

Hodnocení antioxidační aktivity vybraných aromatických rostlin

Bc. Eva Szarowská

Diplomová práce

2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva SZAROWSKÁ**
Osobní číslo: **T10424**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Hodnocení antioxidační aktivity vybraných aromatických rostlin**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- 1. Antioxidanty, jejich zdroje a působení**
- 2. Charakteristika aromatických rostlin, jejich vlastnosti**
- 3. Přehled analytických metod využívaných pro stanovení antioxidační aktivity a polyfenolických látek**

II. Praktická část

- 1. Stanovení antioxidační aktivity ve vybraných aromatických rostlinách**
- 2. Stanovení celkového obsahu polyfenolů ve vybraných aromatických rostlinách**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. **VELÍŠEK, J. Chemie potravin 2. Tábor: OSSIS, 1999.**
2. **HINNEBURG, I., DORMAN, D.H.J., HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. Food Chemistry. 2006, 97(1), 122-129.**
3. **KUBÁŇ, V., KUBÁŇ, P. Analýza potravin. Brno: MZLU, 2007.**
4. **CAPECKA, E., MARECZEK, A., LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. Food Chemistry. 2005, 93(2), 223-226.**
5. **POKORNÝ, J., GORDEN, M. Antioxidants in Food – Practical Applications. Cambridge: Woodhead, 2001.**

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

Datum zadání diplomové práce: **1. února 2012**

Termín odevzdání diplomové práce: **2. května 2012**

Ve Zlíně dne 10. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: SZAROWSKA' EVA

Obor: THEV

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/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);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/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.

Ve Zlíně 2.5.2012

Eva Szarowska

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Teoretická část diplomové práce se zabývá popisem procesu oxidace, antioxidanty a jejich působením v potravinách a popisem metod stanovení antioxidační aktivity a polyfenolických látek. Dále je uvedena charakteristika aromatických rostlin (máta, meduňka, levandule, šalvěj, řepík, heřmánek, oregano a bazalka). Experimentální část se zabývá stanovením antioxidační aktivity aromatických rostlin metodou DPPH a stanovením celkového obsahu polyfenolických látek metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem.

Klíčová slova: Antioxidační aktivita, metoda DPPH, polyfenoly, aromatické rostliny

ABSTRACT

Theoretical part of the thesis is focused on the characterization of oxidation process, antioxidants and their effect in foods and description of methods for antioxidant activity and polyphenol determination. There are also described aromatic plants (mint, lemon balm, lavender, sage, agrimony, chamomile, oregano and basil). Experimental part deals with the determination of antioxidant activity of aromatic plants using DPPH method and quantity of polyphenols in aromatic plants using Folin-Ciocalteu agent.

Keywords: Antioxidant activity, DPPH method, polyphenols, aromatic plants

Chtěla bych poděkovat svojí vedoucí diplomové práce Ing. Soni Škrovánkové Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a čas, který mi věnovala při vypracovávání mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat laborantce Lence Škubalové za pomoc při měření v laboratořích.

Ráda bych také poděkovala celé své rodině, za všestrannou podporu po celou dobu mého studia.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 OXIDACE A OXIDAČNÍ REAKCE	13
1.1 OXIDACE LIPIDŮ	14
1.1.1 Mechanismus oxidace	14
▪ Iniciace	16
▪ Propagace	17
▪ Terminace.....	17
1.2 VLIV OXIDACE NA ORGANISMUS ČLOVĚKA	17
2 ANTIOXIDANTY	20
2.1 KLASIFIKACE ANTIOXIDANTŮ	24
2.1.1 Přírodní antioxidanty.....	26
2.1.1.1 Fenolové sloučeniny	27
2.1.1.2 Tokoferoly (vitamin E)	29
2.1.1.3 Kyselina askorbová (vitamin C)	30
3 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA	32
3.1 METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	32
3.2 STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU POLEFENOLŮ.....	36
4 AROMATICKÉ ROSTLINY	38
4.1 BAZALKA PRAVÁ.....	39
4.2 MÁTA PEPRNÁ	40
4.3 ŠALVĚJ LÉKAŘSKÁ.....	41
4.4 MEDUŇKA LÉKAŘSKÁ.....	42
4.5 OREGANO – DOBROMYSL OBECNÁ.....	43
4.6 LEVANDULE LÉKAŘSKÁ	44
4.7 ŘEPÍK LÉKAŘSKÝ.....	45
4.8 HEŘMÁNEK PRAVÝ	45
II PRAKTICKÁ ČÁST	47
5 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	48
6 MATERIÁL A PŘÍSTROJE	49
6.1 VZORKY AROMATICKÝCH ROSTLIN.....	49
6.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	49
6.3 POŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	49
7 METODIKA STANOVENÍ	51

7.1	STANOVENÍ OBSAHU SUŠINY	51
7.2	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU DPPH	51
7.2.1	Příprava výluhů aromatických rostlin	52
7.2.2	Optimalizace stanovení antioxidační aktivity aromatických rostlin	52
7.2.3	Stanovení antioxidační aktivity aromatických rostlin	53
7.2.4	Příprava standardního roztoku a kalibrační křivky kyseliny askorbové.....	53
7.2.5	Příprava vzorků a stanovení hodnoty IC ₅₀	54
7.3	STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU POLYFENOLŮ S FOLIN-CIOCALTEUOVÝM ČINIDLEM.....	54
7.3.1	Příprava výluhu aromatických rostlin	54
7.3.2	Optimalizace a stanovení celkového obsahu polyfenolických látek aromatických rostlin	55
7.3.3	Příprava standardního roztoku a kalibrační křivky kyseliny gallové	55
8	VÝSLEDKY A DISKUSE	57
8.1	STANOVENÍ SUŠINY	57
8.2	STANOVENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY KYSELINY ASKORBOVÉ PRO URČENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	58
8.3	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY AROMATICKÝCH ROSTLIN	59
8.3.1	Stanovení antioxidační aktivity máty	60
8.3.2	Stanovení antioxidační aktivity meduňky	62
8.3.3	Stanovení antioxidační aktivity levandule	66
8.3.4	Stanovení antioxidační aktivity šalvěže.....	67
8.3.5	Stanovení antioxidační aktivity heřmánku.....	67
8.3.6	Stanovení antioxidační aktivity řepíku.....	68
8.3.7	Stanovení antioxidační aktivity oregana	69
8.3.8	Stanovení antioxidační aktivity bazalky.....	72
8.3.9	Porovnání antioxidační aktivity aromatických rostlin.....	75
8.4	STANOVENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY KYSELINY GALLOVÉ PRO URČENÍ OBSAHU CELKOVÝCH POLYFENOLŮ	77
8.5	CELKOVÝ OBSAH POLYFENOLŮ	78
	ZÁVĚR	84
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	86
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	93
	SEZNAM OBRÁZKŮ	94
	SEZNAM TABULEK.....	95

ÚVOD

Ke zhoršující kvalitě potravin dochází při jejich zpracování a skladování, a to i díky oxidačním procesům. Degradace oxidačními procesy ovlivňuje především tuky, sacharidy a bílkoviny.

Oxidační reakce představují oxidačně-redukční reakce provázané přenosem elektronu mezi oxidovadlem a redukovadlem. Tyto oxidační reakce probíhají v potravinách hlavně u organických složek působením vzdušného kyslíku, ultrazvukem, při vyšších teplotách, ozáření ionizujícím zářením nebo působením těžkých kovů, a omezují údržnost mnohých produktů.

Jeden ze způsobů ochrany před nežádoucí oxidací jsou antioxidanty. Antioxidanty jsou látky, které chrání potraviny proti zkáze způsobené oxidací, například proti žluknutí tuků a ztrátě výživové hodnoty. Antioxidanty mohou být přírodního nebo syntetického původu. Léčivé rostliny používané v medicíně a tradičním léčitelství jsou jedním ze zdrojů antioxidantů.

Po chemické stránce antioxidanty představují skupinu látek, které se značně liší v chemické struktuře a mají rozdílný mechanismus působení na potraviny. Patří sem např. vitamin C a E, polyfenoly, flavonoidy (rutin, kvercetin, morin), silymarin, karotenoidy (β -karoten, lycopen, lutein), a některé stopové prvky (zinek, selen).

Během posledních desetiletí byla vyvinuta řada analytických metod ke stanovení tzv. celkové antioxidační aktivity (TAC tj. total antioxidant capacity). Metody jsou principiálně značně odlišné a jsou rozděleny do dvou skupin. První skupina zahrnuje metody založené na generaci různých radikálových částic a jejich eliminaci antioxidačními sloučeninami. Metody stanovení v této skupině zahrnují hodnocení TAC (DPPH, TEAC, ORAC) a metody hodnotící schopnost látek působit proti lipoperoxidaci. V druhé skupině jsou metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek (FRAP, cyklická voltametrie, HPLC s coulochemickou detekcí).

Ke stanovení obsahu celkových polyfenolů v potravinách se používají dvě metody, a to stanovení polyfenolů pomocí reakce s Folin-Ciocalteuovým činidlem a stanovení polyfenolů chromatograficky, zvláště pak metodou HPLC.

