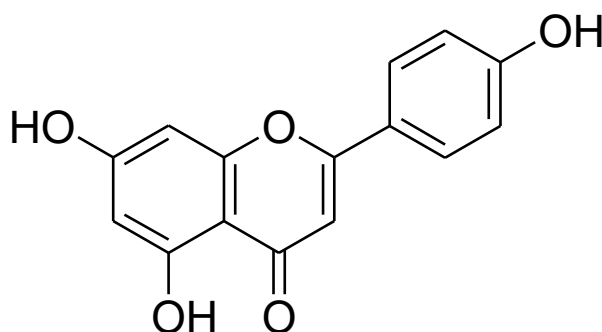
1.1.1 Chemické složení

V květenství heřmánku bylo zjištěno až 120 složek. Je zde mnoho druhů bioaktivních látek, které jsou izolovány a využívány v kosmetice a jako léčivé přípravky. Rostlina obsahuje silice, při její parní destilaci mění barvu od zářivě modré po tmavě zelenou, po skladování se mění na tmavě žlutou. Heřmánek obsahuje flavonoidy, které se řadí do biologicky aktivních látek. Patří mezi ně apigenin, luteolin, patuletin, rutin, kvercetin a jejich deriváty. Apigenin je zde převážně vázaný ve formě různých glykosidů. Hlavními sloučeninami silic z heřmánku jsou terpeny např. α -bisabolol spolu s jeho oxidy a chamazulen, který je příčinou zabarvení silice do modra. Bisabolol a chamazulen jsou nestálé, a proto se často uchovávají v alkoholové tinktuře. Dále jsou zde přítomny fenolické sloučeniny: kumariny, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina vanilinová, kyselina skořicová, kyselina gallová a další. Složení rostliny závisí na jejím původu, v České republice má heřmánek obsahově největší podíl složky α -bisabololu [5, 7, 8].

1.1.2 Antioxidační aktivita

Bylo prokázáno, že farmakologické účinky heřmánku souvisí s fenolickými sloučeninami a zejména flavonoidy. Tyto látky jsou zodpovědné za vysokou antioxidační aktivitu heřmánku. Jedním z těchto flavonoidů je apigenin, který se používá jako doplněk stravy na

podporu spánku, uvolnění od stresu a také jako antioxidant, který dokáže neutralizovat reaktivní formy kyslíku a tím přispívat k prevenci civilizačních chorob. Apigenin je vázán v glykosidech. Tyto glykosidy se často hydrolyzují ještě před extrakcí za účelem získání volného apigeninu, ten má větší biologickou aktivitu. Volný apigenin vykazuje antispasmodický potenciál, a proto se používá na uvolnění křečí. Apigenin je přítomný také v pomerančích, celeru, cibuli, petrželi, tymiánu a oreganu. Na intenzitu antioxidační aktivity má vliv mnoho faktorů. Jedním z nich je teplota, která může ovlivnit obsah polyfenolů v extraktu [5, 9, 10].



Obrázek 2: Vzorec apigeninu

1.1.3 Využití

Vzhledem k vlastnostem heřmánku jsou jeho extrakty velice často používány v tradiční medicíně jak u lidí, tak u živočichů. Aplikace závisí na tom, jaká část rostliny byla použita (květy, listy, stonek) a na způsobu přípravy (inhalace par, odvar, obklad). Účinnost extrakce je dána extrakční metodou, velikostí částic vzorku, použitím rozpouštědla, teplotě a době extrakce. Nejvíce jsou využívány květy, které se používají k extrakci silic, poté listy a celá rostlina. Tradičně se heřmánek využívá na podporu léčby nachlazení nebo astmatu. Květy mohou být využívány k podpůrné léčbě zažívacích a nervových poruch, kožních onemocnění, nespavosti, dále na podporu činnosti mozku nebo také na zmírnění úzkosti [4, 5].

1.2 Meduňka lékařská

Melissa officinalis neboli meduňka lékařská je vytrvalá rostlina, která patří do čeledi hluchavkovité. Meduňka se původně pěstovala především v jižní Evropě, střední Asii a Íránu, dnes se ale běžně vyskytuje po celém světě. Její listy se používají v lidovém léčitelství na trávicí a gastrointestinálních potíže, má protikřečové a diuretické účinky [11].



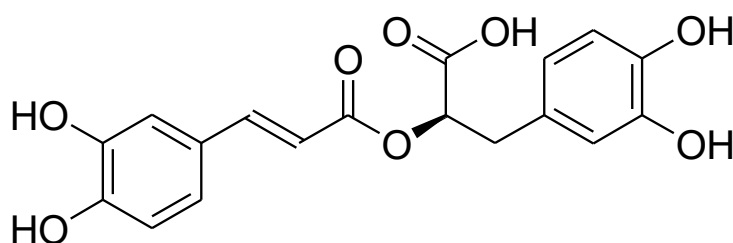
Obrázek 3: Meduňka lékařská [12]

1.2.1 Chemické složení

Listy meduňky obsahují fenolické sloučeniny, mezi které patří flavonoidy jako například luteolin a kvercitrin. Dalšími polyfenolovými sloučeninami jsou kyselina kávová, kyselina rozmarýnová, kyselina protokatechová. Součástí listů jsou také terpeny jako například kyselina ursolová nebo oleanolová, a citral. Podíl silice v rostlině se pohybuje mezi 0,02 - 0,30 %. V silicích, dominuje především citronellal, isogeraniol, geraniolacetát, nerolacetát, karyofylen a karyofylenoxid. Silice z meduňky jsou žluté barvy a mají charakteristickou citronovou vůni. Získávají se destilací vodní párou nebo chemickou extrakcí. Rozdíl mezi silicemi získanými ze sušených nebo čerstvých listů není příliš významný [2, 11].

1.2.2 Antioxidační aktivita

Ve vodných extraktech meduňky jsou vázané formy fenolických sloučenin. Nejvyšší je obsah kyseliny rozmarýnové, která je ve velké míře zodpovědná za antioxidační aktivitu meduňky. Dalšími sloučeninami, které synergicky zvyšují antioxidační aktivitu jsou kvercetin, kyselina gallová a rutin. Silice vykazují vysokou koncentraci fenolických sloučenin, tyto sloučeniny mají antioxidační vlastnosti srovnatelné se syntetickými antioxidanty (BHT a BHA), které by mohly být využity v potravinách obsahující lipidy a blokovat jejich peroxidaci. Mezi sloučeniny, které vykazují silnou antioxidační aktivitu meduňky jsou řazeny kyselina kávová a kyselina rozmarýnová [11, 13].



Obrázek 4: Kyselina rozmarýnová

1.2.3 Využití

Tradičně se využívá pro lékařské účely jako tonikum, lék proti křečím, sedativum a k uvolnění bolesti hlavy vyvolané stresem. Meduňka se často využívá na utlumení úzkostí a depresí, pomáhá proti gastrointestinálním poruchám a nespavosti. Studie prokázaly, že silice mají inhibiční účinek na grampozitivní i gramnegativní bakterie. Vodný extrakt z listů meduňky, který obsahuje kyselinu rozmarýnovou, má navíc i antivirovou aktivitu a dokáže zabránit průchodu viru do hostitelských buněk. Díky silně vonícím listům, a z nich vyrobených silic, se často používá v parfémeh a přírodní kosmetice v podobě hydrosolu. Hydrosol je vodný roztok, který se vyrábí destilací, obsahuje jak rostlinné složky, tak i části silice. Používá se v produktech na péči o pleť nebo jako tonikum [2, 14, 15].

1.3 Saturejka zahradní

Rod *Satureja* se řadí do čeledi hluchavkovité. Mnoho zástupců tohoto rodu roste na Blízkém východě, ve Středomoří, Evropě a západní Asii. Mají aromatický charakter a díky tomu jsou

využívány jako koření. I v tradičním léčitelství mají své zastoupení. Saturejka zahradní a její silice obsahují různé složení bioaktivních látek v závislosti na klimatických a pěstitelských podmínkách [1, 16].



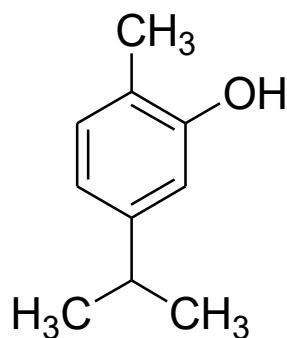
Obrázek 5: Saturejka zahradní [17]

1.3.1 Chemické složení

Složení silice je ovlivněno různými faktory (rozpuštědlem, původem, extrakční metodou a obdobím sklizně). Hlavními složkami silice jsou karvakrol, thymol, karyofylen, β -pinen, α -thujen a α -pinen. Karvakrol byl určen jako hlavní složka silice saturejky (až 91 %). Tato sloučenina má antioxidační, antimikrobiální, protizánětlivé a bolest zmírňující účinky. Pro tyto vlastnosti je karvakrol využíván v kosmetickém, potravinářském a nápojovém průmyslu. Bylo prokázáno, že kvalita silice a obsah karvakrolu při správném skladování (při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) roste. Byly také pozorovány jasné rozdíly ve složení silic při tepelném ošetření. V silicích saturejky, které byly tepelně ošetřené se zvyšuje obsah odolnějších látek, které byly v neošetřené silici detekované pouze v malém množství (sabinen, *cis*- α -bisabolen a karyofylenoxid), ale zároveň klesal obsah méně stabilních látek (γ -terpinen, sabinen). Analýzami byla také prokázána přítomnost kyseliny vanilové, syringové a protokatechové a jejich derivátů (kyselina kávová, kyselina kumarová, katechin a epikatechin). Také byly identifikovány sloučeniny jako kyselina rozmarýnová, apigenin, thymonin a naringenin [1, 18, 19].

1.3.2 Antioxidační aktivita

Sloučeniny schopné antioxidační aktivity mohou reagovat díky přenosu elektronů, aktivací enzymů nebo inhibicí oxidáz neutralizovat kyslík v reaktivní formě. Saturejka obsahuje biologicky aktivní látky, které se podílí na této antioxidační aktivitě. Její složení je velmi variabilní, ale hlavními sloučeninami jsou karvakrol, myrcen, kyselina rozmarýnová a kvercetin. Silice prokázala vyšší antioxidační aktivitu vlivem nárůstu koncentrace karvakrolu, zodpovědného za antioxidační aktivitu. Složení a množství přítomných antioxidantů může být ovlivněno rozpouštědlem, kdy v ethanolovém extraktu je pravděpodobněji vyšší výskyt kyseliny rozmarýnové a kvercetinu a nižší výskyt apigeninu, rutinu, luteolinu [1, 18].



Obrázek 6: Karvakrol

1.3.3 Využití

Byliny rodu saturejka se v lidovém léčitelství využívají k léčbě křečí, bolesti svalů a žaludečním a střevním onemocněním. Tato rostlina má také antioxidační, antimikrobiální, insekticidní a fungicidní vlastnosti. Silice jsou často využívány na výrobu kosmetiky a parfémů. Saturejka se často používá i jako koření, čaj nebo ochucovadlo, její silice připomíná chuť a vůni oregana nebo tymiánu [1, 18, 20].

1.4 Lípa obecná

Rostliny čeledi *Malvaceae*, do které patří lípa obecná (*Tilia × europaea*), rostou převážně na severní polokouli a v mírném pásmu. Lípa malolistá a lípa velkolistá jsou druhy široce rozšířené v Evropě. Tyto druhy se mohou hybridizovat, což vede ke vzniku lípy obecné.

Lipový květ se často používá ve formě nálevu jako lék na léčbu nachlazení, bolesti v krku a kašli [21, 22].



Obrázek 7: Lípa obecná [23]

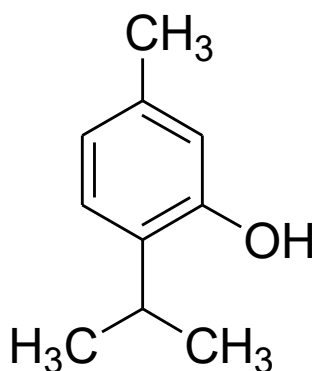
1.4.1 Chemické složení

Složení lipových květů z různých druhů *Tilia* je variabilní. Tyto květy obsahují sliz, který pokryje sliznici hltanu, čímž ulevuje od kašle. Její listy se vyznačují vysokým obsahem manganu a také glykosidem, tiliacinem. V květech jsou také obsaženy polyfenoly, převážně deriváty flavan-3-olu jako je katechin a epikatechin. Z flavonoidů zde byly identifikovány kvercetin a jeho glykosidy, kaempferol a deriváty acacetinu. Obsahuje také fenolové kyseliny (kyselina gallová, protokatechová a chlorogenová). Silice z lipových květů je zodpovědná za sedativní účinek čajů z lipových květů. Lipové listy nejsou velmi významné z hlediska obsahu silice, obsah silice se pohybuje okolo 0,02-0,08 %. Tato silice obsahuje karvon, menthol, linalool, thymol a další sloučeniny. Semena lípy obsahují nenasycené mastné kyseliny, které se synergicky podílí na zvyšování antioxidační aktivity [22, 24, 25, 26].

1.4.2 Antioxidační aktivita

Proměnlivý obsah bioaktivních látek lípy ovlivňuje i biologickou a antioxidační aktivitu. Tato aktivita je důsledkem přítomnosti nenasycených mastných kyselin, a hlavně sloučenin z nezmýdelnitelného podílu rostlin. Byla potvrzena korelace mezi obsahem γ -tokoferolu

a antioxidační aktivitou, tedy, čím vyšší je obsah γ -tokoferolu, tím vyšší je i antioxidační aktivita. Naopak nebyl potvrzen rozdíl při vyšším obsahu fytolu, skvalenu a fytosterolů, které zabraňují oxidaci mastných kyselin [26].



Obrázek 8: Thymol

1.4.3 Využití

Lípa je průmyslově důležitá rostlina. Její semena a silice z nich se využívají v kosmetickém průmyslu. Semena obsahují kyselinu linolovou, která zabraňuje ztrátě vody v pokožce a tím ji pomáhá hydratovat. Fytosteroly působí jako změkčovadla a tokoferoly brání peroxidaci lipidů, což může příznivě působit na pokožku. Lipové květy se využívají v tradičním léčitelství na kašel, nachlazení, horečku a bolest v krku, kdy se užívá ve formě odvaru, nebo nálevu. Dalším příznivým účinkem lipových květů je úleva od stresu a v lidovém léčitelství se využívají pro její sedativní účinky na úzkostné poruchy a poruchy spánku [22, 24, 26].

1.5 Kopřiva dvoudomá

Urtica dioica L., kopřiva dvoudomá, je vytrvalá rostlina, která pochází z Evropy, Asie, severní Afriky a Severní Ameriky. Roste ve vlhkých půdách a její nať a listy mají žahavé účinky. Kořen i listy jsou využívány v lidovém léčitelství při léčbě močových cest, revmatismu a alergických reakcích. Listy, kořeny a semena jsou významné díky svým antioxidačním vlastnostem, díky kterým chrání buněčné membrány před působením kyslíkových radikálů. Má také antimikrobiální vlastnosti [3, 27].



Obrázek 9: Kopřiva dvoudomá [28]

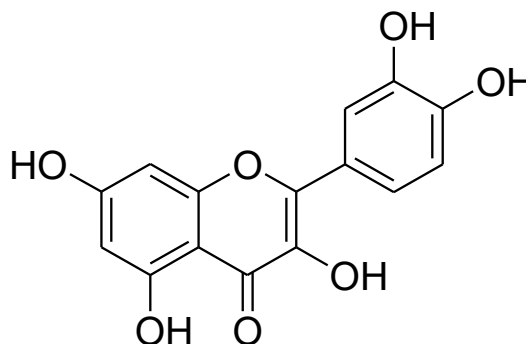
1.5.1 Chemické složení

Tato bylina má vysoký obsah karotenoidů, vitaminů (C, B₂, B₅) a minerálních prvků (vápník, hořčík, fosfor). Listy se vyznačují obsahem organických kyselin, aminy (acetylcholin, betain, histamin, serotonin), karotenoidy, kumariny a flavonoidy. Histamin a serotonin zvyšují citlivost neuronů bolesti a díky tomu způsobují podráždění kůže při dotyku čerstvé kopřivy. Významnou složkou jsou fenolové kyseliny, které jsou přítomné ve vodných extraktech kopřivy. Hlavní mastnou kyselinou v listech je kyselina α -linolenová. V semenech je nejvyšší obsah kyseliny linolové. V kořenu jsou převážně polysacharidy, lektiny a triterpeny. Bylina a její kořeny obsahují také enzymy jako cholinacetyltransferáza, invertáza a polyfenoloxidáza [3, 27].

1.5.2 Antioxidační aktivita

Vychytávání volných radikálů je významnou vlastností *U. dioica*. Vysoký obsah polyfenolů v kopřivě je spjatý s vysokou antioxidační aktivitou. Hlavními složkami kopřivy, které ovlivňují tuto aktivitu jsou kvercetin, rutin a kyselina askorbová. Dalšími sloučeninami, které přispívají k vysoké antioxidační aktivitě jsou kyselina kávová, gallová, skořicová, chlorogenová, naringin a naringenin. Tyto bioaktivní sloučeniny jsou hlavně v listech

kopřivy. Poměr sloučenin se odvíjí od genotypu, klimatu, sklizně a části rostliny. V kořenech je obsah fenolických sloučenin výrazně nižší, převažuje zde kyselina chinová, skopoletin a kyselina *p*-kumarová [27, 29].



Obrázek 10: Kvercetin

1.5.3 Využití

Složení kopřivy je příznivé i z hlediska nutriční hodnoty, díky tomu byla hlavně v minulosti využívána k dochucování, k přípravě polévek. Listy a výhonky jsou velmi dobrým zdrojem polysacharidů, vitaminů, vitamínu C, železa, draslíku, manganu. Vodné extrakty mají antimikrobiální účinky, hlavně proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím a některým kvasinkám. Extrakty z kopřivy jsou využívány pro potlačení alergických reakcí, kdy dochází k inhibici enzymů nebo mediátorů, které způsobují danou alergickou reakci. Výtažky z listů se využívají na tradiční léčbu revmatismu, potlačení bolesti a mají také diuretický účinek [27].

1.6 Pelyněk černobýl

Artemisia vulgaris, pelyněk černobýl, se řadí do čeledi hvězdčovitě. Je to vytrvalá aromatická bylina, která roste v Kanadě, Africe, Spojených státech amerických a v Evropě. Využívá se v tradiční medicíně na žaludeční vředy, uvolnění od úzkostí a stresu. Má protizánětlivé, antibakteriální a antiseptické vlastnosti. Obsahuje biologicky aktivní složky, které mají antioxidační vlastnosti [30].



Obrázek 11: Pelyněk černobýl [31]

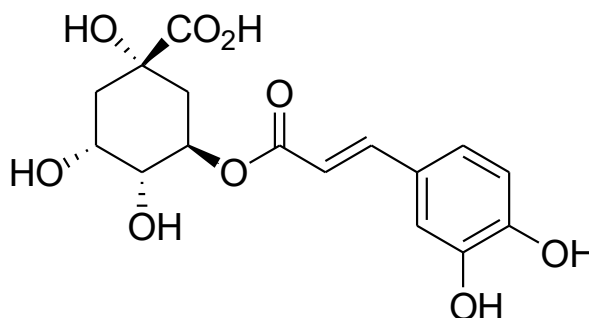
1.6.1 Chemické složení

Hlavními složkami silic jsou monoterpeny, kafr, α -thujon a β -thujon, 1,8 cineol, a seskviterpeny (*cis*-savanon a germacren D). V rostlině, s původem z různých zemí, ale nejvíce převažuje thujon. V rostlinách, které byly pěstovány v Rusku, byl hlavní složkou β -pinen a v Turecku, Indii a Chorvatsku byla vysoká koncentrace borneolu a kafru. Silice je zelené barvy s vůní kafru a hořkosladkou chutí. Přesné složení silice ovlivňuje mnoho faktorů, které se podílejí na variaci složení těchto silic (místo sběru, vlhkost, zralost). Pelyněk obsahuje i flavonoidy (apigenin, luteolin, tricín, kaempferol, kvercetin a rutin) a jejich glykosidy. Fruktany, které se získávají infuzí pelyňku, jsou ve vodě rozpustné polysacharidy, které jsou přítomné v mnoha jedlých rostlinách a jejich konzumace přispívá ke správné funkci tlustého střeva a tím snižuje riziko některých onemocnění [32, 33]

1.6.2 Antioxidační aktivita

Hlavní ze skupin fenolických látek, které jsou zodpovědné za antioxidační aktivitu jsou deriváty kyseliny chlorogenové, kyselina protocatechová a chinová. Jsou zde přítomny i flavonoidy, které také výrazně přispívají k silné antioxidační aktivitě pelyňku. Mezi flavonoidy, které jsou obsaženy v pelyňku patří: apigenin, luteolin, tricín, rutin, kvercetin, eriodictyol, diosmetin a jejich glykosidy. Flavonoidy jsou zodpovědné jak za antioxidační,

tak za antimikrobiální a protizánětlivé vlastnosti *A. vulgaris*. Hlavní sloučeninami jsou luteolin a eriodictyol. Luteolin má antimikrobiální, antioxidační a protizánětlivé účinky. Eriodictyol se nachází také v citrusových plodech a má protizánětlivé vlastnosti [33, 34].



Obrázek 12: Kyselina chlorogenová

1.6.3 Využití

Artemisia vulgaris je rostlina, která se používá v tradiční medicíně ve všech částech světa. V čínské medicíně se využívá při žaludečních potížích a při novorozenecké žloutence. Dále je prostředkem pro pravidelnou menstruaci. Pelyněk má diuretické, antiseptické a analgetické vlastnosti, je využíván při léčbě revmatismu, astmatu, také se využívá v kosmetickém průmyslu jako tonikum. Artemisin, který byl izolován z různých druhů rodu *Artemisia*, včetně *A. vulgaris*, je seskviterpenový lakton, který je schopný inhibovat rezistentní druhy parazitů, včetně těch, kteří způsobují malárii. Listy se využívají jako koření na maso a ryby v západních kulturách, a v Asii k ochucení čajů [33].

2 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

Antioxidanty mají důležitou roli při uchovávání potravin, protože jsou schopny inhibovat oxidační procesy. Jsou citlivé na fotochemické termické a enzymatické reakce. Jednou z hlavních příčin zhoršování kvality potravin je oxidace lipidů. Tyto reakce mohou vést k nežádoucím změnám chuti, ztrátě esenciálních aminokyselin, vitaminů a dalších bioaktivních látek. Pro stabilizaci potravin je použití antioxidantů neekonomičtější a nejúčinnější řešení. Mezi sloučeniny, které vykazují antioxidační aktivitu a inhibují oxidační procesy patří např. kyselina askorbová, tokoferoly a některé fenolické sloučeniny (kyselina karnosová, kyselina kávová, kyselina rozmarýnová a další) [35, 36].

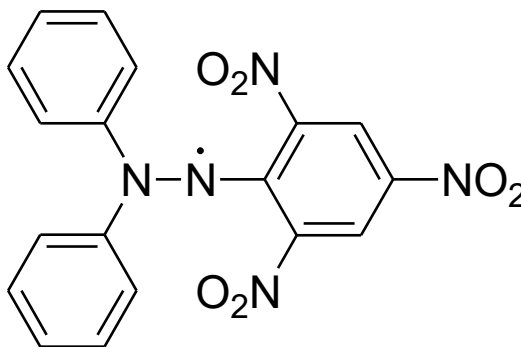
Na stanovení antioxidační aktivity se využívá vícero spektrofotometrických metod. K nejběžnějším patří metody s DPPH a ABTS činidly, které jsou založeny na vychytávání volných radikálů. Další metodou je metoda FRAP, principem je redukce komplexu trojmocného železa a 2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazinu) (TPTZ). Tato reakce je následně měřena spektrofotometricky při vlnové délce 593 nm. Dále se využívají metody, které měří vychytávání volných kyslíkových radikálů, jako je ORAC a HORAC, při které se určuje vychytávání $\text{OH}\cdot$ radikálů. Spektrofotometrická metoda CUPRAC (Cupric ion reduction antioxidant capacity) měří schopnost redukovat měďnaté ionty. Tato metoda dokáže měřit antioxidační aktivitu při fyziologickém pH, takže lépe simuluje chování antioxidantů v lidském těle. Modré reakční činidlo chelát bis(neocuproin) měďnatý je snadno dostupné, stabilní a rozpustné jak ve vodných, tak v organických rozpouštědlech. Reakční činidlo je schopné reagovat se všemi typy biologicky důležitých antioxidantů (kyselina askorbová, kyselina močová, bilirubin, β -karoten a α -tokoferol) a antioxidantů v potravinách (flavonoidy a fenolové kyseliny). Redoxní reakce je rychlá a výsledná barva (žlutooranžová) vzniklého bis(neocuproin) měďného kationtu je stabilní. Absorbance redoxní reakce s redukujícími polyfenoly je měřena při 450 nm [37, 38].

V další části jsou popsány metody využité v této práci.

2.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Test 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylových radikálů, neboli DPPH \cdot patří mezi nejčastěji používanou metodu hodnocení antioxidační aktivity. Princip této metody spočívá v reakci tohoto radikálu se vzorkem, kdy dojde k darování elektronu a k neutralizaci DPPH. Součástí

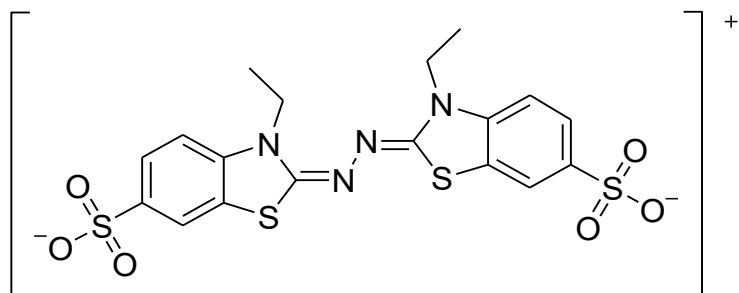
této reakce je změna barvy DPPH, která je indikátorem účinku reakce. Reakce je měřena spektrofotometricky při 517 nm. DPPH \cdot je stabilní radikál s tmavěmodrofialovou barvou. I přestože je toto stanovení jednoduché a výhodné, může být ovlivněno různými faktory (typ rozpouštědla, přítomnost vodíku a kovových iontů a čerstvost DPPH činidla) [35].



Obrázek 13: DPPH \cdot radikál

2.2 Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody ABTS

Tato metoda se využívá k měření antioxidační aktivity, kdy se měří schopnost antioxidantů zneutralizovat 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonovou kyselinu), zkráceně ABTS. ABTS je zelenomodrý chromofor. Maximální absorpce tohoto stabilního radikálového kationtu je 734 nm. Jeho odbarvení indikuje reakci antioxidantu a tato reakce závisí na reakční době, koncentraci vzorku a jeho antioxidační aktivitě. Výhodou ABTS je jeho rozpustnost jak ve vodě, tak v organických rozpouštědlech, proto je možné jej používat pro hydrofilní i lipofilní sloučeniny. Test ABTS lze také použít při širokém rozmezí pH. Větší citlivosti této metody lze dosáhnout pomocí dalších detekčních přístrojů například pomocí amperometrie. Metoda je využívána pro svoji jednoduchost a malé náklady [39].



Obrázek 14: Radikálový kationt ABTS

3 METODY STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU POLYFENOLŮ

Polyfenoly představují velkou skupinu látek, které jsou strukturně příbuzné a jsou přítomné převážně v rostlinách, ovoci a zelenině, kde přispívají k jejich chuti a barvě. Tyto sloučeniny reagují s volnými radikály a tím neutralizují reaktivní formy kyslíku. Jsou považovány za protizánětlivé látky a jsou využívány v tradičním léčitelství na podporu proti některým onemocněním. Mezi polyfenoly patří flavonoidy, které se v rostlinách vyskytují převážně ve formě glykosidů. Flavonoidy a další fenolické látky jsou běžně obsaženy v listech, květech a stoncích rostlin. Jsou důležité pro růstový vývoj rostliny a také pro obranu proti poranění. Rostlinné polyfenoly obsahují mnoho různých sloučenin (kvercetin, kaempferol, myricetin, apigenin, luteolin, katechin, epikatechin, kyselinu gallovou a další) [40, 41].