V této diplomové práci byla použita metoda DPPH pro hodnocení antioxidační aktivity aromatických rostlin a metoda s Folin-Ciocalteuovým činidlem pro stanovení obsahu celkových polyfenolů těchto aromatických rostlin.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OXIDACE A OXIDAČNÍ REAKCE

Ke zhoršující kvalitě potravin dochází při jejich zpracování a skladování, a to i díky oxidačním procesům. Degradace oxidačními procesy ovlivňuje především tuky, sacharidy a bílkoviny. [1]

Oxidační reakce představují oxidačně-redukční reakce provázané přenosem elektronu mezi oxidovadlem a redukovadlem. Při tomto ději je oxidovadlo látka, která je schopna elektron přijímat, tím se zvyšuje oxidační číslo atomu. Pokud je látka schopna elektron odevzdávat – redukovadlo a oxidační číslo atomu látky se snižuje. [2,3]

Tyto oxidační reakce probíhají v potravinách hlavně u organických složek působením vzdušného kyslíku, ultrazvukem, při vyšších teplotách, ozáření ionizujícím zářením, dále působením těžkých kovů nebo oxidačních produktů, jako jsou např. chinony, peroxid vodíku a hydroperoxydy. [2]

Působení atmosférického kyslíku na organické sloučeniny vede k změnám (rozklad lipidů), které omezují údržnost mnohých produktů. Při těchto změnách na potraviny působí větší množství energie, než kolik činí vazebná energie atomových spojení, a proto dochází ke štěpení těchto spojení. Rozštěpením kovalentních chemických vazeb vznikají volné radikály. [2]

Radikály mohou být definovány jako nestabilní (kyslíkové) molekuly, které mají nepárový elektron. Radikál tedy může být molekula, atom nebo ion schopný samostatné existence, který obsahuje alespoň jeden nepárový elektron. [4]

Radikály jsou obecně vysoce reaktivní částice. Ve snaze získat chybějící elektron jsou schopny rychle se vázat na jinou strukturu nebo elektron předat jiné molekule, nebo jí jej odebrat. Reaktivita volných radikálů se pohybuje podle Wettasinghe a Shahidi [34] od relativně nízké, jako je to v případě samotné molekuly kyslíku, až k velmi vysoké, jako je to v případě vysoce reaktivního hydroxylového radikálu $\text{OH}\cdot$. [5]

Mezi reaktivní formy kyslíku (ROS) patří volné radikály a neradikálové reaktivní formy. V tab. č. 1 je přehled ROS. [3,6]

Tab. 1. Přehled reaktivních forem kyslíku [3]

Volné radikály	Neradikálové reaktivní formy
Superoxid $O_2\cdot$	Peroxid vodíku H_2O_2
Hydroxylový radikál $HO\cdot$	Ozon O_3
Hydroperoxyl $HO-O\cdot$	Singletový kyslík 1O_2
Alkoxy $RO\cdot$	Kyselina chlorná $HClO$
Peroxy $ROO\cdot$	

Tyto reaktivní volné radikály vznikají v organické hmotě živočišného i rostlinného původu. Velice snadno reagují s různými biologickými strukturami např. s aminokyselinami, proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy, ale i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, mastnými kyselinami a lipidy. Volné radikály jsou nestabilní molekuly, které jsou schopny poškodit složky potravin a tím celou potravinu znehodnotit. [7]

1.1 Oxidace lipidů

Pokud volné radikály reagují s lipidy, dochází k jejich oxidaci, což vede k rozvoji žluknutí potravin, zejména tuků a v tučných rozpustných látek. Žluknutí je spojováno se vznikem nežádoucích látek (aldehydy, ketony, těkavé polymery a organické kyseliny), které mohou negativně ovlivňovat organoleptické vlastnosti (změnu chuti a aroma). Žluknutí v potravinách má za následek snížení trvanlivosti a výživové hodnoty potravin. [8]

Oxidace může být inhibována pomocí různých metod, včetně zamezení přístupu kyslíku, inaktivace enzymů způsobujících katalytickou oxidaci, použití vhodných obalů, nebo využívání nižších teplot při zpracování. [9]

1.1.1 Mechanismus oxidace

K procesu oxidace dochází cestou volného radikálového mechanismu. Reakce mezi kyslíkem a lipidy se nazývá autooxidací a je klasifikována jako řetězová reakce. Autooxidační

reakce jsou reakce, ve kterých reaguje vzdušným kyslík s nenasycenými sloučeninami. V průběhu radikálové řetězové reakce jsou patrné tři od sebe odlišné fáze: iniciace, propagace a terminace. Její zjednodušený mechanismus je uveden na obr. 1. Schéma oxidačního mechanismu je tedy platné pro sloučeniny s nasyceným i nenasyceným uhlovodíkovým řetězcem, který může obsahovat funkční skupiny nebo heteroatomy. Autooxidační řetězové reakce probíhají v kapalně nebo tuhé fázi a celkový průběh reakce je závislý na charakteru substrátu a reakčních podmínkách, které ovlivňují iniciační stádium reakce. [3,10,11]

Autooxidace mastných kyselin je nejběžnějším typem oxidace za podmínek, které přicházejí v úvahu při zpracování a skladování potravin. Při běžných teplotách se vzdušným kyslíkem oxidují jen nenasycené mastné kyseliny. Nenasycených mastných kyselin poměrně snadno se odštěpí atomy molekuly vodíku, alespoň vodík z methylenové skupiny sousedící s dvojnou vazbou. K odštěpení vodíku z dienových a trienových mastných kyselin je zapotřebí menší energie. Za vyšších teplot odpovídajících teplotám pečení, smažení a pražení dochází k autooxidaci i u nasycených mastných kyselin. [8]

V případě lipidů se zúčastňují autooxidačních reakcí především nenasycené řetězce mastných kyselin. Odštěpení vodíku je v těchto případech snadné a roste v řadě: monoenové, dienové, trienové řetězce mastných kyselin. K jeho odštěpení dojde vždy v sousedství dvojných vazeb. Rychlost oxidace je dána stupněm nenasycenosti řetězce mastných kyselin. [8]

Oxidační reakce lipidů, které probíhají v potravinách [8]:

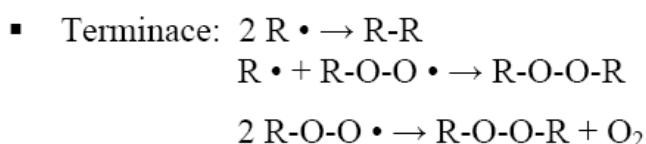
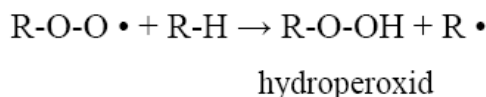
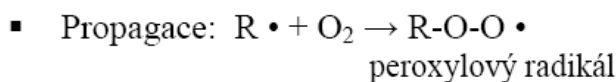
- oxidace vzdušným kyslíkem (tripletovým) – autooxidace
- oxidace singletovým kyslíkem – většinou jde o fotooxidaci
- oxidace katalyzovaná enzymy – např. liposygenasami
- oxidace těžkými kovy – např. železo a měď, mangan, kobalt, nikl a chrom.
- oxidace peroxidem vodíku a hydroperoxydy
- oxidace chinony a příbuznými sloučeninami – např. chinonmethid

Hydroperoxydy lipidů jsou primárními produkty autooxidace a snadno se rozkládají a vytváří volné radikály (peroxidový a alkoxylový radikál). Peroxid vodíku se také podílí na

vzniku volných radikálů. Primárním oxidačním produktem peroxidu vodíku je epoxid, který se ihned hydrolyzuje za vzniku dihydroxyderivátu. [8]

Reaktivní singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) vzniká excitací běžného tripletového kyslíku ($^3\text{O}_2$) za pomoci fotosenzibilizátorů. Singletovým kyslíkem pak může reagovat s dvojnou vazbou nenasycených lipidů a dalších nenasycených sloučenin. S běžnými nenasycenými mastnými kyselinami reaguje singletový kyslík minimálně 1450 krát rychleji než tripletový kyslík. [8]

Jako fotosenzibilizátory se označují sloučeniny, které katalyzují oxidaci organických látek vzdušným kyslíkem při ozáření viditelným světlem. Působí jako přenašeči absorbované energie, kterou předávají tripletovému kyslíku, ze kterého vzniká kyslík singletový. [8]



Obr. 1. Schéma autooxidačního mechanismu [10]

▪ Iniclace

V iniciační fázi jsou volné radikály tvořeny různými cestami, včetně reakcí kyslíku s nenasycenými lipidy, nebo oxidací polynenasycených mastných kyselin, katalyzovaných lipoxygenázou. Prvním stupněm reakce je vznik volného vodíkového radikálu ($\text{H} \cdot$) a volného radikálu mastné kyseliny ($\text{R} \cdot$), které vznikají hemolytickým štěpením kovalentní vazby C-H uhlovodíkového řetězce. Proces je urychlován přítomností kovových iontů (železo, měď), fotosenzitivních látek (chlorofyl, hematoporfyrin, flaviny včetně riboflavinu) a různými druhy záření (UV a radioaktivní záření). [8,12]

▪ Propagace

Během propagační fáze reagují vysoce reaktivní lipidové radikály ($R\cdot$) se vzdušným kyslíkem nebo odtrhují vodík jiným molekulám a vzniká peroxylový radikál ($R-O-O\cdot$). Peroxylový radikál je velmi reaktivní a odtrhne atom vodíku z další molekuly nenasyčené mastné kyseliny. Vznikne hydroperoxid ($R-O-OH$) a další volný radikál mastné kyseliny ($R\cdot$). Sled uvedených dvou reakcí propagačního stupně se může opakovat jednou, několikrát, až mnohokrát. Reakce volného radikálu mastné kyseliny s kyslíkem je mnohem rychlejší, než reakce peroxylového radikálu s uhlovodíkovým řetězcem lipidu. Peroxylový radikál reaguje s molekulou lipidu poměrně pomalu a tato reakce proto určuje rychlost autooxidace. [8,12]