Jejich identifikace a kvantifikace se provádí pomocí různých metod jako je kapalinová chromatografie (HPLC) s detektorem diodového pole, fluorescenčním detektorem nebo hmotnostním detektorem. Nejvíce se ale pro stanovení celkového obsahu polyfenolů využívají spektrofotometrické metody, které nejsou časově ani finančně náročné a mají vysokou opakovatelnost a reprodukovatelnost [42].

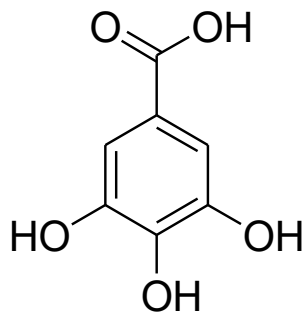
Princip spektrofotometrie je založen na lineárním vztahu mezi absorbcí a koncentrací látky ve zředěném roztoku. Provádí kvalitativní i kvantitativní analýzu při specifické vlnové délce. Jedna ze spektrofotometrických metod pro stanovení polyfenolů je kolorimetrická metoda Iron (II) D-tartarát, která se využívá při stanovení čajových polyfenolů. Při této metodě polyfenoly tvoří modrofialový komplex s D-tartarátem železnatým a poté jsou kvantifikovány spektrofotometrem. Další spektrofotometrickou metodou je metoda pomocí Folin-Ciocalteuova činidla [43].

3.1 Stanovení celkového obsahu polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuovova činidla

Folin-Ciocalteuovo činidlo se používá pro stanovení celkového obsahu polyfenolů v rostlinách. V této metodě se využívá Folin-Ciocalteuovo činidlo, které je směs kyseliny fosfowolframové a kyseliny fosfomolybdenové. Folin-Ciocalteuovo činidlo spolu s uhličitanem sodným vytváří alkalické prostředí a s ním i fenolátový aniont. Reakcí Folin-Ciocalteuova činidla s aniontem dojde k redukci molybdenu a důsledkem toho se změní

barva roztoku ze žluté na modrou. Na vytvoření kalibrační křivky se jako standard používá kyselina gallová, s maximální absorpcí při 765 nm [42, 43].

Při reakci činidla, která vede ke změně barvy reakční směsi, může dojít k ovlivnění výsledků. Největší podíl na chybě výsledků má kyselina askorbová, kyselina dehydroaskorbová a redukující cukry. Proto není vhodné tuto metodu využívat například u extraktů ovoce, které mají vysokou koncentraci vitamínu C [44].



Obrázek 15: Kyselina gallová

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo stanovit antioxidační aktivitu a celkový obsah polyfenolů ve vodných extraktech léčivých rostlin pomocí tří metod při dvou teplotách, 80 °C a 95 °C.

Teoretická část byla zaměřena na popis vybraných léčivých rostlin (heřmánek, meduňka, saturejka, lípa, kopřiva a pelyněk), jejich chemické složení, antioxidační působení a využití. Dále zde byly popsány principy jednotlivých metod použitých pro stanovení antioxidační aktivity a obsahu polyfenolů.

V rámci praktické části byly připraveny vodné extrakty rostlin, které byly následně zhodnoceny vzhledem k zjištěnému obsahu polyfenolických látek stanovenému spektrofotometrickou metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem, a také na základě antioxidační aktivity zjištěné třemi spektrofotometrickými metodami, s činidly DPPH, i prostřednictvím hodnot IC_{50} , a činidla ABTS.

5 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

5.1 Materiál

Pro účely bakalářské práce bylo vybráno 6 léčivých rostlin v sušeném stavu, konkrétně heřmánek, meduňka, saturejka, lípa, kopřiva a pelyněk. Celkem bylo připraveno 8 vzorků.

Tabulka 1: Seznam léčivých rostlin použitých v práci

Název byliny	Latinský název	Část rostliny	Země původu	Minimální trvanlivost
Heřmánek Pravý	<i>Matricaria chamomilla</i>	Květ	ČR	2026
Meduňka lékařská 1	<i>Melissa officinalis</i>	Nať	ČR	2025
Meduňka lékařská 2	<i>Melissa officinalis</i>	Nať	ČR	2024
Saturejka zahradní 1	<i>Satureja hortensis</i>	Nať	ČR	2024
Saturejka zahradní 2	<i>Satureja hortensis</i>	Nať	ČR	2023
Lípa obecná	<i>Tilia vulgaris</i>	Květ	ČR	2025
Kopřiva dvoudomá	<i>Urtica dioica</i>	Nať	ČR	2026
Pelyněk černobýl	<i>Artemisia vulgaris</i>	Nať	ČR	2024

5.2 Přístroje a pomůcky

- analytické váhy Voyager PRO VP214C (OHAUS Corporation, Pine Brook USA)
- spektrofotometr WPA S1200+ (Bio-chrom, s.r.o., SK)

- třepačka
- filtrační papíry KA4 (LABICOM, ČR)
- teploměr
- laboratorní sklo

5.3 Chemikálie

- uhličitan sodný Na_2CO_3 (Lukeš, ČR)
- DPPH (Sigma Aldrich, Francie)
- ABTS (Sigma Aldrich, Francie)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Penta, ČR)
- kyselina gallová (Sigma Aldrich, Francie)
- trolox (Sigma Aldrich, Francie)
- demineralizovaná voda
- acetátový pufr (pH = 5,5), (Lukeš, ČR)
- ethanol (Penta, ČR)
- peroxidisíran draselný (Lachner, s.r.o., ČR)
- octanový pufr (pH 4,3), (Penta, ČR)

6 METODIKA STANOVENÍ

Byly připraveny vodné extrakty bylin, které byly následně podrobeny testům pro zjištění jejich antioxidační aktivity (DPPH, IC₅₀, ABTS) a celkovému obsahu fenolických látek.

6.1 Příprava extraktů bylin

Pro přípravu vodných roztoků ze sušených částí bylin (kopřivy, pelyňku, lípy, heřmánku, meduňky a saturejky) bylo naváženo 1,5 g s přesností na 0,0001 g. Následně byly extrahovány se 100 ml demineralizované vody při dvou teplotách, 80 a 95 °C, na třepačce po dobu 10 minut. Po zchlazení extraktu na laboratorní teplotu byl extrakt zfiltrován přes filtrační papír. Extrakty byly podle potřeby pro jednotlivá stanovení ředěny.

Pro stanovení IC₅₀ byly vybrány extrakty meduňky a saturejky vzhledem k jejich vysokému antioxidačnímu působení. Původní extrakty byly dále naředěny podle potřeby a použity pro analýzu.

6.2 Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody DPPH

Při určení antioxidační aktivity byl využit roztok DPPH, který je tmavě modrý a v rámci antioxidační reakce dochází k jeho odbarvení. Poté se intenzita zabarvení daného roztoku stanovuje spektrofotometricky při 517 nm.

Do zkumavek byla napipetována reakční směs [45], která byla upravena dle našich potřeb:

- 2,75 ml roztoku DPPH
- 1,5 ml acetátového pufru
- 0,15 ml vzorku.

Zkumavky byly zazátkovány, protřepány a vloženy do tmy na dobu 1 hodiny. Následně byly spektrofotometricky měřeny při 517 nm. U slepého pokusu byl postup totožný, jen místo ethanolického roztoku DPPH bylo napipetováno stejné množství ethanolu. Pro výpočet inaktivace bylo potřeba stanovit i absorbanci kontrolního vzorku, kde bylo napipetováno náhradou za vzorek dané množství demineralizované vody.

Hodnoty absorbance byly využity při výpočtu inaktivace I [%] podle vztahu 1.

$$I = \frac{K-A}{K} \cdot 100 \text{ [%]} \quad (1)$$

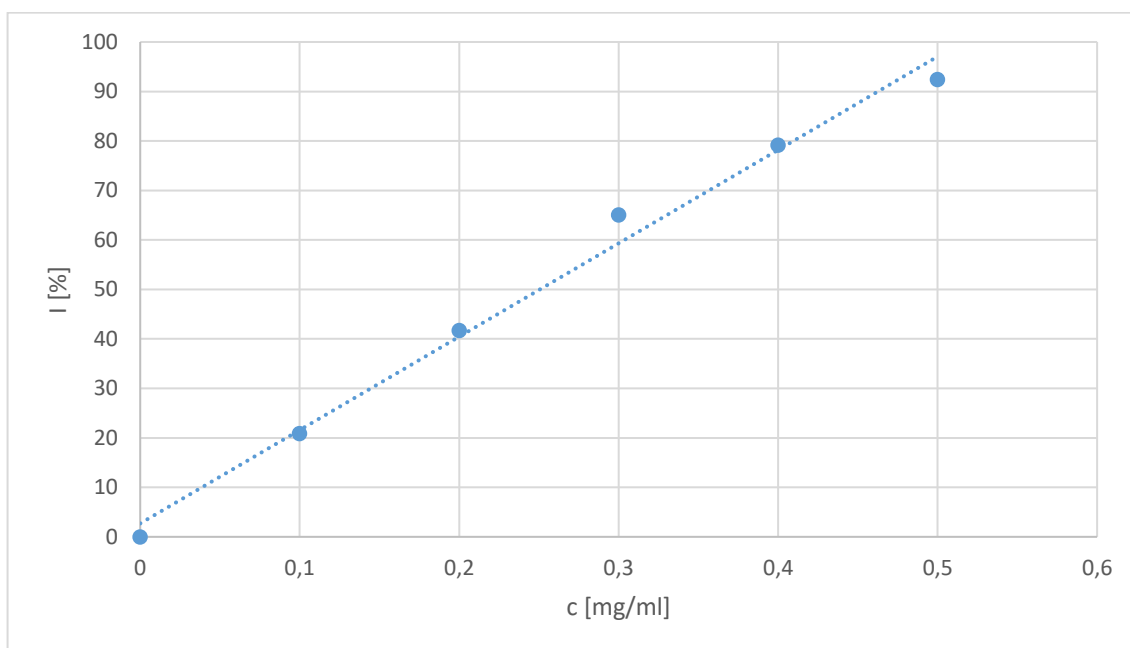
I inaktivace [%]

K hodnota absorbance kontrolního vzorku

A hodnota absorbance extraktu

6.2.1 Kalibrační křivka troloxu ke stanovení AA (DPPH)

K vytvoření kalibrační křivky byl využit zásobní roztok troloxu o koncentraci 0,5 g/l. Tento roztok byl následně naředěn do odměrných baněk na koncentrace: 0,4 g/l, 0,3 g/l, 0,2 g/l a 0,1 g/l. Tyto kalibrační roztoky byly použity na spektrofotometrické stanovení absorbance. Postup stanovení absorbance roztoků byl stejný jako v kapitole 6.2, vzorek extraktu byliny byl ale vždy nahrazen jedním z kalibračních roztoků.



Obrázek 16: Kalibrační křivka troloxu pro stanovení AA pomocí metody DPPH

Rovnice kalibrační křivky:

$$y = 188,71 \cdot x + 2,7069$$

y hodnota inaktivace I [%]

x koncentrace troloxu [mg/ml]

Korelační koeficient R^2 má hodnotu 0,9897.

6.2.2 Hodnoty IC₅₀

Hodnota IC₅₀ odpovídá koncentraci látky, která je schopna zachytit 50 % volných radikálů v rámci hodnocení metodou s DPPH. To znamená, že čím je hodnota IC₅₀ menší, tím je látka antioxidačně účinnější.

Hodnoty IC₅₀ byly stanoveny u extraktů s nejvyšším antioxidačním působením, roztoků z meduňky a satirejky, které byly extrahovány při teplotě 95 °C. Extrakty byly ředěny z původního extraktu na 25, 50, a 75 % koncentraci. Po reakci s DPPH postupem uvedeným v kapitole 6.2 byla změřena jejich absorbance a z rovnice (1) byla vypočítána jejich inaktivace. Z rovnice lineární regrese byla vypočítána koncentrace extraktu pro 50%-ní inaktivaci.

6.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody ABTS

Pro určení antioxidační aktivity metodou ABTS byl použit zelenomodrý roztok ABTS, kdy v průběhu reakce dojde k jeho odbarvení. Intenzita zabarvení roztoku se stanovuje spektrofotometricky při 734 nm.

Do zkumavky byla napipetována reakční směs [45], která byla upravena dle našich potřeb:

- 8 ml aktivovaného roztoku ABTS
- 0,1 ml vzorku

Zkumavky se zátkou byly po protřepání vloženy do tmy po dobu 30 minut. Následně byly vzorky změřeny spektrofotometricky při 734 nm. Jako slepý pokus byl použit octanový pufr. Pro výpočet inaktivace byla změřena absorbance kontrolního vzorku, roztoku ABTS.