▪ Terminace

Pokud je koncentrace volných radikálů během terminační fáze v reakčním systému dost vysoká, je pravděpodobné, že dva volné radikály spolu zreagují za vzniku stabilních sloučenin a dojde k ukončení řetězové reakce. Za omezeného přístupu kyslíku, kdy rychlost autooxidace závisí na jeho parciálním tlaku, jsou hlavními radikály v systému radikály mastné kyseliny ($R\cdot$) a hlavní terminační reakcí je jejich rekombinace. Pokud je dostatečný přístup kyslíku, rychlost reakce není nezávislá na jeho parciálním tlaku. Vzniká více peroxylových radikálů ($R-O-O\cdot$) a hlavními terminačními reakcemi jsou rekombinace radikálů mastných kyselin s peroxylovými radikály a vzájemné rekombinace peroxylových radikálů. [8]

1.2 Vliv oxidace na organismus člověka

Za normálních podmínek se v organismu člověka tvoří volné radikály a antioxidanty, které jsou spolu v rovnováze. Antioxidanty jsou látky, které chrání organismus člověka před účinky volných radikálů. Volné radikály jsou nežádoucí vedlejší produkty metabolismu a vznikající při uvolňování energie při maximálních tělesných zátěžích. Pokud se rovnováha mezi vznikem a odstraňováním volných radikálů a vznikem antioxidantů naruší, dojde k oxidačnímu poškození tzv. oxidačnímu stresu. [7,13]

Reaktivní formy kyslíku se účastní uvolňování a přeměny energie nutné pro životní pochody, jsou součástí enzymových mechanismů a některé z nich jsou významnými signálními molekulami v buněčném informačním systému. K jejich škodlivým účinkům dochází pouze tehdy, vymknou-li se přísné kontrole, kterou každý aerobní organismus získal v průběhu

vývoje biologického systému. Tímto mohou vyvolat nekontrolovatelnou oxidaci a poškodit tak rozmnožovací funkce buněk a oslabit imunitní systém organismu člověka. [7,13]

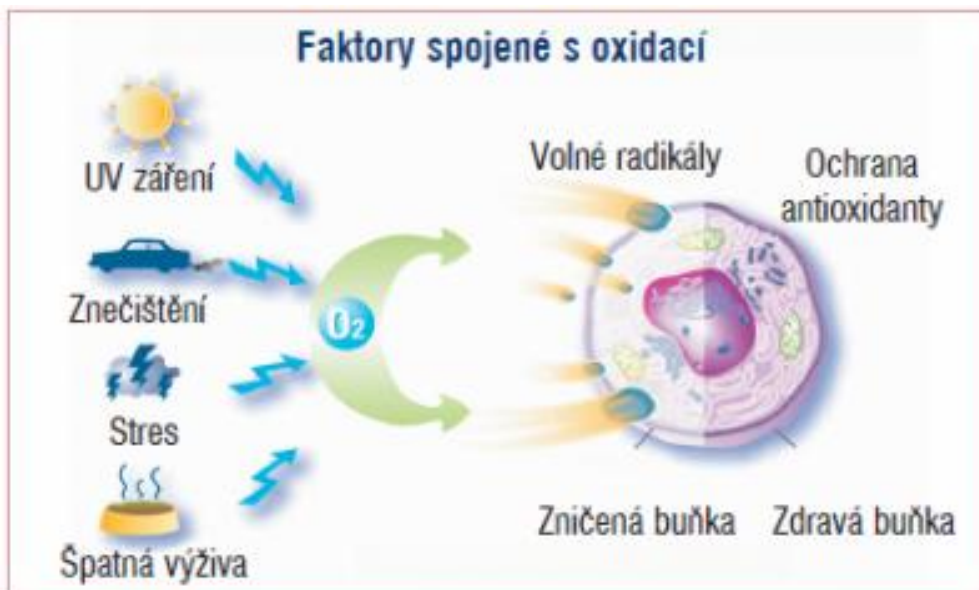
Mezi faktory (obr. 2), které ovlivňují tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) patří stresující situace, pylové nebo toxické znečištění vzduchu, vzrůstající věk, kouření, alkohol a některé potraviny (uzené maso). ROS hrají podstatnou roli při zahájení poškození tkáně, což způsobuje porušení DNA a tím i zvýšení rizika vzniku rakoviny. Narušuje se imunitní systém a rovněž se zvyšuje oxidace polynenasycených mastných kyselin stejně jako u reaktivních forem dusíku (RNS). [5,6]

Mezi reaktivní formy dusíku (RNS) patří: oxid dusnatý (NO), oxid dusičitý (NO₂), nitrosonium (NO⁺), nitroxyl (NO⁻), kyselina dusitá (HNO₂), oxid dusitý (N₂O₃), oxid dusičitý (NO₂) a další. [30]

Oxidované lipidy jsou další látky, které mohou mít účinek na lidské zdraví. Při vyšším příjmu oxidovaných tuků se zvyšuje jejich hladina v krevním séru. Oxidované mastné kyseliny nebo vzniklé volné radikály oxidovaných tuků reagují s některými bílkovinami krevního séra a cévních stěn za vzniku atherosklerotických usazenin. Oxidační produkty lipidů a jejich volné radikály mohou také reagovat s nukleovými kyselinami a jejich pozměněním mohou usnadnit vznik zhoubného nádorového bujení. [8]

Z těchto důvodů se doporučuje při zvýšeném příjmu snadno oxidovatelných polyenových lipidů zvýšit hladinu přijímaných přirozených antioxidantů, hlavně tokoferolů a karoten. [8]

Na lékařské fakultě univerzity v Denveru v USA zjistili, že na základě laboratorních a klinických studií zkoumaných podle Prasad a kol. [9] se zdá, že ROS a RNS, které jsou vytvářeny extracelulárně různými mechanismy, patří mezi hlavní zprostředkovatele rizikových faktorů, které mohou zahájit a podporovat neurodegeneraci u Alzheimerovy choroby.



Obr. 2. Působení volných radikál [14]

2 ANTIOXIDANTY

Antioxidanty jsou látky, které prodlužují údržnost potravin tak, že je chrání před znehodnocením způsobené oxidací, jejíž projevem je žluknutí přítomných tuků a dalších snadno se oxidujících látek. Oxidace lipidů vyvolává v potravinách další chemické změny, které mohou negativně ovlivnit jejich výživovou hodnotu, hygienicko technologickou a senzorní hodnotu, které se projevují změnou barvy, chuti a vůně. [11]

Protože antioxidanty brání oxidacím a tím prodlužují přirozenou údržnost potravin, jsou označovány jako inhibitory oxidace. Po chemické stránce antioxidanty představují skupinu látek, které se značně liší v chemické struktuře a mají rozdílný mechanismus působení na potraviny. Patří sem např. vitamin C a E, polyfenoly (jednoduché fenoly – thymol, karvakrol, hydrochinon, guajakol a isoeugenol, fenolové kyseliny – skořicová, salicylová a kávová kyselina a její ester kyselina rozmarýnová), flavonoidy (rutin, kvercetin, morin, robinetin a myricetin), silymarin, karotenoidy (karoteny, lykopen, lutein), a některé stopové prvky (zinek, selen). [13,31]

Antioxidační vlastnosti vykazuje řada rostlinných potravinářských materiálů. Po staletí se k prodloužení údržnosti potravin používají převážně různé byliny a koření. Zvláště účinné jsou rozmarýn a šalvěj, ale i další, např. oregano, tymián, hřebíček a kurkuma. Ovoce, zelenina, obiloviny, čaj a víno jsou další potravinářské komodity, které vykazují antioxidační vlastnosti. [1,11]

Příjem těchto potravinových komodit není vždy dostačující. Z tohoto důvodu se staly v posledních několika letech důležitými studie možných nových zdrojů antioxidantů. Nové zdroje antioxidantů mohou být použity buď pro přímou spotřebu nebo pro výrobu potravinových doplňků, které by mohly být použity pro obohacení potravin s cílem zvýšit jejich nutriční hodnotu. [15,31]

Přírodní antioxidanty získávané z rostlin jako silice vykazují antioxidační aktivitu, ale také nesou příchut' a vůni po použitých rostlinách. Tyto silice mají často omezené použití, protože mohou vykazovat hořkou chuť. [11]

Dosud bylo izolováno, identifikováno a testováno přes 5000 přírodních antioxidantů. Některé zdroje antioxidantů v potravinách rostlinného původu s příklady zástupců jsou uvedeny v tab. 2.

Tab. 2. Příklady antioxidantů obsažených v potravinách rostlinného původu [65]

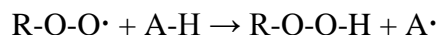
Antioxidant	Zdroj	Zástupce
Tokoferoly, tokotrienoly:	rostlinné oleje	α -tokoferol
Askorbová kyselina:	ovoce, zelenina	
Flavonoidy:		
flavanoly	zelený a černý čaj	katechiny
flavony	celer, petržel	apigenin
flavonoly	pórek, brokolice, grapefruit, černý čaj, cibule, jablka, olivový olej, čaj	Kaemferol, kvercetin
flavanony	citrusové plody	naringenin, hesperetin
isoflavony	sója	daidzein, genistein
anthokyanidiny	maliny, jahody, červené hrozny, pšenice, rýže, kukuřice, rajčata	kyanidin
Fenolové kyseliny:		
hydroxyskořicové	olivy, káva, bílé víno, špenát	kávová kyselina, ferulová kyselina
hydroxybenzoové	řepka, pšenice	syringová kyselina
Karotenoidy:	ovoce, zelenina, palmový olej	β -karoten

Kromě antioxidantů existují látky, kterým se říká synergisti. Samy o sobě nevykazují antioxidační aktivitu, ale mohou zvýšit účinnost působení antioxidantů. Jedná se nejčastěji o vícesytné kyseliny, např. kyselina citrónová, vinná, jablečná, askorbová nebo kyselina fosforečná. [7]

▪ Mechanismus účinku antioxidantů

Antioxidanty účinně brzdí řetězovou autooxidační reakci lipidů tím, že reagují s hydroperoxidovým radikálem na hydroperoxid nebo jiný neradikálový lipidový produkt. Vzniklý volný radikál $A\cdot$ je poměrně málo reaktivní a není schopen vyvolat další řetězovou reakci. [7,11]

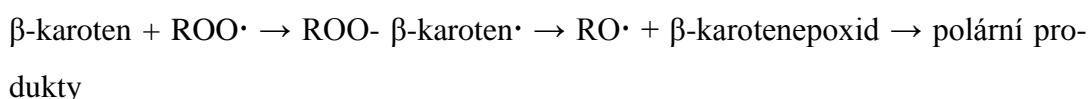
Reakce antioxidantu s hydroperoxidovým radikálem: [11]



Úloha antioxidantu tedy spočívá ve zkrácení autooxidačního řetězce a zvýšení rychlosti terminačních reakcí. Při reakci se antioxidant spotřebovává. Když je všechen antioxidant spotřebován, začne autooxidace probíhat tak, jakoby žádné antioxidanty nebyly přítomny. Antioxidanty tedy nemohou úplně zastavit autooxidační reakci, jen ji zpomalit, v ideálním případě až na rychlost iniciační reakce. [8]

Další reakce antioxidantů s hydroperoxidovým radikálem:

1. β -karoten zachytí svým konjugovaným systémem hydroperoxidový radikál $\text{ROO}\cdot$ za vzniku rezonancí stabilizovaného systému, kde se rozštěpí na alkoxylové radikály a stabilizují se jako epoxidy, karbonylové sloučeniny a další. [36]

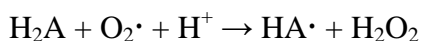
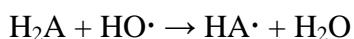
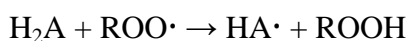


V přítomnosti malého množství kyslíku je β -karoten účinnější, kdy stabilizovaný systém reaguje s dalším hydroperoxylem za vzniku produktů, s významem jako aritické látky potravin. [36]



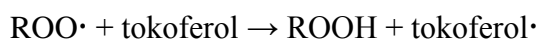
β -karotenu může zhaset singletový kyslík za vzniku tripletového kyslíku a excitovaného β -karotenu. [36]

2. Reakce kyseliny askorbové a hydroperoxidovým nebo alkoxylovým radikálem lze znázornit na sledující reakci. Vzniklý askorbylradikál ($\text{HA}\cdot$) již není schopen vyvolat další reakci a rozpadá se na kyselinu askorbovou a dehydroaskorbovou. [36]

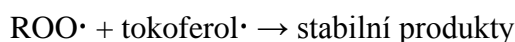


Kyselina askorbová může reagovat s toxickými formami kyslíku, jako je hydroxylový radikál, superoxidový radikál nebo singletový kyslík. Všechny tyto typy reakcí mají za následek zpomalení oxidace lipidů. [36]

3. Tokoferoly reagují s řadou volných radikálů, včetně aktivních forem kyslíku. Jedna molekula tokoferolu může reagovat se dvěma molekulami hydroperoxylového radikálu. Autooxidaci inhibují tím, že reagují s hydroperoxidovými radikály lipidů za vzniku hydroperoxidů a radikálů tokoferolů, čímž přerušují řetězovou radikálovou reakci již v propagační fázi. [11]



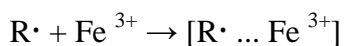
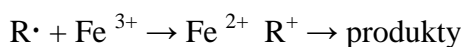
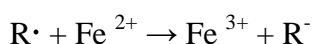
V terminační fázi autooxidační reakce se tokoferol stabilizuje nevratnou reakcí s jinými radikály. Nejčastěji s peroxylovým radikálem. [11]



Tokoferoly také mohou reagovat se singletovým kyslíkem, a to tak, že s ním reaguje za vzniku různých oxidačních produktů, nebo jej zhasí podobně jako β -karoten. [11]

Pomocí kovů (Fe, Cu a Co) může dojít k inhibici oxidace. Pokud se zvýší koncentrace volných radikálů, dochází k převaze terminačních reakcí a kovy pak působí na oxidaci inhibičně. Nebo k inhibici může dojít, pokud jsou kovy přítomny ve vyšším množství. Předpokládá se, že důvodem je oxidace a redukce volných radikálů uhlovodíků ionty Fe a Cu na příslušné anionty a vznik komplexu volných radikálů. [8]

Např. reakce s ionty Fe:



▪ Působení antioxidantů na organismus

Mnoho lidských nemocí je způsobeno nebo ovlivněno volnými radikály. Přírozená obrana lidského organismu proti tomuto působení, není vždy dostatečná a to především v důsledku výrazné expozice volných radikálů z vnějších zdrojů v dnešním světě. Příjem antioxidantů hraje důležitou roli v ochraně lidského organismu proti působení volných radikálů. Mnoho klinických a epidemiologických studií ukazuje spojení mezi antioxidační aktivitou

látek přítomných v potravinách a nemocemi jako jsou kardiovaskulární onemocnění či karcinogeneze. Z podnětu působení volných radikálů mohou také vzniknout tyto onemocnění: záněty kloubů, alergie, astma, choroby jater, mozková mrtvice, Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba, stárnutí pokožky, šedý zákal a záněty slinivky břišní. [15,4,37]

V lidském organismu tvoří ochranu před oxidačním poškozením nejen antioxidanty syntetizované v těle, ale i ty, které přijímáme potravou. Antioxidanty hrají důležitou roli v prevenci různých degenerativních chorob a proto je konzumace antioxidantně působících látek spojována např. se sníženým rizikem rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění. Např. léčivé rostliny používané v medicíně a tradičním léčitelství jsou jedním ze zdrojů antioxidantů, které jsou schopny deaktivovat volné radikály, a proto můžou mít pozitivní vliv na lidský organismus. [15,31]

Poslední výzkumy ale ukazují, že u některých antioxidantů přijímaných jako potravinový doplněk (vyrobený v syntetické formě) dochází při dlouhodobém užívání k tzv. zvratu antioxidantů, kdy se jeho antioxidantní účinek změní v prooxidační, tj. vysoce nežádoucí. Tato vlastnost, jejíž mechanismus není doposud pochopen, byla pozorována u betakarotenu (provitaminu vitamínu A), vitamínu C a flavonoidů. U antioxidantů přijímaných přirozenou cestou prooxidační účinek zaznamenám doposud nebyl. [33]

2.1 Klasifikace antioxidantů

Obecně platí, že antioxidanty mohou být klasifikovány:

a) dle původu na přírodní a syntetické antioxidanty

Přírodní antioxidanty se vyskytují běžně jako součást silic a tuků přírodních látek. Silice se získávají např. ze zeleniny (mrkev, cibule a česnek) a ovoce (grapefruit a červené hrozny), z bylin a koření (rozmarýn a kmín), dále z obilovin a olejnin (oves, olivy). Nemají konstantní složení a jejich získávání je ekonomicky nevýhodné. [3]

Mezi nejznámější přírodní antioxidanty patří vitamin C a E, polyfenoly a flavonoidy (rutin, kvercetin, morin), silymarin a karotenoidy (karoteny, lykopen, lutein). Také některé stopové prvky vykazují značnou antioxidantní kapacitu, např. zinek a selen. [13]

Z přírodních antioxidantů jsou jako aditiva (E – kódy) povoleny pouze tokoferoly a askorbová kyselina. Přehled povolených aditiv v České Republice je uveden v tabulce 3. [1,3]

Syntetické antioxidanty jsou průmyslově vyráběné sloučeniny, které se v přírodě nevyskytují a používají se stejně jako přírodní antioxidanty. Mezi ně patří např. butylhydroxyanisol BHA, butylhydroxytoluen BHT a galláty. [11]

Tab. 3. Seznam povolených antioxidantů v ČR [39]

E - kód	Antioxidant
E 297	Fumarová kyselina
E300	Askorbová kyselina
E301	Askorbát sodná
E302	Askorbát vápenatý
E304	(i) askorbylpalmitát, (ii) askorbylsteárat
E306	Přírodní extrakt s vysokým obsahem tokoferolů
E307	α - tokoferol
E308	β - tokoferol
E309	γ - tokoferol

b) *dle jejich funkce. Antioxidanty interferují s procesem oxidace lipidů a jiných oxylabilních sloučenin tak, že [11]*

- antioxidanty reagují s volnými radikály (antioxidanty primární), nebo redukují vzniklé hydroperoxydy (antioxidanty sekundární).
- antioxidanty reagují s katalyticky působícími kovy a váží je do komplexů.
- antioxidanty reagují s přítomným kyslíkem a eliminují ho z uzavřeného prostředí (kyselina askorbová, její sodná sůl a askorbylpalmitát).