Hodnoty absorbance byly využity při výpočtu inaktivace I [%] podle vztahu 1.

$$I = \frac{K-A}{K} \cdot 100 \text{ [%]} \quad (2)$$

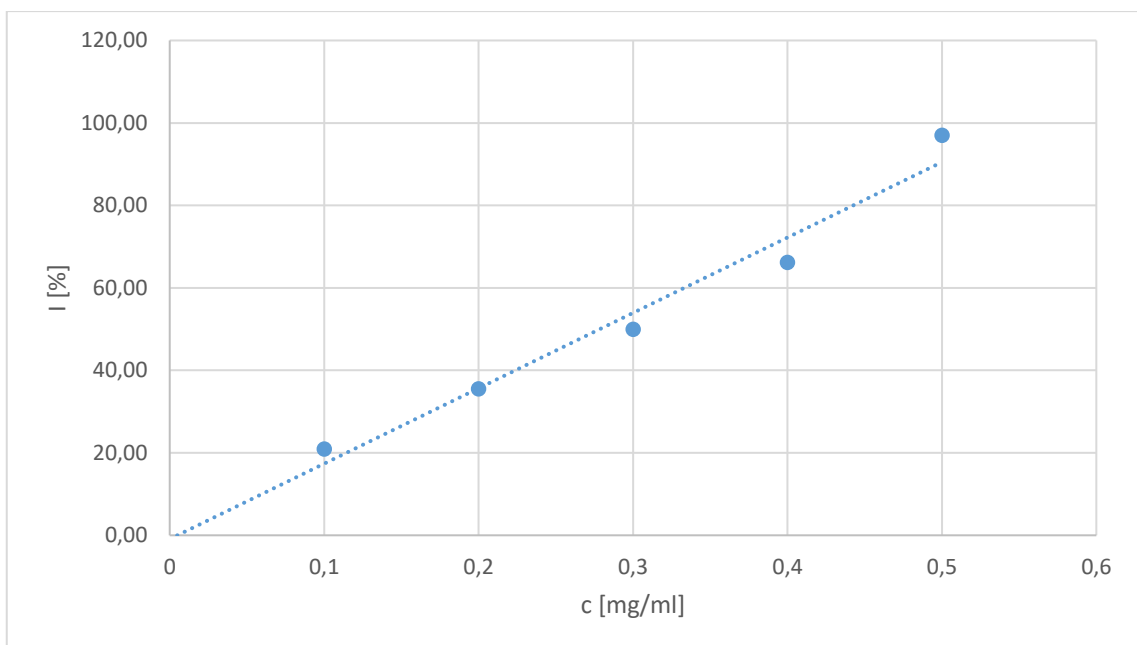
I inaktivace [%]

K hodnota absorbance kontrolního vzorku

A hodnota absorbance extraktu

6.3.1 Kalibrační křivka troloxu ke stanovení AA (ABTS)

Kalibrační křivky byla vytvořena pomocí zásobního roztoku troloxu o koncentraci 0,5 g/l. Tento roztok byl nadále ředěn na koncentrace 0,4 g/l, 0,3 g/l, 0,2 g/l a 0,1 g/l. Postup stanovení absorbance roztoků byl stejný jako v kapitole 6.3, vzorek extraktu byliny byl ale vždy nahrazen jedním z kalibračních roztoků.



Obrázek 17: Kalibrační křivka troloxu pro stanovení AA pomocí metody ABTS

Rovnice kalibrační křivky:

$$y = 182,81 \cdot x - 0,9096$$

y hodnota inaktivace I [%]

x koncentrace Troloxu [mg/ml]

Korelační koeficient R^2 má hodnotu 0,969.

6.4 Stanovení celkového obsahu polyfenolů

Při určení celkového obsahu polyfenolů bylo použito Folin-Ciocalteuovo činidlo, které má žlutou barvu a při reakci dojde k změně barvy na modrou. Intenzita zbarvení se měří spektrofotometricky při 750 nm.

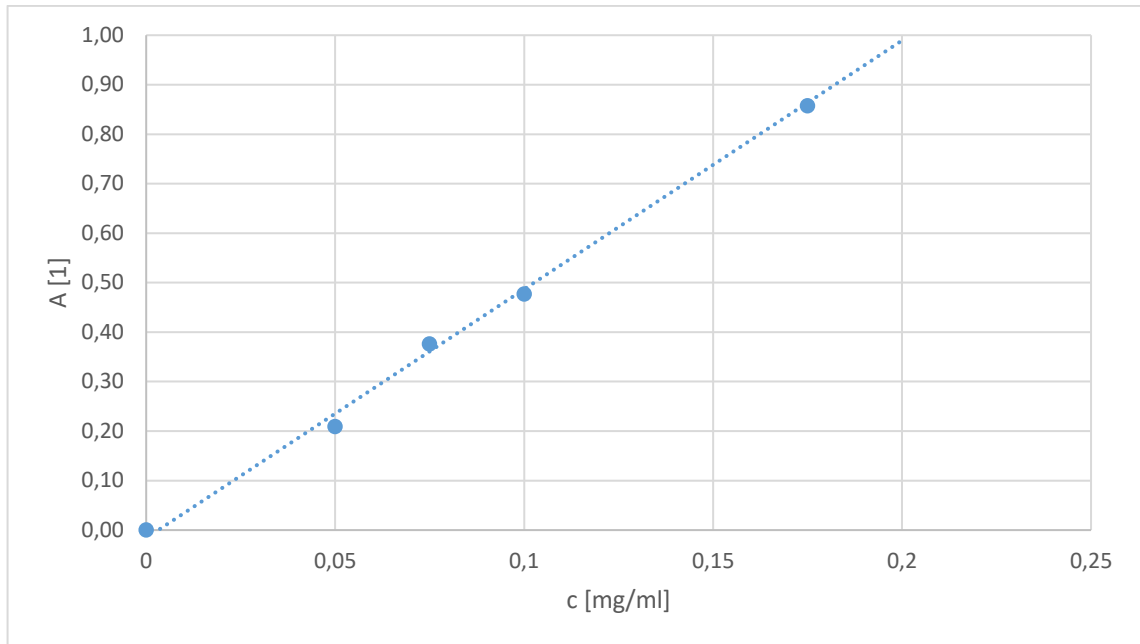
Do zkumavek byla napipetována reakční směs [45], která byla upravena dle našich potřeb:

- 2 ml 10 % Folin-Ciocalteuova činidla
- 0,2 ml vzorku

Zkumavky byly zazátkovány, protřepány a vloženy do tmy po dobu 5 minut. Poté bylo do zkumavky napipetováno 2 ml uhličitanu sodného. Zkumavka byla zazátkována, protřepána a opět vložena do tmy na 15 minut. U slepého vzorku byl postup totožný, jen místo vzorku bylo napipetováno stejné množství demineralizované vody.

6.4.1 Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu polyfenolů

Standardem pro stanovení celkového obsahu polyfenolů byla kyselina gallová. Ředěním kyseliny gallové o koncentraci 0,2 mmol/l na koncentrace 0,0175 mmol/l, 0,1 mmol/l, 0,075 mmol/l a 0,05 mmol/l byly připraveny kalibrační roztoky. Postup stanovení absorbance byl stejný jako v kapitole 6.4, jen místo 0,2 ml vzorku bylo použito stejné množství jednotlivých kalibračních roztoků.



Obrázek 18: Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu polyfenolů

Rovnice kalibrační křivky:

$$y = 5,027 \cdot x - 0,016$$

y hodnota inaktivace I [%]

x koncentrace troloxu [mg/ml]

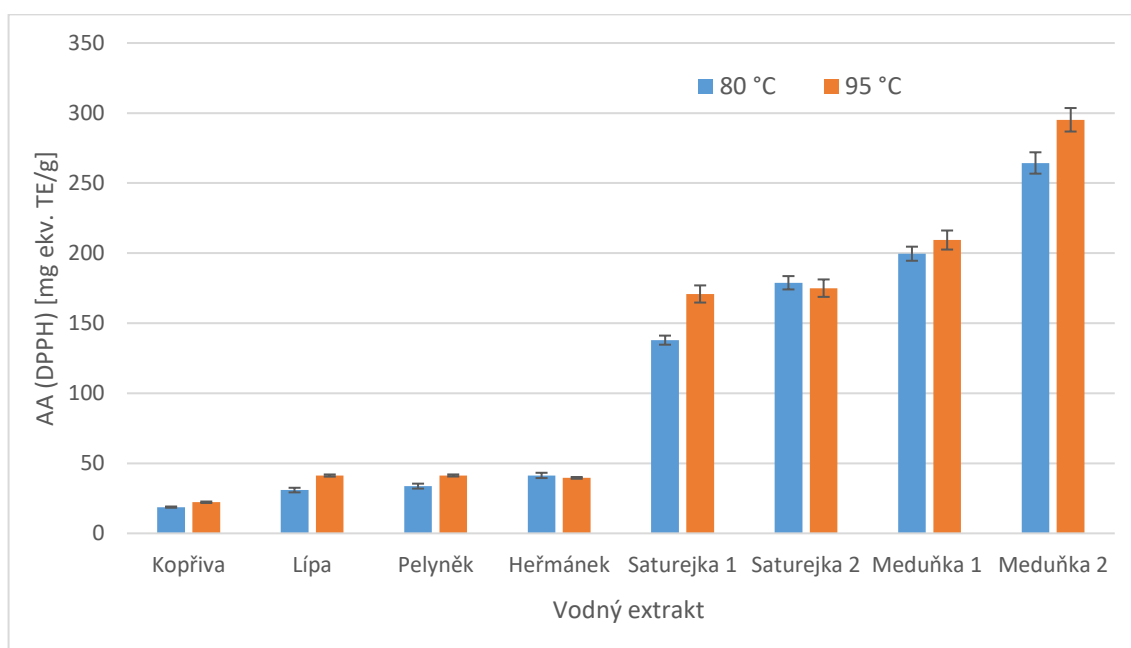
Korelační koeficient R^2 má hodnotu 0,998.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Vybrané léčivé rostliny byly extrahovány demineralizovanou vodou při dvou teplotách, 80 °C a 95 °C. Extrakty rostlin byly měřeny pomocí spektrofotometrických metod s DPPH a ABTS pro stanovení antioxidační aktivity. Celkový obsah polyfenolů byl zjištěn pomocí Folin-Ciocalteuova činidla.

7.1 Hodnocení antioxidační aktivity extraktů stanovené metodou s DPPH při různých teplotách extrakce

Na obr. 19 jsou znázorněny výsledky antioxidační aktivity (AA), stanoveny pomocí metody DPPH, pro byliny extrahované při dvou teplotách, 95 °C a 80 °C, které jsou uvedeny ve vzestupném pořadí. Stanovení bylo provedeno třikrát a z naměřených hodnot byla vypočtena směrodatná odchylka.



Obrázek 19: Hodnocení antioxidační aktivity (AA) extraktů bylin metodou DPPH při dvou teplotách

Hodnoty antioxidační aktivity extraktů se pohybují v intervalu od 18,70 do 298,20 mg ekvivalentu troloxu (TE)/g. Nejnižší hodnoty jsou patrné u extraktů koprivy a lípy, především při nižší teplotě, 80 °C. Nejvyšší hodnoty AA jsou u extraktů meduňky, přičemž vyšší hodnoty jsou při vyšší teplotě. Celkově se dá konstatovat, že většina vzorků

extrahovaných při vyšší teplotě (95 °C) vykazuje vyšší antioxidační aktivitu, s výjimkou u vzorku heřmánku a saturejky 2. Při teplotě 95 °C byl průměrný nárůst AA extraktů bylin 9 %. Tento rozdíl je poměrně malý, kdy hodnoty při různých teplotách se liší jen minimálně. Nejvyšší hodnotu antioxidační aktivity po extrakci při obou teplotách má extrakt meduňky 2. Antioxidační aktivita u extraktů meduňky a saturejky byla stanovována u dvou různých výrobců. Průměrná antioxidační aktivita vzorků meduněk odpovídala hodnotě 252,28 mg/g při teplotě extrakce 95 °C a 231,98 mg/g při teplotě 80 °C. Extrakt saturejky měl druhou nejvyšší antioxidační aktivitu, průměrná hodnota při 95 °C byla 172,93 mg/g a při 80 °C byla průměrná hodnota 158,37 mg/g. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u extraktů saturejky, kdy AA byla průměrně vyšší o 9 %. Průměrná hodnota AA extraktů meduňky a saturejky naměřená při 95 °C je 237,61 mg/g, tato hodnota je o 85 % vyšší než průměrná hodnota extraktů kopřivy, lípy, pelyňku a saturejky při 95 °C (36,08 mg/g). Z toho vyplývá, že kopřiva, lípa, pelyněk a heřmánek mají výrazně nižší AA oproti meduňce a saturejce.

Petkova a kol. [46] měřili antioxidační aktivitu (AA) osmi vzorků meduňky lékařské, které byly zakoupeny u různých výrobců a jeden vypěstován, pomocí metody DPPH. AA vzorků meduňky se pohybovala v rozmezí 106,31 – 553,51 mM TE/g. Nejvyšší hodnotu AA měla meduňka, která byla vypěstována v bylinné zahradě. Nejnižší AA měly vzorky meduňky se zhnědlými listy.

Aćimović a kol. [47] stanovili AA u saturejky metodou DPPH. Extrakce proběhla pomocí subkritické extrakce vodou při 130 °C po dobu 30 minut. Hodnota AA (DPPH) extraktu saturejky byla stanovena na 32,28 μ mol TE/g.

Sotiropoulou a kol. [48] porovnávali antioxidační aktivitu naměřenou pomocí metody DPPH vodných extraktů heřmánku a šalvěje, která byly extrahovány při 100 °C. AA extraktu heřmánku byla stanovena na hodnotu 2,53 mg ekv. TE/ml extraktu. Zjištěná hodnota AA extraktu šalvěje byla vyšší, 5,84 mg ekv. TE/ml extraktu.

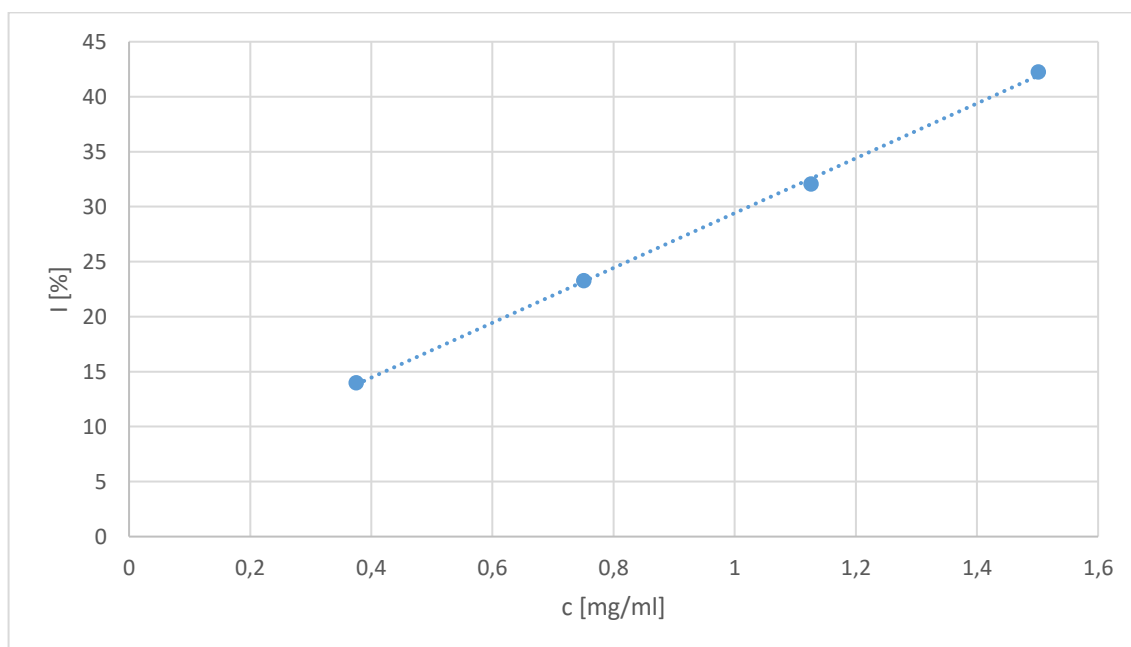
Stanovení AA pelyňku pomocí metody DPPH provedli Trifan a kol. [49] Antioxidační aktivita byla měřená v extraktech pelyňku s různými rozpouštědly (hexan, dichlormethan, methanol, 50% methanol a voda). Extrakce probíhala při pokojové teplotě. Hodnotu AA vodného extraktu stanovili na 58,78 mg TE/g. Tato hodnota se blíží naší hodnotě AA extraktu pelyňku, který byl extrahován při 95 °C (41,30 mg TE/g). Nejvyšší hodnotu AA měl extrakt s methanolem (213,68 mg TE/g), následoval extrakt pelyňku s 50 % methanolem (61,74 mg TE/g), vodný extrakt, extrakt s dichlormethanem (7,63 mg TE/g) a nejmenší hodnotu AA měl extrakt s hexanem (0,71 mg TE/g).

Horžic a kol. [50] porovnávali AA (DPPH) u vodných extraktů heřmánku a lípy zakoupených v tržní síti. Tato extrakce byla provedena po dobu 3 minut při 80 °C. AA vodného extraktu lípy byla stanovena na 68,23 %. Dále také stanovili AA extraktu heřmánku, kde byla hodnota AA téměř totožná (71,10 %). Při našem stanovení byla AA extraktů heřmánku, extrahovaných při 80 °C vyšší o 25,28 % než AA extraktů lípy (80 °C).

Při extrakci kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*) Mzid a kol. [51] stanovovali AA pomocí DPPH u vodného a ethanolového extraktu kopřivy. Extrakce probíhala po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Hodnotu AA vodného extraktu kopřivy stanovili na 45,67 mg TE/g. Hodnota AA ethanolového extraktu kopřivy byla vyšší, 65,33 mg TE/g.

7.1.1 Hodnocení antioxidační aktivity extraktů pomocí hodnot IC_{50}

Hodnoty IC_{50} byly stanoveny u 2 vzorků meduňky a 2 vzorků saturejky, které byly extrahovány při 95 °C. Jednalo se o vzorky s nejvyšší naměřenou AA jinými metodami. Stanovení bylo provedeno dle kapitoly 6.2.2. Výsledky jednotlivých stanovení jsou uvedeny na obrázcích 20 – 23, a v tabulce 2.



Obrázek 20: Hodnoty inaktivace extraktu meduňky 1

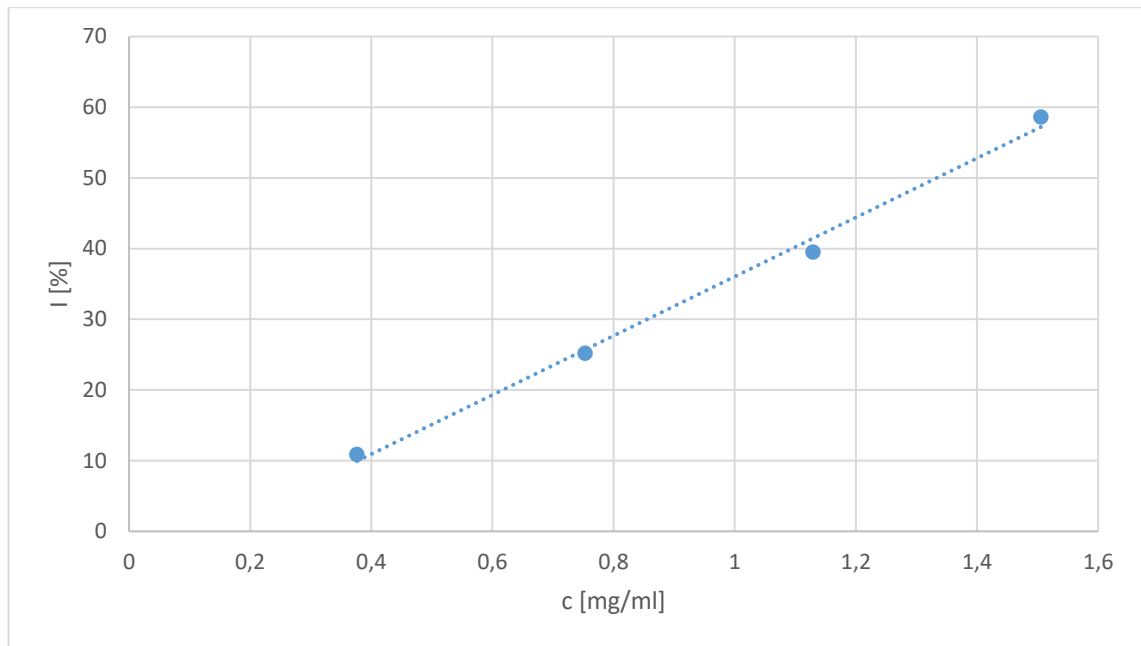
Rovnice regrese pro vodní extrakt meduňky 1:

$$I = 27,324 \cdot c + 1,7929$$

I zjištěná hodnota inaktivace [%]

c koncentrace připraveného extraktu [mg/ml]

Hodnota IC_{50} pro extrakt meduňky 1 byla vypočtena na hodnotu: 1,76 mg/ml.



Obrázek 21: Hodnoty inaktivace extraktu meduňky 2

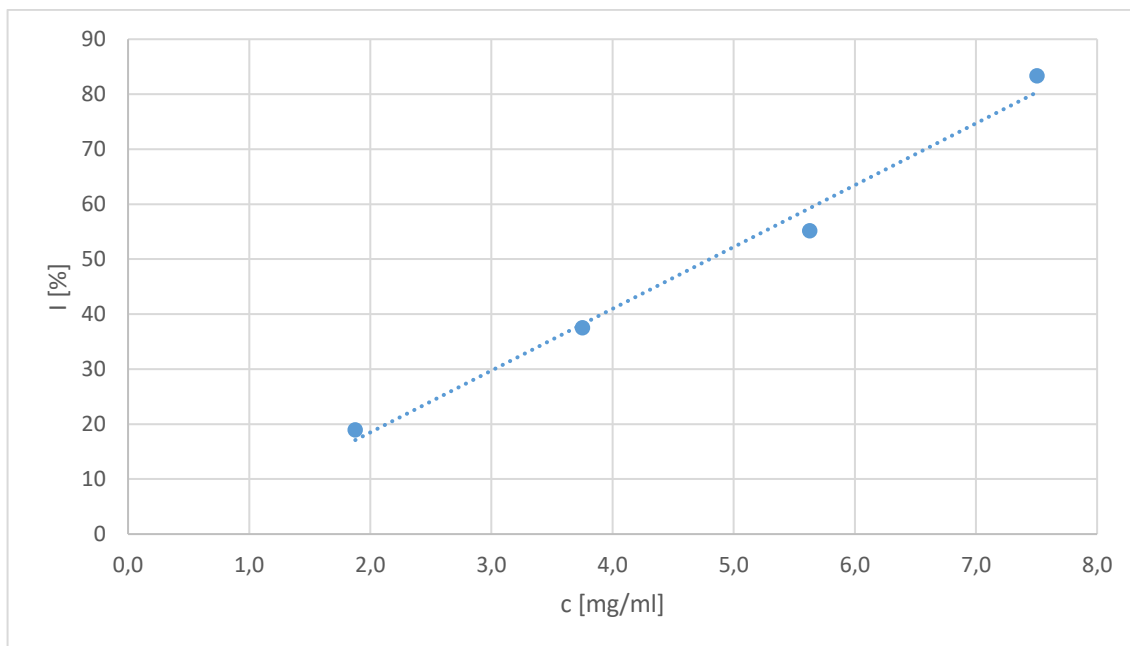
Rovnice regrese pro vodní extrakt meduňky 2:

$$I = 38,763 \cdot c + 2,3269$$

I zjištěná hodnota inaktivace [%]

c koncentrace připraveného extraktu [mg/ml]

Hodnota IC_{50} pro extrakt meduňky 2 byla vypočtena na hodnotu: 1,35 mg/ml.



Obrázek 22: Hodnoty inaktivace extraktu saturejky 1

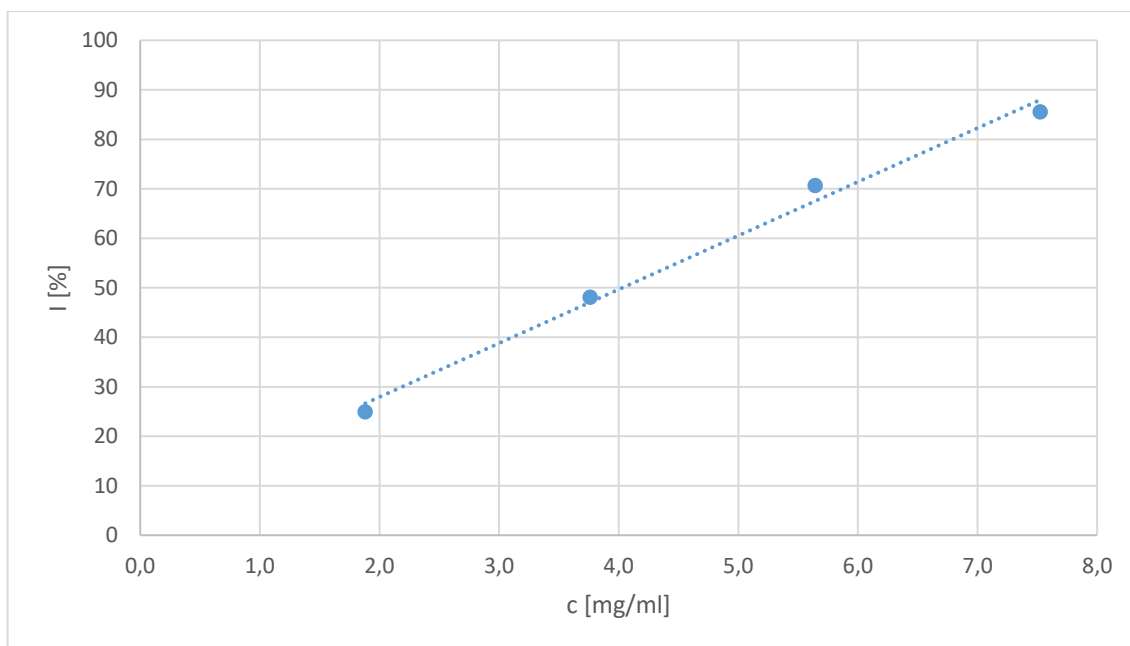
Rovnice regrese pro vodní extrakt saturejky 1:

$$I = 10,816 \cdot c + 1,5962$$

I..... zjištěná hodnota inaktivace [%]

c..... koncentrace připraveného extraktu [mg/ml]

Hodnota IC_{50} pro extrakt saturejky 1 byla vypočtena na hodnotu: 4,77 mg/ml.



Obrázek 23: Hodnoty inaktivace extraktu saturejky 2

Rovnice regrese vzorku saturejky 2:

$$I = 11,527 \cdot c + 2,4754$$

I zjištěná hodnota inaktivace [%]

c koncentrace připraveného extraktu [mg/ml]

Hodnota IC_{50} pro extrakt saturejky 2 byla vypočtena na hodnotu: 4,12 mg/ml.