K primárním antioxidantům patří všechny povolené látky např. kyselina askorbová a erythorbová a jejich deriváty, tokoferoly, fenolové antioxidanty a galláty. Mezi sekundární antioxidanty náleží např. cystein a peptidy obsahující cystein, lipoová kyselina, methionin aj. přirozeně se vyskytující sloučeniny, které se jako antioxidanty nepoužívají. [5,11]

c) *dle struktury na fenolové, endioly a jiné látky.*

- Z povolených přírodních látek náleží k fenolům tokoferoly, fenolové antioxidanty, galláty, ale i řada dalších sloučenin přítomných v potravinách, koření a jiných přírodních materiálech. [5,11]

- Endiolů z povolených látek zahrnujou pouze kyselinu askorbovou, erythorbovou a jejich soli aj. deriváty. [11]
- Aj. látky: kurkuminoidy a amidy. [11]

2.1.1 Přírodní antioxidanty

Antioxidační vlastnosti vykazuje řada rostlinných potravinářských materiálů. Některé druhy koření, ovoce, zelenina, obiloviny, čaje a vína jsou přírodními zdroji antioxidantů. [11]

Přehled přírodních antioxidantů: [11]

- Jednoduché fenoly (hydrochinon, guajakol, isoeugenol, thymol, karvakrol)
- Fenolové kyseliny a jejich deriváty (kyselina benzoová a její deriváty, kyselina skořicová a její deriváty, kyselina kávová)
- Estery (nejběžnějšími estery fenolových kyselin jsou depsidy, např. kyselina chlorogenová odvozená od chinové kyseliny nebo estrem kyseliny kávové je kyselina rozmarýnová)
- Glykosidy (verbaskosid, cichorová kyselina a sinapin)
- Amidy (vysoce aktivní antioxidanty fenolových kyselin, např. kapsaicin)
- Ligniny (dimery vzniklé spojením dvou fenylypropanových jednotek, např. nordihydroguajaterová kyselina, sesamin)
- Kurkuminoidy (oddénky kurkumy obsahují žluté pigmenty kurkumin, demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin)
- Diterpeny a chinony (nejaktivnější fenolový diterpen je karnosová kyselina a karnosol, chinony jsou odvozené látky od diterpenů a patří sem rosmarichinon a miltiron)
- Triterpeny a steroly (mezi triterpeny patří betulinová, oleanolová a ursolová kyselina, malou antioxidační aktivitu vykazují fytosteroly, např. avenasterol)
- Flavonoidy (primární antioxidanty, např. myricetin, kvercetin, fisetin, naringenin a hesperetin)

Po staletí se k prodloužení údržnosti potravin používají převážně různé byliny a koření. Zvláště účinné jsou rozmarýn a šalvěj, ale i oregano, tymián, hřebíček, kurkuma a ovesná mouka. Přírodní antioxidanty získávané z rostlin, nejčastěji jako extrakt, mají často omezené použití, neboť mohou vykazovat vůni po použitých rostlinách nebo hořkou chuť. [11,15]

2.1.1.1 Fenolové sloučeniny

Fenoly patří k velmi významné skupině rostlinných antioxidantů, které mají na aromatickém kruhu jednu až tři hydroxylové funkční skupiny v různých polohách. Existuje několik skupin rostlinných fenolů, u kterých je znám nebo se předpokládá antioxidační účinek. Jedná se především o látky přírodního původu, které jsou tvořené regulovanou biosyntézou v rostlinách. [17]

Antioxidační účinek fenolů závisí především na počtu a poloze hydroxylových skupin, na přítomnosti hlavních substituentů a na dalších faktorech. Aktivnějšími antioxidanty jsou obecně skořicové kyseliny a *o*-difenyly, např. kávová kyseliny a její depsid chlorogenová kyselina. Aktivitu také vykazují řada dalších derivátů fenolových kyselin, např. glykosidy a amidy. [33]

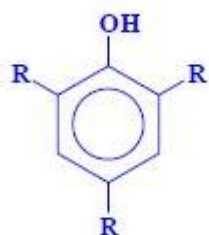
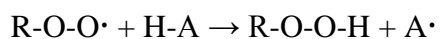
Mezi jednoduché fenolové sloučeniny patří fenolové kyseliny, jejichž zástupcem je kyselina gallová, která se vyskytuje např. v pivu, vínu, ovoci a zelenině. Další významnou látkou fenolových sloučenin je thymol a karvakrol, které jsou obsaženy hlavně v tymiánu, mateřídoušce, oreganu ale i v jiných kořeních. Kyselina rozmarinová se vyskytuje v rozmarýně lékařské a šalvěji lékařské, verbaskosid je obsaženo v olivě evropské a divizně lékařské. Fenolové kyseliny a jejich deriváty vykazují účinky primárních antioxidantů a jejich aktivita závisí na počtu hydroxylových skupin v molekule. [11,33]

Ze složitějších fenolových sloučenin, které mají výrazný antioxidační účinek, jsou významné flavonoidy, jako je rutin obsažený v pohance, dále silymarin obsažený v ostropestřci mariánském, zelenině (hrách, fazole), katechiny v zeleném čaji a resveratrol v hroznech révy vinné. [33]

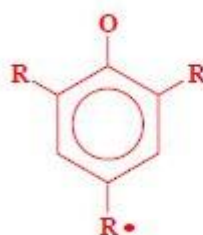
Z výše uvedeného výčtu je zřejmé, že se jedná o širokou skupinu látek, u kterých lze předpokládat výrazný antioxidační potenciál. Proto se odborníci shodují na tom, že účinek při-

rozených antioxidantů přijímaných přirozeně (např. v čajích) je výrazně vyšší než u stejné dávky podané v čisté podobě jako potravinový doplněk. [33]

Mechanismus účinku primárních fenolových antioxidantů:



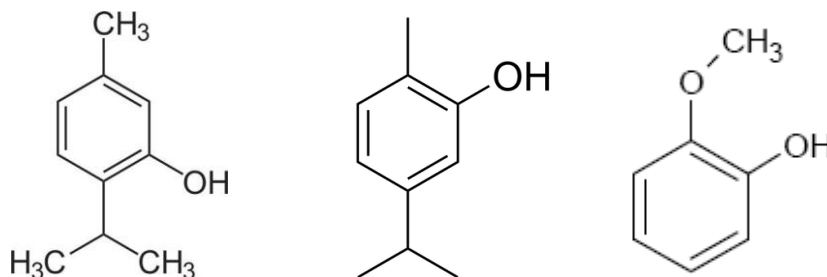
H-A (antioxidant)



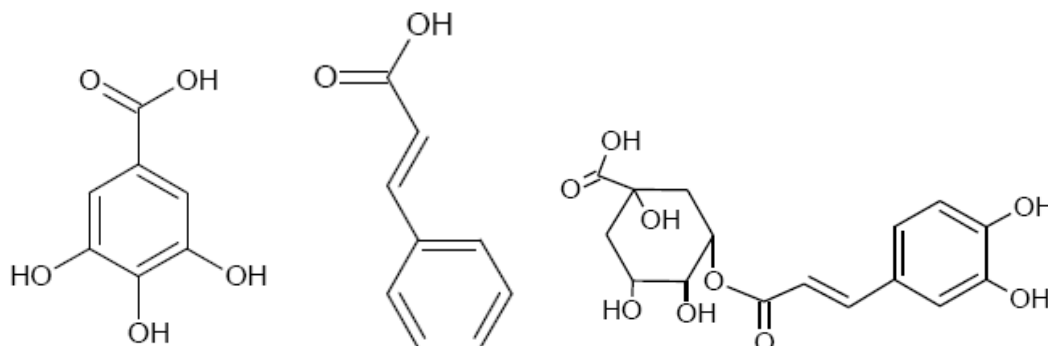
A· (radikal antioxidantu)

Obr. 3. Reakce primárních fenolových antioxidantů

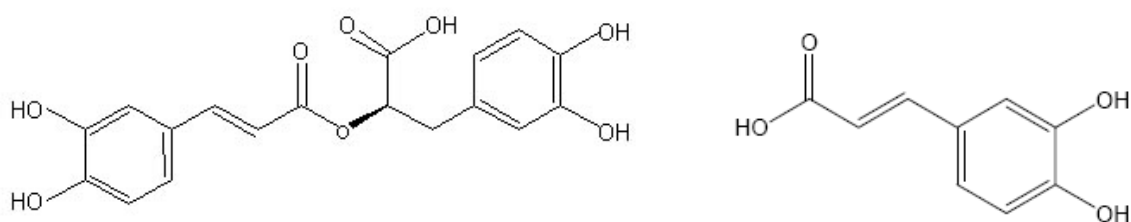
Zde jsou uvedeny vybrané fenolové sloučeniny:



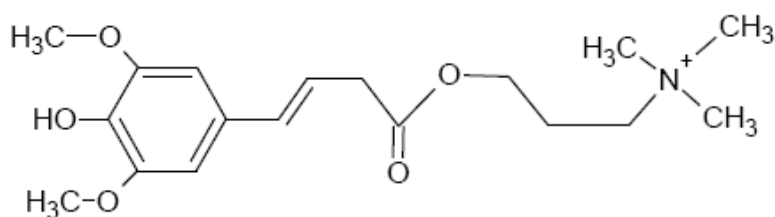
Obr. 4. Thymol, karvakrol a guajakol



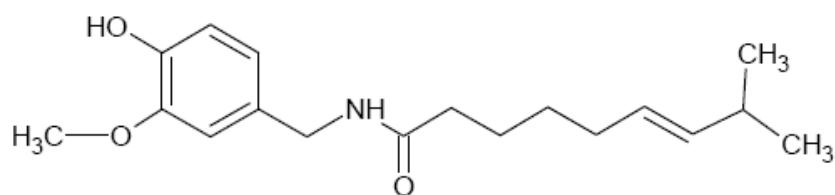
Obr. 5. Kyselina gallová, kyselina skořicová a kyselina chlorogenová



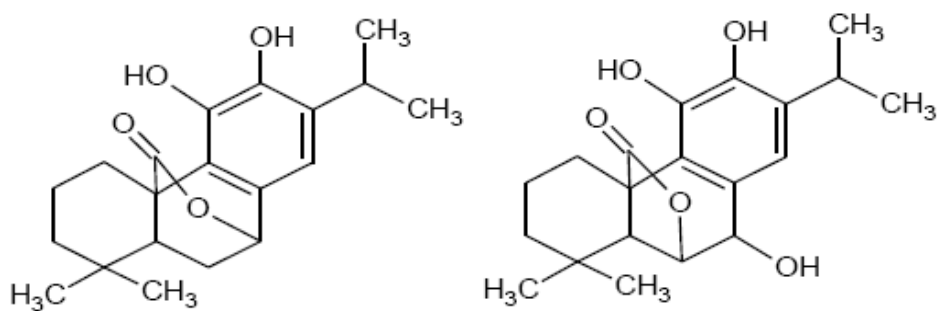
Obr. 6. Kyselina rozmarýnová a kávová



Obr. 7. Sinapin



Obr. 8. Kapsaicin



Obr. 9. Karnosol a rosmarol

2.1.1.2 Tokoferoly (vitamin E)

Tokoferoly patří mezi vitaminy, které mají antioxidační účinek. Vitamin E je lipofilní vitamin, není to jednotná látka, ale je směsí tokoferolů: α -, β -, γ - a δ -tokoferolu. [3,36]

Vitamin E, významný antioxidant, který se uplatňuje v prevenci onemocnění srdce a cév a nádorových onemocnění. Chrání nenasycené mastné kyseliny před znehodnocením, při jejich vyšším příjmu by měl být vyšší příjem i vitamínu E. [13]

Biologická aktivita vitamínu E souvisí s antioxidačními účinky, za nejúčinnější antioxidant (*in vivo*) se považuje α -tokoferol. Antioxidační aktivita tokoferolů a tokotrienolů přítomných v potravinových lipidech závisí na řadě faktorů. Jedním z faktorů je složení nenasycených mastných kyselin. Za podmínek skladování jsou např. tokoferoly účinnějšími antioxidanty v živočišných tucích, než rostlinné oleje, které obsahují vyšší množství linolové kyseliny (např. slunečnicový olej). [36]

Živočišné tuky obsahují vitamin E mnohem méně než rostlinné oleje. Z živočišných tuků nejvíce vitaminu E je v másle, vepřovém sádle a hovězím loji. Na rozdíl od jiných lipofilních vitaminů se vitamin E nevyskytuje ve větším množství v rybích tucích. Nevíce vitamínu E obsahují rostlinné oleje. Největší množství vitamínu E je obsaženo v oleji z obilných klíčků, v panenském surovém oleji, a méně pak v rafinovaném oleji. Vitamin E je také lokalizován v klíčku a otrubách obilovin, proto celozrnné mouky mají vyšší obsah vitamínu než bílé mouky. I v ovoci a zelenině se nachází vitamin E, ale jeho obsah je menší, než v rostlinných olejích. [36]

Tokoferoly a tokotrienoly jsou monoethery příslušných hydrochinonů a proto se snadno oxidují např. železitými iony, hydroperoxydy lipidů, ozonem a oxidačními činidly. Vznikají příslušné chinony (tokoferylchinony neboli tokochinony). Pokud jsou tokoferylchinony redukovány, vznikají příslušné tokoferyllhydrochinony neboli tokohydrochinony. [36]

Mechanismus oxidačního účinku vitamínu E je obdobný jako účinek ostatních lipofilních antioxidantů, např. fenolových antioxidantů. Tokoferoly reagují s řadou volných radikálů včetně aktivních forem kyslíku. Autooxidaci lipidů inhibují tak, že reagují s peroxylovými radikály lipidů za vzniku hydroperoxidů a radikálů tokoferolů. Dojde k přerušení radikálové řetězové reakce v propagační fázi. V terminační fázi se radikál tokoferolu stabilizuje nevratnou reakcí s jinými radikály, nejčastěji s druhým hydroperoxylovým radikálem. [36]

2.1.1.3 Kyselina askorbová (vitamin C)

Stejně jako tokoferoly, tak i kyselina askorbová se řadí mezi vitaminy, které mají antioxidační účinek. Kyselina L-askorbová je ve vodě rozpustná. [13]

Kyselina askorbová se využívá jako potravinářské aditivum především ve vodě rozpustný askorbát sodný a lipofilní estery nasycených mastných kyselin, askorbylpalmitát a askorbylsteárat. [36]

Kyselina askorbová neboli vitamin C se nachází v potravinách hlavně v čerstvém ovoci a zelenině, v živočišných potravinách je přítomen ve velmi malém množství. Bohatým zdroje jsou: rakytník, šípky, černý rybíz, křen, citrusové plody, kiwi, brokolice, rajčata, zelená paprika, kysané zelí. [13]

Nejvýznamnější reakcí kyseliny askorbové je oxidace vzdušným kyslíkem (autooxidace). Probíhá v přítomnosti i v nepřítomnosti iontů přechodných kovů. Aktivními kovy jsou trojmocné železo a dvojmocná měď. Rychlost reakce je závislá na pH prostředí. Pokud je prostředí kyselé, rychlost reakce je pomalejší. V neutrálním prostředí je rychlost reakce vyšší a nejrychlejší je v alkalickém prostředí. [36]

Nejenom kyselina askorbová, ale i její isomery a deriváty mohou reagovat s volnými radikály. Dochází tedy k brzdění řetězové autooxidační reakce, a proto účinně působí jako antioxidanty. Kyselina askorbová je účinnější, pokud se použije v kombinaci s tokoferoly. [36]

V mechanismu řetězové autooxidační reakci kyselina askorbová reaguje s peroxylovým radikálem mastné kyseliny nebo s alkoxylovým radikálem. Vzniká askorbylradikál, který již není schopen vyvolat další řetězovou reakci a disproportionuje se na askorbovou a dehydroaskorbovou kyselinu. [36]

3 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

V posledních letech je intenzivně studována role volných radikálů, které vznikají *in vivo* a mají řadu fyziologických funkcí, např. účast v protizánětlivých reakcích. Sleduje se jejich negativní působení na organismus při řadě onemocnění (zejména kardiovaskulárních, nádorových, a stárnutí). Významnou roli při ochraně před volnými radikály hraje prevence, tj. redukce příčin jejich vzniku. Proto se do centra pozornosti řadí mnoho látek přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají společně s potravou. V této souvislosti je věnována pozornost potravinám rostlinného původu, které slouží jako zdroj antioxidantů a k ochraně proti volným radikálům. [16]

3.1 Metody stanovení antioxidační aktivity

Během posledních desetiletí byla vyvinuta řada analytických metod ke stanovení tzv. celkové antioxidační aktivity (TAC tj. total antioxidant capacity). Metody jsou principiálně značně odlišné a jsou rozděleny do dvou skupin. První skupina zahrnuje metody založené na generaci různých radikálových částic a jejich eliminaci antioxidačními sloučeninami. Metody v této skupině zahrnují hodnocení TAC (DPPH, TEAC, ORAC) a metody hodnotící schopnost látek působit proti lipoperoxidaci. V druhé skupině jsou metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek (FRAP, cyklická voltametrie, HPLC s coulochemickou detekcí). [16,25]

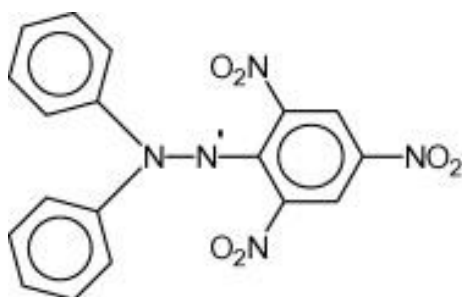
- **Metoda používající DPPH**

Tato metoda je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků. Tato metoda byla použita v praktické části diplomové práce pro stanovení antioxidační aktivity aromatických rostlin.