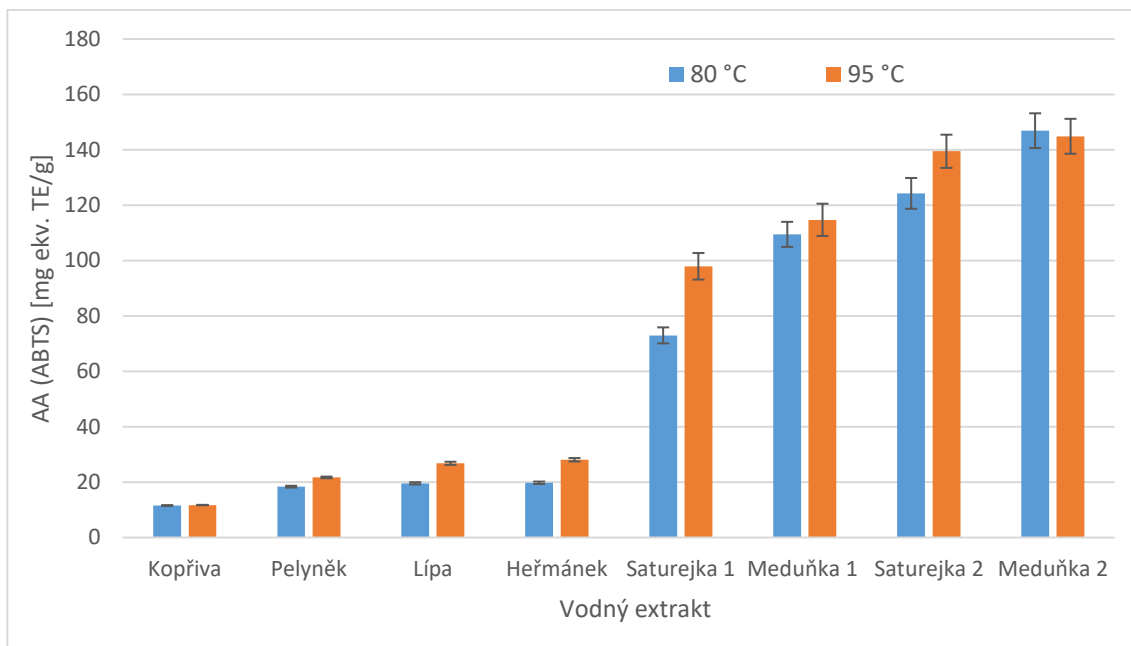
Tabulka 2: Hodnoty IC_{50} vzorků meduňky a saturejky

Název vzorku	Rovnice lineární regrese	IC_{50} [mg/ml]
Meduňka 1	$I = 27,324 c + 1,7929$	1,76
Meduňka 2	$I = 38,763 c + 2,3269$	1,35
Saturejka 1	$I = 10,816 c + 1,5962$	4,77
Saturejka 2	$I = 11,527 c + 2,4754$	4,12

Průměrná hodnota IC_{50} vzorků meduněk zakoupených u dvou výrobců, které byly extrahovány při 95 °C byla 1,56 mg/ml. Hodnoty byly porovnávány také u vzorků saturejek s průměrnou hodnotou 4,45 mg/ml. Tyto výsledky odpovídají hodnotám naměřeným metodou DPPH, kde extrakt meduňky 2 dosáhl nejvyšší AA, následovaly extrakty meduňky 1, saturejky 2 a saturejky 1.

7.2 Hodnocení antioxidační aktivity extraktů stanovené metodou s ABTS při různých teplotách extrakce

Na obr. 24 jsou znázorněny výsledky AA, stanoveny pomocí metody ABTS, pro extrakty bylin při dvou teplotách, 95 °C a 80 °C, které jsou sestaveny ve vzestupném pořadí. Stanovení bylo provedeno třikrát a z naměřených hodnot byla vypočtena směrodatná odchylka.



Obrázek 24: Hodnocení antioxidační aktivity (AA) extraktů bylin metodou ABTS při dvou teplotách

Při měření AA extraktů rostlin pomocí metody ABTS byly hodnoty antioxidační aktivity při extrakci při 80 °C v intervalu od 11,55 – 146,88 mg ekv. TE/g. Při extrakci při teplotě 95 °C byl interval od 11,72 – 144,87 mg ekv. TE/g. Vyšší teplota extrakce (95 °C) měla vliv na hodnotu AA extraktů, kromě extraktů meduňky 2, kde je AA extraktů při 80 °C vyšší než při teplotě 95 °C. Metoda ABTS potvrdila vyšší AA extraktů meduňky a následně saturejky než extraktů heřmánku, pelyňku, lípy a kopřivy. Průměrná hodnota AA extraktů meduňky a saturejky, extrahovaných při teplotě 95 °C, je o 82 % vyšší než extrakty kopřivy, pelyňku, lípy a heřmánku, které byly extrahovány při 95 °C. Antioxidační aktivita extraktů saturejky při 80 °C je průměrně 98,62 mg/g a při 95 °C 118,70 mg/g. Nejvyšší AA měl extrakt meduňky 2, extrahován při 80 °C, 146,88 mg/g a nejnižší hodnota AA byla naměřena u extraktu kopřivy 11,55 mg/g, který byl extrahován při 80 °C. AA meduňky a saturejky byla stanovována u dvou výrobců. Průměrný nárůst AA extraktů při 95 °C byl o 11 % vyšší oproti extrakci při 80 °C. Největší nárůst byl pozorován u extraktu saturejky, kde je AA při teplotě 95 °C vyšší o 17 %.

Výsledky AA stanovené metodou ABTS odpovídají výsledkům extraktů rostlin pro stanovení AA metodou DPPH, meduňka a saturejka jsou rostliny s nejvyšší antioxidační aktivitou. Heřmánek, lípa, pelyněk a kopřiva mají výrazně nižší AA.

Mihaylova a kol. [52] porovnávali různou dobu extrakce (10, 15, 20 a 30 minut) a její vliv na hodnotu antioxidační aktivity měřenou pomocí metody ABTS u vzorku čerstvé meduňky,

který byl extrahován ve vroucí vodě. Hodnotu AA extraktu meduňky extrahované 10 minut stanovili na 42,83 $\mu\text{M TE/g}$, 15 minut 36,76 $\mu\text{M TE/g}$, 20 minut 44,43 $\mu\text{M TE/g}$ a 30 minut 72,04 $\mu\text{M TE/g}$. Z toho vyplývá, že delší doba extrakce má za následek vyšší antioxidační aktivitu extraktů meduňky.

Aćimović a kol. [47] stanovili AA u saturejky metodou ABTS. Extrakce proběhla pomocí subkritické extrakce vodou při 130 °C po dobu 30 minut. Hodnota AA (ABTS) extraktu saturejky byla stanovena na 412,09 $\mu\text{mol TE/g}$.

Fotakis a kol. [53] měřili AA extraktů pomocí ABTS u 10 rostlin: majoránka zahradní, dobromysl obecná, mateřídouškovec vonný, polej obecná, máta klasnatá, třapatka nachová, verbena citrónová, rakytník řešetlákový, třezalka tečkovaná, heřmánek pravý. Extrakty byly získány extrakcí s vroucí vodou po dobu 15 minut. Rozsah hodnot AA extraktů rostlin byl od 25,01 – 138,50 mg ekv. TE/100ml. Hodnota AA extraktu heřmánku naměřená pomocí metody ABTS byla nejnižší, dále rakytník, třapatka, mateřídouškovec, majoránka, třezalka, dobromysl, polej a nejvyšší hodnotu AA měl extrakt máty klasnaté.

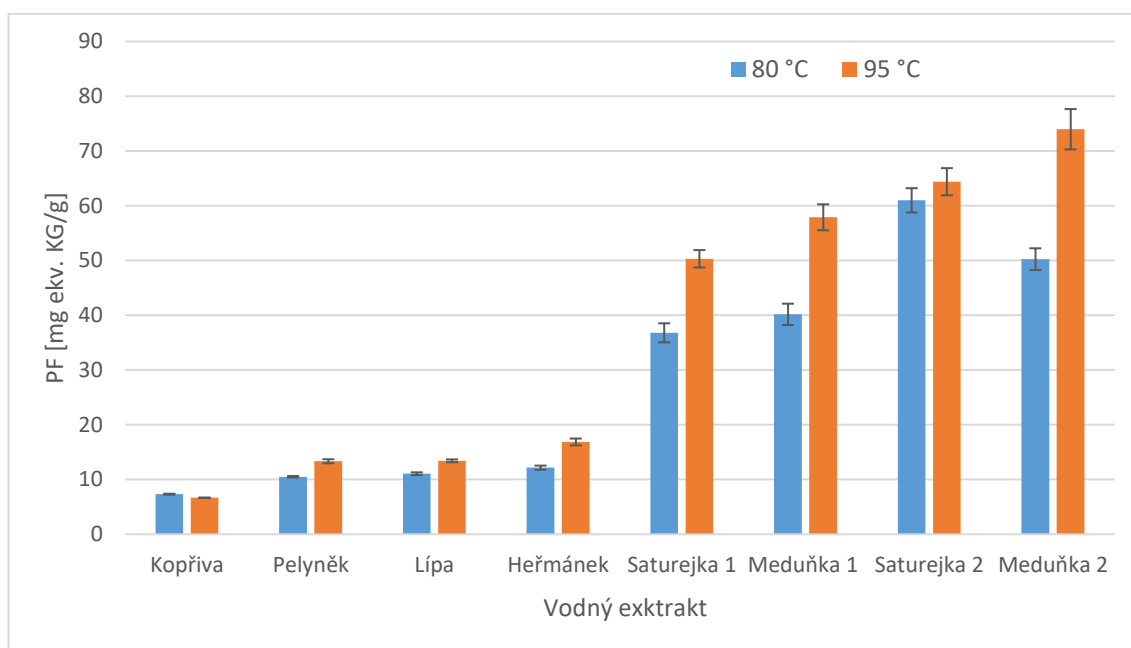
Stanovení AA pelyňku pomocí metody ABTS provedli Trifan a kol. [49] Antioxidační aktivita byla měřená v extraktech pelyňku s různými rozpouštědly (hexan, dichlormethan, methanol, 50% methanol a voda). Extrakce probíhala při pokojové teplotě. Hodnotu AA vodného extraktu pelyňku stanovili na 151,76 mg TE/g. Nejvyšší hodnotu AA měl extrakt s methanolem (356,35 mg TE/g), následoval extrakt pelyňku s 50 % methanolem (152,40 mg TE/g), vodný extrakt, extrakt s dichlormethanem (44,96 mg TE/g) a nejmenší hodnotu AA měl extrakt s hexanem (20,57 mg TE/g)

Horžić a kol. [50] porovnávali AA (ABTS) u vodných extraktů heřmánku a lípy zakoupených v tržní síti. Tato extrakce byla provedena po dobu 3 minut při 80°C. AA vodného extraktu lípy byla stanovena na 0,96 mmol TE/l. Dále také stanovili AA extraktu heřmánku v obdobné hodnotě. Hodnoty AA extraktů lípy a heřmánku si byly také velmi podobné. Tyto výsledky souhlasí s našimi zjištěními, kdy se hodnoty AA (ABTS) extraktů lípy a heřmánku téměř neliší.

Při extrakci kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*) Mzid a kol. [51] stanovovali AA pomocí ABTS u vodného a ethanolového extraktu kopřivy. Extrakce probíhala po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Hodnotu AA vodného extraktu kopřivy stanovili na 350,33 mg TE/g, u ethanolového extraktu kopřivy byla hodnota AA vyšší 560,33 mg TE/g.

7.3 Hodnocení celkového obsahu polyfenolů extraktů při různých teplotách

Na obr. 25 jsou znázorněny výsledné hodnoty celkového obsahu polyfenolů (PF) pro extrakty bylin při dvou teplotách, 95 °C a 80 °C, které jsou sestaveny ve vzestupném pořadí. Stanovení bylo provedeno třikrát a z naměřených hodnot byla vypočtena směrodatná odchylka.



Obrázek 25: Hodnocení celkového obsahu polyfenolů (PF) extraktů bylin při dvou teplotách

Použitím dvou odlišných teplot extrakce, při zjišťování celkového obsahu polyfenolů, byly hodnoty PF v rozmezí od 6,67 – 73,98 mg ekv. KG/g při 95 °C, a v rozmezí od 7,32 – 50,25 mg ekv. KG/g při 80 °C. U extraktu kopřivy (95 °C) byla stanovena nejnižší koncentrace PF 6,67 mg ekv. KG/g, a nejvyšší u extraktu meduňky 2 (95 °C) 73,98 mg ekv. KG/g. Při vyšší teplotě došlo k zlepšení výsledku extrakce, a tedy zvýšení obsahu PF průměrně o 23 %. Největší vliv měla teplota na obsah polyfenolů u extraktu meduňky 2, kde se hodnota s teplotou zvýšila o 32 %. Průměrná hodnota PF extraktů meduňky byla stanovena na 45,22 mg/g při extrakci za teploty 80 °C, a při 95 °C na 65,94 mg/g. Druhý nejvyšší nárůst PF při vyšší teplotě byl pozorován u extraktů saturejky (15 %), průměrný obsah PF při 80 °C byl 48,90 mg/g a při 95 °C 57,36 mg/g. Celkově je průměrný PF extraktů meduňky

a saturejky vyšší než u extraktů kopřivy, pelyňku, lípy a heřmánku při obou teplotách extrakce (80 °C a 95 °C). Na základě rostoucího trendu množství PF při extrakci za vyšší teploty (95 °C) lze konstatovat, že teplota extrakce výrazně ovlivnila nárůst polyfenolů ve vzorku.

Petkova a kol. [46] stanovili celkový obsah polyfenolů meduňky extrahované při 95 °C na hodnoty v rozmezí od 18,07 – 64,17 mg ekv. KG/g. Vodné extrakty byly připraveny extrakcí vody o teplotě 95 °C, směs byla extrahována po dobu 20 minut. Nejvyšší obsah polyfenolů měl vzorek meduňky, který byl vypěstován v bylinné zahradě a nejnižší obsah polyfenolů měly vzorky se zhnědlými listy.

Othmane a kol. [54] porovnávali výsledky celkového obsahu polyfenolů po extrakci saturejky pomocí různých rozpouštědel (methanol a voda) při pokojové teplotě po dobu 24 h. Stanovili celkový obsah polyfenolů vodného extraktu saturejky na 343,12 mg KG/g, přičemž zjistili, že methanolvý extrakt měl vyšší obsah polyfenolů (441,09 mg KG/g).

Vinha a kol. [55] stanovili celkový obsah polyfenolů (PF) extraktů meduňky lékařské a heřmánku pravého. Extrakce proběhla za teploty 100 °C po dobu 10 minut. Stanovili celkový obsah polyfenolů extraktu meduňky na 69,66 mg KG/100 g. u heřmánku byl celkový obsah polyfenolů (43,35 mg/100 g) nižší. Tyto hodnoty potvrzují naše výsledky, kdy meduňka má vyšší celkový obsah polyfenolů oproti heřmánku.