Princip metody DPPH spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem difenylpikrylhydrazylu – DPPH {1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl}. Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). [16]

Radikál DPPH (obr. 10) je v metanolovém roztoku relativně stabilní, zbarvení tohoto roztoku je modrofialové působením železité soli. Po přidání vzorku se v přítomnosti redukč-

ních faktorů radikál zháší, a tím se roztok odbarvuje. DPPH vykazuje silnou absorpci v UV/VIS spektru. Redukce DPPH antioxidantem nebo radikálem, která se projeví odbarvením roztoku, se měří spektrofotometricky při vlnové délce 515 nm buď po uplynutí určitého konstantního času nebo se pracuje v kinetickém režimu. Jako standard může být použita např. kyselina askorbová, kyselina gallová, kyselina izoaskorbová, epikatechin nebo Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová kyselina), na jehož ekvivalentní množství se antioxidační aktivita vzorku přepočítává nejčastěji. [41]



Obr. 10. Chemická struktura DPPH radikálu

Reakci je možno sledovat i metodou elektronové spinové rezonance nebo HPLC. Použití detekce HPLC, při které je hodnocen pík radikálu DPPH, je výhodné zvláště u barevných vzorků, kdy se na rozdíl od spektrofotometrie zabarvení vzorku eliminuje. [16]

Wojdylo a spol. ve své práci stanovovali antioxidační aktivitu a obsah celkových polyfenolů u 32 vybraných bylin. AA byla stanovována třemi metodami ABTS, DPPH a FRAP. Celkový obsah polyfenolů byl stanovován s Folin-Ciocalteovým činidlem. Pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie analyzovaly hlavní fenolové sloučeniny (kávovou a kumarovou kyselinu, z flavonoidů to byli kvercetin, luteolin a apigenin). Bylo zjištěno, že AA měřená metodou DPPH vykazovala stejné relace s metodou ABTS a metoda FRAP vykazovala vyšší hodnoty AA. AA byla vyjádřena μM trolox/100 g suché váhy. Z výsledků vyplynulo, že AA šalvěže byla vyšší, než hodnota AA meduňky, ale nižší než AA oregana. [63]

- **Metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) = ABTS**

Metoda používající ABTS (metoda TEAC) je jednou ze základních a nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Testuje schopnost vzorku či látek zhášet kation-radikál $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). [16]

Metoda ABTS je také označována jako metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), vzhledem k tomu, že výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu. [16]

Zhášení radikálu $ABTS^{\cdot+}$ antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, se sleduje spektrofotometricky na základě změn absorpčního spektra $ABTS^{\cdot+}$ (nejčastěji se měří absorbance při 734 nm). V reakční směsi se kation-radikál $ABTS^{\cdot+}$ generuje oxidací ABTS. Metoda TEAC využívá činidel, která iniciační akcí jiné látky přecházejí ve svou radikálovou formu, která je barevná a relativně stabilní. V přítomnosti antioxidačně aktivních složek extrahovaných ze vzorku potraviny se činidla redukují, a tím odbarvují. Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku. Aby vyjádření antioxidační aktivity vzorku bylo standardní, stanovuje se shodným postupem TEAC v přítomnosti askorbátu, Troloxu, gallátu, epikatechinu nebo jiných klasických antioxidantů. [16,25]

- **Metoda ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)**

Při použití metody ORAC (oxygen radical absorbance capacity) se v testovaném systému generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence β -fykoerytrinu (β -PE) po ataku radikály. Pro generaci peroxylových radikálů se používá AAPH (2,2-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid). Vzhledem k tomu, že tyto radikály patří k nejreaktivnějším, patří test ORAC k důležitým parametrům charakterizujícím antioxidanty. Metoda ORAC, která používá jako sondu β -PE (ORACPE), má široké využití a poskytuje významné informace o antioxidační kapacitě vzorků různého typu. [16,27]

Při stanovení antioxidační kapacity polyfenolů však byla popsána některá omezení, která se týkají vlastností β -PE (např. omezená fotostabilita). Zavedením jiného typu fluorescenční sondy, fluoresceinu, se metodika ORAC zpřesňuje. Uvádí se, že tada metoda je exaktnější v důsledku přesného a jednoduchého reakčního mechanismu, který spočívá v klasickém přenosu vodíku. [16]

- **Lipidově peroxidační metody**

Lipidová peroxidace vyvolaná volnými radikály je jedním z nejvýznamnějších patologických pochodů v organismu. Při studiu látek s antiradikálovými účinky se proto řada metod zaměřuje přímo na testování inhibičních účinků na lipidovou peroxidaci. Látky potlačující lipidovou peroxidaci mohou eliminovat jak iniciační radikály ($\text{OH}\cdot$), tak sekundárně vznikající radikálové meziprodukty (peroxyl, alkoxy) a mohou též působit jako látky chelatuující ionty přechodných kovů. Navíc je účinek antioxidantu *in vivo* ovlivněn jeho lipofilností. Bylo vyvinuto mnoho metod hodnotících vliv antioxidantů na lipidovou peroxidaci, od nejjednodušších, které jsou prováděny s jednoduchými lipidy, až po složitější biologické modely simulující situaci *in vivo* a využívající biologické membrány jako matrici. [16]

Lipidově peroxidační metody se provádějí v pufrovaných modelových systémech obsahujících nenasycené mastné kyseliny a testovaný vzorek. Často se přidává homogenit živočišné tkáně, např. jater nebo mozku, a lipidová peroxidace se v ní iniciuje tetrachlormetanem nebo peroxidem. Je možné použít separovaných mikrotomů a iniciace lipoperoxidačních alternací směsí NADPH a železnaté soli nebo jinými systémy. [25]

- **Metoda FRAP (Ferric reduction ability of plasma)**

Metoda FRAP neboli FOX (Ferrous oxidation assay) je založena na principu redoxní reakce železitých komplexů jako je TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazin). Při této metodě redukuje antioxidanty ze vzorku komplex Fe^{3+} -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) (Fe^{3+} -TPTZ). Nárůst absorbance při 593 nm odpovídající množství komplexu Fe^{2+} -TPTZ je mírou antioxidantní aktivity vzorku. Metoda má své limity spočívající v tom, že měření probíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH (3,6), nejsou zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenolické látky a thioly. Metoda FRAP tak odráží pouze schopnost látek redukovat ion Fe^{3+} a s celkovou antioxidantní aktivitou vzorku nemusí pozitivně korelovat. Při této metodě jsou vzorky téměř bezbarvé a po redukci a eventuálně reakci s dalším činidlem vytváří barevné produkty, jakým může být např. berlínská modř. [16,25]

▪ **Cyklická voltametrie**

Redoxní vlastnosti látek je možno hodnotit cyklickou voltametrií, která indikuje schopnost látek odštěpovat elektrony. Při této metodě se na pracovní elektrodu vkládá potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace a současně se sledují proudové odezvy v roztoku studované látky. Získaný záznam zachycuje křivka – tzv. cyklický voltamogram. Redukční schopnost látek se vyhodnocuje dvěma parametry, a to z potenciálu anodického oxidačního píku značeného *EA* a jeho anodického proudu značeného jako *IA*. Čím je nižší hodnota *EA*, tím látka snadněji odevzdává elektrony a může být lepším antioxidantem. Z hodnoty výšky proudu anodického píku *IA* je možné určit koncentraci látek. Cyklická voltametrie je vhodná pro získání informace, zda látka je schopna snadno odevzdávat elektrony a poté je možné zvolit určitou metodu na stanovení antioxidační kapacity. Je prokázáno, že v řadě případů hodnoty *EA* korelují s antioxidační aktivitou látek určenou jinými metodami, např. s lipoperoxidací. [16]

▪ **HPLC metoda s elektrochemickou detekcí**

Elektroaktivní látky je možno přesně a citlivě detegovat použitím amperometrických nebo coulochemických detektorů při analýze HPLC (HPLC-ECD). Při HPLC-ECD se na pracovní elektrodu detektoru vkládá určitý kladný potenciál. Pík látky se projeví pouze tehdy, je-li látka při tomto potenciálu oxidována. Látku je tak možno charakterizovat nejen retenčním časem, ale také potenciálem, při kterém se oxiduje. To umožňuje analyzovat komplexní směsi a identifikovat v nich jednotlivé účinné antioxidační komponenty na základě hodnoty potenciálu aplikovaného na elektrodu. Při analýze neruší zbarvení směsí, ale je nutné dodržet vysokou čistotu reagensů v mobilní fázi. Hodnocení antioxidačních vlastností látek pomocí HPLC-ECD koreluje s jinými metodami na testování celkové antioxidační aktivity látek, např. s metodou DPPH. [16]

3.2 Stanovení celkového obsahu polyfenolů

Ke stanovení obsahu polyfenolů v potravinách se používají dvě metody: [40]

a) *Stanovení polyfenolů chromatograficky, především pak metodou HPLC.*

Chromatograficky se stanoví předem definované složky. Nevýhodou této metody je, že některé polyfenoly mohou uniknout při stanovení. Většinou to jsou polyfenoly neznámé struktury či špatně dělitelné směsi.

b) Stanovení polyfenolů pomocí reakce s Folin-Ciocalteuovým činidlem.

Metoda stanovení polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla byla vymyšlena v 50. letech 20. století a má mnoho modifikací. [40]

Tato metoda je založena na principu oxidace nebo redukce fenolových látek při reakci s Folin-Ciocalteuovým činidlem, které se skládá s wolframu sodného, kyseliny orthofosforečné, kyseliny chlorovodíkové, molybdenanu sodného, síranu lithného a bromu.

Nevýhodou této metody je, že toto činidlo je redukováno i jinými látkami než jsou polyfenoly, například kyselinou askorbovou. Proto jsou výsledky stanovení celkových polyfenolů při použití HPLC nižší než při použití Folinova-Ciocalteuova činidla, přičemž skutečná hodnota leží patrně někde mezi výsledky obou stanovení.