Stanovení celkového obsahu polyfenolů pelyňku provedli Trifan a kol. [49] Celkový obsah polyfenolů byl měřen v extraktech pelyňku s různými rozpouštědly (hexan, dichlormethan, methanol, 50% methanol a voda). Extrakce probíhala při pokojové teplotě. Hodnotu PF vodného extraktu pelyňku stanovili na 71,73 mg KG/g. Nejvyšší hodnotu PF měl extrakt s 50 % methanolem (104,00 mg KG/g), následoval extrakt pelyňku s methanolem (84,42 mg KG/g), vodný extrakt, extrakt s dichlormethanem (20,67 mg KG/g) a nejmenší hodnotu AA měl extrakt s hexanem (17,11 mg KG/g)

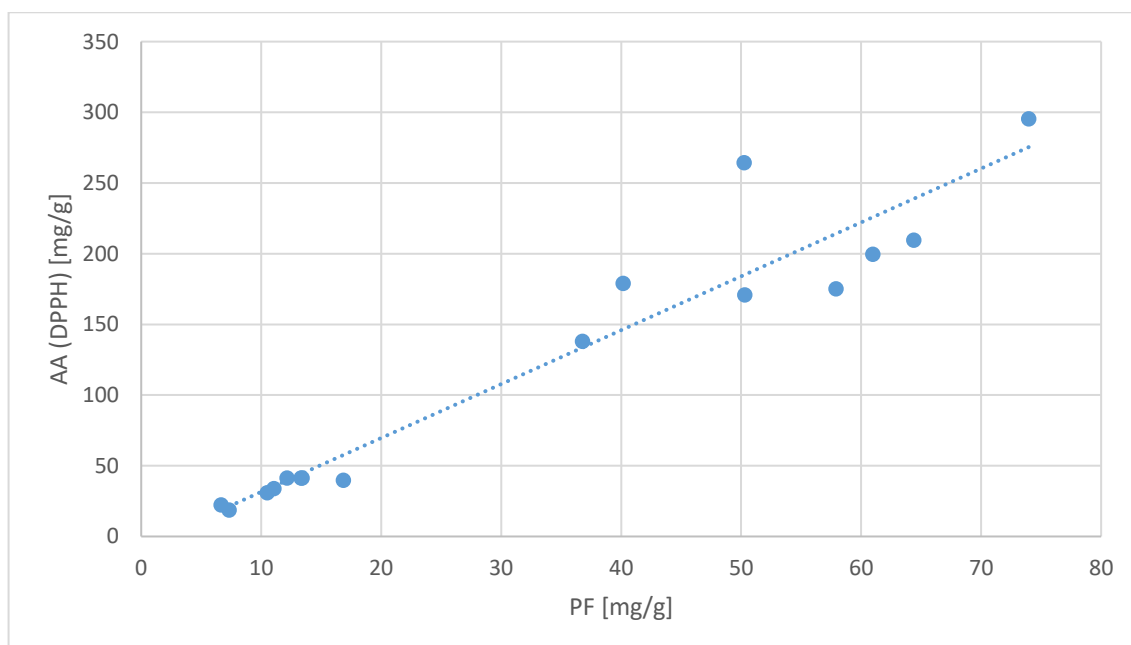
Akyuz [56] stanovil celkový obsah polyfenolů extraktu lípy. Extrakty byly připraveny pomocí ultrazvukové extrakce, mikrovlnné extrakce a extrakce za pomoci infuze. Extrakce pomocí infuze byla provedena po dobu 5 minut ve vodě při 100 °C a hodnota celkového obsahu polyfenolů extraktu lípy byla 27,68 mg KG/g, tento typ extrakce byl nejméně účinný. Nejúčinnější způsob extrakce byl pomocí ultrazvukové extrakce, kde byla hodnota mnohanásobně vyšší, 416,28 mg KG/g.

Flórez a kol. [57] extrahovali kopřivu dvoudomou (*Urtica dioica*) po dobu 1 h a stanovili celkový obsah polyfenolů methanolvého, ethanolového a vodného extraktu. Nejvyšší

celkový obsah polyfenolů měl vodný extrakt kopřivy 11,5 mg KG/g, poté methanolový extrakt (7,3 mg KG/g) a ethanolový extrakt (3,7 mg KG/g).

7.4 Korelační analýza pro celkový obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu

Korelace mezi antioxidační aktivitou (AA) naměřenou metodou DPPH a celkový obsah polyfenolů (PF), a korelace mezi AA naměřenou metodou ABTS a celkovým obsahem PF, jsou vyneseny do grafů na obr. 26 a obr. 27.

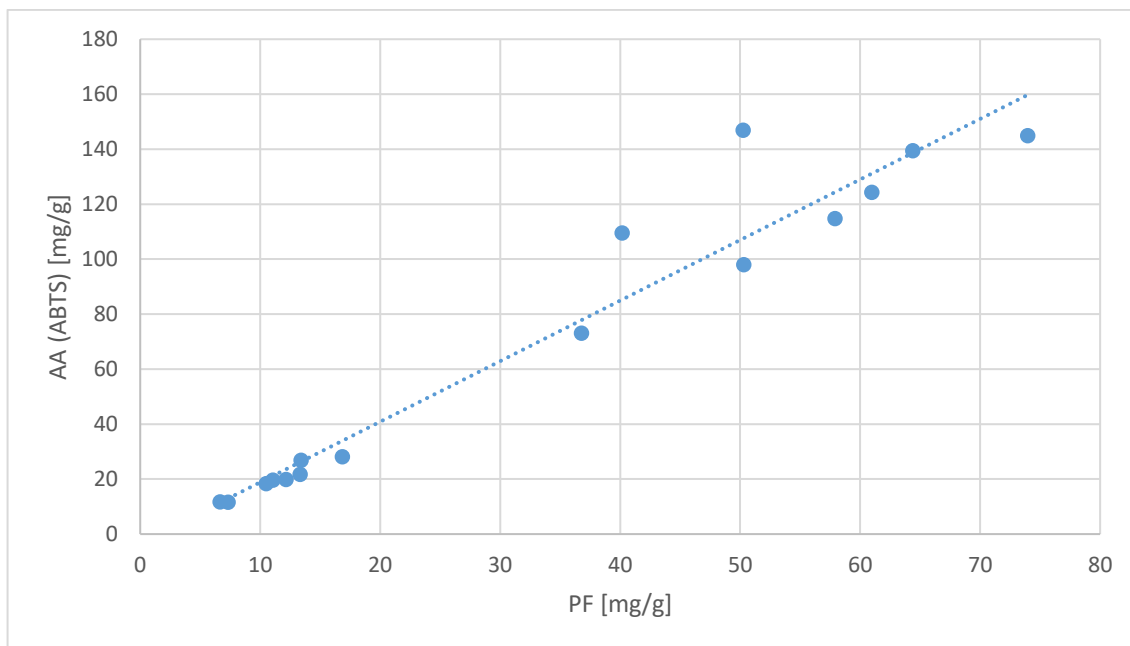


Obrázek 26: Hodnoty celkového obsahu polyfenolů extraktů rostlin a AA (DPPH)

Rovnice lineární regrese:

$$y = 3,8122 \cdot x - 6,6112$$

Korelační koeficient $R^2 = 0,9156$



Obrázek 27: Hodnoty celkového obsahu polyfenolů extraktů rostlin a AA (ABTS)

Rovnice lineární regrese:

$$y = 2,203 \cdot x - 3,1894$$

Korelační koeficient $R^2 = 0,939$

U vodných extraktů rostlin byla zjištěna korelace mezi AA, stanovenou pomocí metody DPPH a ABTS, a celkovým obsahem polyfenolů. U obou metod, ABTS i DPPH, bylo pozorováno, že se zvyšujícím se obsahem celkového množství polyfenolů rostou i hodnoty AA. Hodnoty korelačních koeficientů 0,9156 (DPPH) a 0,939 (ABTS) potvrzují, že je korelace kladná a téměř lineární. Z toho vyplývá, že za AA extraktů vybraných rostlin jsou z velké míry zodpovědné polyfenoly.

ZÁVĚR

Vybrané léčivé rostliny (heřmánek, meduňka, saturejka, lípa, kopřiva a pelyněk) jsou významnými rostlinami využívanými v různých odvětvích průmyslu. Ve farmaceutickém průmyslu a tradiční medicíně se díky svým antioxidačním, antimikrobiálním a protizánětlivým vlastnostem využívají např. na podpůrnou léčbu nachlazení, astmatu, nespavosti, na zmírnění bolesti. V kosmetickém průmyslu se jejich aromatické silice využívají do parfémů nebo pro výrobu tonik. Pro potravinářský průmysl jsou podstatné jejich antioxidační vlastnosti, díky kterým jsou schopny zabránit žluknutí tuků a tím zvyšovat údržnost potravin. Dále se využívají k dochucování pokrmů nebo na přípravu nálevů, čajů.

Cílem práce bylo stanovit antioxidační aktivitu (AA) extraktů jednotlivých rostlin, pomocí spektrofotometrických metod DPPH, IC_{50} a ABTS, a celkový obsah polyfenolických látek pomocí Folin-Ciocalteuovova činidla. Vodné extrakty byly připraveny z jednotlivých sušených bylin při dvou teplotách, 80 °C a 95 °C.

Z analýz extraktů léčivých rostlin bylo zjištěno, že extrakty meduňky a saturejky mají mnohonásobně vyšší antioxidační aktivitu při obou teplotách extrakce, zjištěnou jak metodou DPPH, tak ABTS, než měly extrakty heřmánku, lípy, pelyňku, a nejnižší hodnoty AA měly extrakty kopřivy.

Celkově lze konstatovat, že antioxidační aktivita extraktů dosahovala mírně vyšších hodnot při použití vyšší teploty (95 °C) při extrakci, až na několik výjimek. Vyšší teplota neovlivnila výrazně hodnoty AA extraktů při měření pomocí DPPH, kdy největší nárůst byl zjištěn u extraktu meduňky a saturejky. Při stanovení AA pomocí ABTS u rostlin extrahovaných při vyšší teplotě byl nejvýraznější nárůst hodnot antioxidační aktivity u saturejky, u dalších extraktů nebyl pozorován výrazný nárůst AA s vyšší teplotou extrakce.

Hodnoty IC_{50} byly stanoveny u extraktů s nejvyšší AA (meduňka a saturejka). Pomocí IC_{50} byla potvrzena vysoká antioxidační aktivita u extraktů meduňky a následně saturejky, podobně jako bylo zjištěno z výsledků metody DPPH.

Při stanovení celkového obsahu polyfenolů bylo opět zjištěno, že nejvyšší obsah polyfenolických látek mají extrakty meduňky a saturejky, a to jak při teplotě 80 °C, tak při teplotě 95 °C. Teplota ovlivnila celkový obsah polyfenolů v extraktech, kdy došlo k nárůstu množství vyextrahovaných polyfenolů, přičemž nejvyšší nárůst polyfenolů byl pozorován u extraktů připravených při teplotě 95 °C u saturejky a meduňky. U extraktů heřmánku, lípy, pelyňku a kopřivy byla vyšší teplota také zodpovědná za zvýšení celkového

obsahu polyfenolů, ale v menší míře. Celkově je patrné, že vyšší teplota extrakce měla pozitivní vliv na celkový obsah polyfenolů v extraktech rostlin. U vybraných léčivých rostlin byl zjištěn poměrně vysoký obsah polyfenolických látek, které mohou být zodpovědné za jejich vysokou antioxidační aktivitu.

Z hodnocení korelačních vztahů mezi AA (DPPH) a celkovým obsahem polyfenolů (PF), a mezi AA (ABTS) a PF, byla potvrzena vysoká lineární kladná korelace. Za antioxidační aktivitu těchto vybraných léčivých rostlin jsou z velké míry zodpovědné polyfenoly.

Na výsledky jednotlivých měření může mít vliv mnoho faktorů týkajících se konkrétních rostlin, jako je země pěstování, část použité rostliny, klimatické podmínky pěstování a sklizně, průmyslové zpracování a experimentální zpracování vzorků a také použité metody.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CHAMBRE, D. R., C. MOISA, A. LUPITU, L. COPOLOVICI, G. POP a D. M. COPOLOVICI. Chemical composition, antioxidant capacity, and thermal behavior of *Satureja hortensis* essential oil. *Scientific Reports*. 2020, **10**. ISSN 2045-2322.
- [2] MORADKHANI, H., E. SARGSYAN, H. BIBAK, B NASERI, M. SADAT-HOSSEINI, A. FAYAZI-BARJIN a H. MEFTAHIZADE. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. *Journal of Medicine Plants Research*. 2010, **4**. ISSN 1996-0875.
- [3] STANOJEVIĆ, L. P., M. Z. STANKOVIĆ, D. J. CVETKOVIĆ, M. D. CAKIĆ, D. P. ILIĆ, V. D. NIKOLIĆ a J. S. STANOJEVIĆ. The effect of extraction techniques on yield, extraction kinetics, and antioxidant activity of aqueous-methanolic extracts from nettle (*Urtica dioica* L.) leaves. *Separation Science and Technology*. 2016, **51**. ISSN 1520-5754.
- [4] CVETANOVIĆ, A., J. ŠVARC-GAJIĆ, P. MAŠKOVIĆ, S. SAVIĆ a L. NIKOLIĆ. Antioxidant and biological activity of chamomile extracts obtained by different techniques: perspective of using superheated water for isolation of biologically active compounds. *Industrial Crops and Products*. 2015, **65**. ISSN 0926-6690.
- [5] EL MIHYAOUI, A., J. C. G. ESTEVES DA SILVA, S. CHARFI, M. E. Candela CASTILLO, A. LAMARTI a M. B. ARNAO. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): A Review of Ethnomedicinal Use, Phytochemistry and Pharmacological Uses. *Life*. 2022, **12**. ISSN 2075-1729.
- [6] Obrázek: <https://www.bylinkyprovsechny.cz/byliny-kere-stromy/byliny/61-hermanek-pravy-ucinky-vliv-na-lidske-zdravi>
- [7] SRIVASTAVA, J. K., E. SHANKAR a S. GUPTA. Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. *Molecular Medivine Reports*. 2010, **3**. ISSN 1791-3004.
- [8] UBESSI, C., S. B. TEDESCO, C. DE BONA DA SILVA, R. WAGNER, B. KLEIN a J. L. ANDRIOLO. Chemical composition of chamomile essential oil cultivated with homeopathy. *Journal of essential oil research*. 2021, **33**, 342-350. ISSN 2163-8152.
- [9] CVENTANOVIĆ, A., J. ŠVARC-GAJIĆ, Z. ZEKOVIĆ, J. VULIĆ, P. MASKOVIĆ a G. ĆETKOVIĆ. Comparative analysis of antioxidant, antimicrobiological and cytotoxic activities of native and fermented chamomile ligulate flower extracts. *Planta*. 2015, **242**. ISSN 1432-2048.
- [10] SALEHI, B., A. VENDITTI, M. SHARIFI-RAD, et al. The Therapeutic Potential of Apigenin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, **20**. ISSN 1422-0067.

- [11] MIRAJ, S., R. KOPAEI a S. KIANI. *Melissa officinalis* L: A Review Study With an Antioxidant Prospective. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*. 2017, **22**. ISSN 2095-4964.
- [12] Obrázek: <http://www.avicenna.cz/item/melissa-officinalis-medunka-lekarska>
- [13] RIBEIRO, M. A., M. G. BERNARDO-GIL a M. M. ESQUÍVEL. *Melissa officinalis*, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2001, **21**. ISSN 0896-8446.
- [14] HAJJAJ, G., R. ALNAMER, Y. CHERRAH a A. ZELLOU. In Vivo Potential Anti-Inflammatory Activity of *Melissa officinalis* L. Essential Oil. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*. 2013, **2013**. ISSN 1687-6342.
- [15] ŚWIĄDER, K., K. STARTEK a C. H. WIJAYA. The therapeutic properties of Lemon balm (*Melissa officinalis* L.): Reviewing novel findings and medical indications. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2019, **92**. ISSN 1439-040X.
- [16] ČAVAR, S., M. E. ŠOLIĆ, M. MAKSIMOVIĆ. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Two *Satureja* Species from Mt. Biokovo. *Botanica Serbica*. 2014, **38**. ISSN 1821-2638.
- [17] Obrázek: <https://www.culinabotanica.cz/herbar/saturejka-zahradni>
- [18] POPOVICI, R. A., D. VADUVA, I. PINZARU, et al. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019, **18**. ISSN 1792-1015.
- [19] LÓPEZ-COBO, A., A. M. GÓMEZ-CARAVACA, J. ŠVARC-GAJIĆ, A. SEGURA-CARRETERO a A. FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of a Mediterranean plant: The case of *Satureja montana* subsp. *kitaibelii*. *Journal of Functional Foods*. 2015, **18**. ISSN 1756-4646.
- [20] ČAVAR, S., M. MAKSIMOVIĆ, M. E. ŠOLIĆ, A. JERKOVIĆ-MUJKIĆ a R. BEŠTA. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*. 2008, **111**. ISSN 0308-8146.
- [21] PHUEKVILAI, P. a K. WOLFF. Characterization of microsatellite loci in *Tilia platyphyllos* (*Malvaceae*) and cross-amplification in related species. *Applications in Plant Sciences*. 2013, **1**. ISSN 2168-0450.
- [22] ZIAJA, M., K. A. PAWŁOWSKA, K. JÓZEFczyk, A. PRUŠ, J. STEFAŃSKA a S. GRANICA. UHPLC-DAD-MS/MS analysis of extracts from linden flowers (*Tiliae flos*): Differences in the chemical composition between five *Tilia* species growing in Europe. *Industrial Crops and Products*. 2020, **154**. ISSN 0926-6690.
- [23] Obrázek: <https://www.herbofit.cz/herbar/lipa-obecna-tilia-vulgaris.html>

- [24] USLU, N., M. M. ÖZCAN, F. AL-JUHAIMI, K. GHAFOR, E. E. BABIKER, M. A. OSMAN a H. A. A. SALIH. The influence of sonication times on bioactive compounds, antioxidant activity values, and phenolic compounds of immature and mature types linden blossoms. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2022, **43**. ISSN 1745-4549.
- [25] KOWALSKI, R., T. BAJ, K. KALWA, G. KOWALSKA a M. SUJKA. Essential Oil Composition of *Tilia cordata* Flowers. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2017, **20**. ISSN 0972060X.
- [26] POLJŠAK, N. a N. KOČEVAR GLAVAČ. *Tilia* sp. Seed Oil—Composition, Antioxidant Activity and Potential Use. *Applied Sciences*. 2021, **11**. ISSN 2076-3417.”
- [27] JAN, K. N., K. ZARASFSHAN a S. SINGH. Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): a reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potential. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2017, **11**. ISSN 2193-4134.
- [28] Obrázek: <https://www.rebeccasherbs.com/pages/herb-article-br-nettle-leaf>
- [29] GAROFULIĆ, I. E., V. MALIN, M. REPAJIĆ, Z. ZORIĆ, S. PEDISIĆ, M. STERNIŠA, S. S. MOŽINA a V. DRAGOVIĆ-UZELAC. Phenolic Profile, Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity of Nettle Leaves Extracts Obtained by Advanced Extraction Techniques. *Molecules*. 2021, **26**. ISSN 1420-3049.
- [30] MUNDA, S., S. K. PANDEY, S. DUTTA, J. BARUAH a M. LAL. Antioxidant Activity, Antibacterial Activity and Chemical Composition of Essential Oil of *Artemisia vulgaris* L. Leaves from Northeast India. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2019, **22**. ISSN 0972060X.
- [31] Obrázek: <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Artemisia+vulgaris>
- [32] ZHIGZHITZHAPOVA, S. V., L. D. RADNAEVA, Q. GAO, S. CHEN a F. ZHANG. Chemical composition of volatile organic compounds of *Artemisia vulgaris* L. (*Asteraceae*) from the Qinghai–Tibet Plateau. *Industrial Crops and Products*. 2016, **83**. ISSN 0926-6690.
- [33] ABIRI, R. A. L. M. SILVA, L. S. SILVA DE MESQUITA, J. W. CARVALHO DE MESQUITA, N. ATABAKI, E. BEZERRA DE ALMEIDA, N. A. SHAHARUDDIN a S. MALIK. Towards a better understanding of *Artemisia vulgaris*: Botany, phytochemistry, pharmacological and biotechnological potential. *Food Research International*. 2018, **109**. ISSN 0963-9969.
- [34] MELGUIZO-MELGUIZO, D., E. DIAZ-DE-CERIO, R. QUIRANTES-PINÉ, J. ŠVARC-GAJIĆ a A. SEGURA-CARRETERO. The potential of *Artemisia vulgaris* leaves as a source of antioxidant phenolic compounds. *Journal of Functional Foods*. 2014, **10**. ISSN 1756-4646.

- [35] SHAHIDI, F. a Y. ZHONG. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 2015, **18**. ISSN 1756-4646.
- [36] ZHENG, W. a S. Y. WANG. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2001, **49**. ISSN 1520-5118.
- [37] ALAM, Md. N., N. J. BRISTI a Md. RAFIQUAZZAMAN. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013, **21**. ISSN 1319-0164.
- [38] GÜÇLÜ, K. a R. APAK. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2011, **30**. ISSN 0165-9936.
- [39] MUNTEANU, I. G. a C. APETREI. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, **22**. ISSN 1422-0067.
- [40] J. VUKOVIĆ, D. KREMER a S. VLADIMIR-KNEŽEVIĆ. Spectrophotometric method for polyphenols analysis: Prevalidation and application on *Plantago* L. species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005, **39**. ISSN 0731-7085.
- [41] EL GHARRAS, H. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science & Technology*. 2009, **44**. ISSN 1365-2621.
- [42] GRANATO, D., J. S. SANTOS, L. G. MACIEL a D. S. NUNES. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, **80**. ISSN 0165-9936.
- [43] SUN, M.F., C. L. JIANG, Y. S. KONG, J. L. LUO, P. YIN a G. Y. GUO. Recent Advances in Analytical Methods for Determination of Polyphenols in Tea: A Comprehensive Review. *Foods*. 2022, **11**. ISSN 2304-8158.
- [44] SÁNCHEZ-RANGEL, J. C., J. BENAVIDES, J. B. HEREDIA, L. CISNEROS-ZEVALLOS a D. A. JACOBO-VELÁZQUES. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*. 2013, **21**. ISSN 1759-9679.
- [45] ZEMÁNKOVÁ, D. *Změny obsahu polyfenolických látek a antioxidační aktivity v extraktech máty*. 2017. Univerzita Tomáše Bati.
- [46] PETKOVA, N., I. IVANOV, D. MIHAYLOVA a A. KRASTANOV. Phenolic acids content and antioxidant capacity of commercially available *Melissa officinalis* L. teas in Bulgaria. *Bulgarian Chemical Communications*. 2017, **49**. ISSN 0324-1130.
- [47] AĆIMOVIĆ, M., V. ŠEREGELJ, O. ŠOVLJANSKI, V. T. ŠAPONJAC, J. ŠVARC GAJIĆ, T. BREZO-BORJAN a L. PEZO. In vitro antioxidant, antihyperglycemic, anti-

inflammatory, and antimicrobial activity of *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. subcritical water extract. *Industrial Crops and Products*. 2021, **169**. ISSN 0926-6690.

[48] SOTIROPOULOU, N. S. a P. TARANTILIS. Evaluation of Antioxidant Activity, Toxicity, and Phenolic Profile of Aqueous Extracts of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) and Sage (*Salvia officinalis* L.) Prepared at Different Temperature. *Applied Sciences*. 2020, **10**. ISSN 2076-3417.

[49] TRIFAN, A., M. E. CZERVÍNSKA, C. MARDARI, G. ZENGIN, K. I. SINAN, I. KORONA-GLOWNIAK, K. SKALICKA-WOŹNIAK a S. V. LUCA. Exploring the *Artemisia* Genus: An Insight into the Phytochemical and Multi-Biological Potential of *A. campestris* subsp. *lednicensis* (Spreng.) Greuter & Raab-Straube. *Plants*. 2022, **11**. ISSN 2223-7747.

[50] HORŽIĆ, D., D. KOMES, A. BELŠČAK, K. K. GANIĆ, D. IVEKOVIĆ a D. KARLOVIĆ. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*. 2009, **115**. ISSN 0308-8146.

[51] MZID, M., S. B. KHEDIR, M. B. SALEM, W. REGAIEG a T. REBAI. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol and aqueous extracts from *Urtica urens*. *Pharmaceutical Biology*. 2017, **55**. ISSN 1744-5116.

[52] MIHAYLOVA, D., A. POPOVA a I. ALEXIEVA. The effect of extraction time on the antioxidant activity of fresh Bulgarian *Melissa officinalis* L. *Journal of BioScience and Biotechnology*. 2015, Special Edition. ISSN 1314-6246.

[53] FOTAKIS, C., D. TSIGRIMANI, T. TSIACA, et al. Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions. *Food Chemistry*. 2016, **211**. ISSN 0308-8146.

[54] ZEBIB, B. a M. OTHMANE. *Satureja myrtifolia* (Boiss. & Hohen.) Lebanese wild plant, as a resource of natural antioxidants. *Trends in Phytochemical Research*. 2017, **1**. ISSN 2588-3623.

[55] VINHA, A. F., M. O. SOARES, A. SANTOS, M. B. P. P. OLIVIERA a M. MACHADO. Phytochemical Characterization and Radical Scavenging Activity of Aqueous Extracts of Medicinal Plants from Portugal. *European Journal of Medicinal Plants*. 2012, **2**. ISSN 2231-0894.

[56] AKYÜZ, E. Optimizing Pulsed Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidants from Linden and Quantification by HPLC–PDA. *Food Analytical Methods*. 2022, **15**. ISSN 1936976X.

[57] FLÓREZ, M., P. CAZÓN a M. VÁSQUEZ. Antioxidant Extracts of Nettle (*Urtica dioica*) Leaves: Evaluation of Extraction Techniques and Solvents. *Molecules*. 2022, **27**. ISSN 1420-3049.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA	Antioxidační aktivita
PF	Celkový obsah polyfenolů
TE	Trolox
KG	Kyselina gallová
ABTS	2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
HORAC	Hydroxyl radical antioxidant capacity
CUPRAC	Cupric ion reduction antioxidant capacity
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
·OH	Hydroxylový radikál
·DPPH	Radikál DPPH
BHT	Butylhydroxytoluen
BHA	Butylhydroxyanisol

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Heřmánek pravý [6]	12
Obrázek 2: Vzorec apigeninu	13
Obrázek 3: Meduňka lékařská [12].....	14
Obrázek 4: Kyselina rozmarýnová	15
Obrázek 5: Saturejka zahradní [17]	16
Obrázek 6: Karvakrol.....	17
Obrázek 7: Lípa obecná [23]	18
Obrázek 8: Thymol	19
Obrázek 9: Kopřiva dvoudomá [28]	20
Obrázek 10: Kvercetin	21
Obrázek 11: Pelyněk černobýl [31]	22
Obrázek 12: Kyselina chlorogenová.....	23
Obrázek 13: DPPH· radikál	25
Obrázek 14: Radikálový kationt ABTS	26
Obrázek 15: Kyselina gallová.....	28
Obrázek 16: Kalibrační křivka troloxu pro stanovení AA pomocí metody DPPH	34
Obrázek 17: Kalibrační křivka troloxu pro stanovení AA pomocí metody ABTS	36
Obrázek 18: Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu polyfenolů	38
Obrázek 19: Hodnocení antioxidační aktivity (AA) extraktů bylin metodou DPPH při dvou teplotách.....	39
Obrázek 20: Hodnoty inaktivace extraktu meduňky 1	41
Obrázek 21: Hodnoty inaktivace extraktu meduňky 2	42
Obrázek 22: Hodnoty inaktivace extraktu saturejky 1.....	43
Obrázek 23: Hodnoty inaktivace extraktu saturejky 2.....	43
Obrázek 24: Hodnocení antioxidační aktivity (AA) extraktů bylin metodou ABTS při dvou teplotách.....	45
Obrázek 25: Hodnocení celkového obsahu polyfenolů (PF) extraktů bylin při dvou teplotách	47
Obrázek 26: Hodnoty celkového obsahu polyfenolů extraktů rostlin a AA (DPPH).....	49
Obrázek 27: Hodnoty celkového obsahu polyfenolů extraktů rostlin a AA (ABTS).....	50

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Seznam léčivých rostlin použitých v práci	31
Tabulka 2: Hodnoty IC ₅₀ vzorků meduňky a satirejky	44