Pro stanovení celkových polyfenolů v diplomové práci byla použita standardní fotometrická metoda s Folin-Ciocalteuovým činidlem podle Zloch, Čelakovský a Aujezdská [25]. Pro stanovení celkových polyfenolů se připraví reakční směs, kde probíhá oxidace fenolických látek v alkalickém prostředí a ze žlutého zbarvení fosfowolframové heteropolykyseliny a kolorimetrickým měřením výsledného komplexu vzniká modré zbarvení. Toto modré zbarvení má maximální absorpci závislou na kvalitativním či kvantitativním složení fenolických směsí a měří se pomocí spektrofotometru při 750 nm po uplynutí 20 min. Obvykle se k reakční směsi přidává uhličitan sodný. Jako standard zde byla použita kyselina gallová rozpuštěná v destilované vodě. [25,66]

4 AROMATICKÉ ROSTLINY

V poslední době roste zájem o potraviny, které obsahují přírodní přídatné látky, namísto syntetických. [1]

Aromatické rostliny jsou rostliny užitkové a často mají více uplatnění. Hlavní uplatnění je prevenci či léčení různých onemocnění. Z aromatických rostlin se získávají destilací s vodní parou silice, které vykazují antioxidační a antimikrobní aktivitu a nesou příchut'. Využití aromatických rostlin a jejich silic má hojné uplatnění v potravinářství, kosmetice, lékařství, zvěrolékařství, lidovém léčitelství a ve farmaceutickém průmyslu. Významné rostliny jsou ty, které se využívají i jako koření. [11,43,67]

Ke zhoršení kvality potravin dochází při zpracování a skladování, především oxidačními reakcemi. Oxidační reakce v potravinách degradují hlavně tuky, ale i bílkoviny a sacharidy. K prodloužení trvanlivosti potravin se často využívají syntetické antioxidanty, které jsou při vysoké teplotě nestabilní a rozkládají se, proto je jejich využití někdy nevýhodné. [1]

O kulinářských a léčivých bylinách z čeledi Lamiaceae – hluchavkovité (pyskaté) je známo, že jsou bohatým zdrojem polyfenolických sloučenin, zejména fenolových kyselin. Polyfenoly jsou sekundární rostlinné metabolity, které mají různou strukturu a funkci v rostlinách a jsou významným zdrojem antioxidantů v lidské potravě. [31,7]

Scalbert a Williamson [40] ve své studii naznačují spojení mezi konzumací potravin nebo nápojů bohatých na polyfenoly a prevenci některých nemocí. Uvádějí, že spotřeba ovoce, zeleniny, vína, čajů a sóji může mít vliv na prevenci některých onemocnění, např. kardiovaskulárních chorob, neurologických poruch nebo procesů stárnutí. Navíc polyfenoly spolu s antioxidanty (vitaminem C a E a karotenoidy) chrání tkáň těla člověka před oxidačním stresem a nemocí s oxidačním stresem spojené (rakovina, zánětlivá onemocnění).

V následujícím přehledu je uvedeno 8 vybraných aromatických rostlin, které byly vybrány a použity v diplomové práci. Jsou to: bazalka pravá, máta peprná, šalvěj lékařská, meduňka lékařská, oregano, levandule lékařská, řepík lékařský a heřmánek pravý.

4.1 Bazalka pravá

Ocimum basilicum L. nebo-li bazalka pravá patří do čeledi *Lamiaceae* pocházející z teplých tropických krajín Indie, Afriky a jižní Asie. Nyní se pěstuje na celém světě v nejrůznějších ekologických podmínkách. Bazalka je geneticky značně rozmanitá. Existuje něco mezi 65 a 150 druhů bazalky, rozeznávají se podle rozdílů v morfologické charakteristice jako je: zvyklost růstu, barva, velikost a tvar listů. [10]

Bazalka (obr. 11) je asi 50 cm vysoká jednoletá rostlina s velkými, silně zelenými, oválnými listy. Bylina má velmi intenzivní aroma připomínající citrón. Jako koření se nejčastěji užívají čerstvé listy. Sušením, zvláště za vyšší teploty, se ale aroma výrazně ztrácí, spíše se osvědčuje skladování po zmrazení. [33]



Obr. 11. Bazalka pravá [44]

Bazalka je známá nejenom pro své využití v kuchyni, ale je to také bylina, která je ceněna v tradiční medicíně pro své účinky. Pozitivní účinky má při žaludečních potížích, při nadýmání a ztrátě chuti k jídlu, zde působí jako zaživací stimulant. Bazalka také působí zklidňujícím účinkem na nervovou soustavu. Dalším z účinků bazalky je, že má antimikrobiální, protikřečové a antikarcinogenní účinek. [33,28]

Bazalka má vysoký obsah fenolických kyselin, které přispívají k její silné antioxidační aktivitě. Produkci fenolických kyselin v bazalce ovlivňují faktory, např. odrůda nebo klimatické podmínky, a tím mohou výrazně ovlivnit i antioxidační aktivitu, biologickou dostupnost a účinnost fenolických látek. Kyselina rozmarýnová derivát kyseliny kávové je nejčastější

fenolickou látkou v bazalce. Další fenolické látky, které se nacházejí ve vyšších koncentracích v bazalce jsou kyselina kávová, eugenol, karvakrol a thymol. [32,46,28]

4.2 Máta peprná

Máta peprná (*Mentha piperita*) je hybridní vytrvalá rostlina s charakteristikou svěží vůni a chutí. Planě roste celá řada příbuzných druhů (např. citrusová nebo jablečná máta), které mají podobné aroma. Máta peprná *Mentha spicata* L. patří do čeledi *Lamiaceae* a je to kříženec máty vodní a máty zelené. [33]

Mátu (obr. 12) pěstovali již staří Egypťané a dokumentována byla už ve třináctém století v islandském lékopisu. V současné době se pěstuje od tropického až po mírné pásmo světa, zejména v Evropě, Americe, severní Africe, Číně a Indii. [18,47]



Obr. 12. Máta peprná [45]

Máta je vytrvalá 50-90 cm vysoká rostlina. Její stonky jsou obvykle čtyřúhelníkově rozvětvené a často jsou zbarvené purpurově nebo fialově, někdy až do šedé barvy. Tmavé nebo světle zelené listy mohou být krátké, podlouhlé, vejčité a na okrajích jemně ozubené. Barva květů může být fialová nebo růžová s řadou nenápadných listenů. Obvykle roste na slunné straně a dává přednost kyselé a neutrální půdě, dále střední až lehké půdě, ale roste také v těžké jílovité půdě. [18]

Hlavní látka, která vytváří charakteristickou vůni a příchut' je mentol. [33]

Chemické složení mátové silice se liší v závislosti na klimatu, odrůdě a geografickém umístění. Mátová silice obsahuje 0,1-1% peppermintu, dále je tvořený převážně z 29-48 % mentolem, z 20-31 % menthonem, z 6,8 % menthofuranem a 3-10 % menthyl acetát. Mátová silice obsahuje látky, které mají léčivé účinky a jsou hořké, flavonoidy (12%), polymerované polyfenoly (19%), karoteny, tokoferoly, betain, cholin a tanin. [18]

Mátová silice a její složky se komerčně používají v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Mentol se používá jako surovina do zubních past, zubního prášku, žvýkacího tabáku, cukrovinek, ústního osvěžovače, analgetických kapek proti kašli a dále do balzámů, parfémů, žvýkaček, bonbonů a taky se využívá v tabákovém průmyslu. Tabákový průmysl představuje asi 40% celkové spotřeby silice, po něm následuje farmaceutický a cukrárenský průmysl. Čerstvé nebo sušené listy jsou používány při výrobě osvěžovačů dechu, nápojů, antiseptických ústních proplachů, zubních past, žvýkaček, mátových čokoládových čajů, nápojů, želé, sirupů, cukrovinek, zmrzlin a také jsou nezbytnou složkou v čaji Tuareg populárního v severní Africe a arabských zemích. [33,18]

Nejběžněji se máta používá jako čaj. Mátový čaj působí příznivě, zlepšuje trávení, používá se při nadýmání a také při chřipce nebo nachlazení. [33]

4.3 Šalvěj lékařská

Salvia officinalis neboli šalvěj, je největší rod z čeledi *Lamiaceae*. Tato čeleď zahrnuje asi 900 druhů bylin, dřevin nebo keřovitých trvalek, zřídka jsou dvouleté nebo roční a velmi často jsou to silně aromatické rostliny rostoucí v mírném podnebném páse a v teplých oblastech světa. [19]



Obr. 13. Šalvěj lékařská [48]

Slovo *Salvia* bylo odvozeno z řeckého slova "Salvere: což znamená léčitel, nebo-li léčivé" a vztahuje se na celou řadu léčivých rostlin tohoto rodu. Lidové léčení se domnívá, že šalvěj příznivě působí na různé typy léčení: tuberkulóza, bronchitýda, na horečky, revma, dále se využívá jako přípravek proti hmyzu, na zvýšení sexuální schopnosti, ale také jako lék proti bolesti a při hojení ran a má chladivý účinek na organismus člověka. Moderní vědecké výzkumy potvrdily, že šalvěj je biologicky aktivní a má antibakteriální, antidiabe-

tické, protinádorové, antioxidační a protizánětlivé účinky. Extrakty šalvěže přispívají k potlačení růstu hub a virů. [19,23]

Šalvěj lékařská (obr. 13) obsahuje účinné látky, jako jsou flavonoidy (luteolin, apigenin) a kyselinu rozmarýnovou. Silice získaná ze šalvěže má silný antimikrobiální účinek. Hlavními složkami silice jsou α -thujon, 1,8-cineol, kafr, borneol, β -pinen a β -karyofylen, humulen, kamfen, kimonem a linalol. Mezi další složky silice patří fenolpropeny a některé sírné nebo dusíkaté látky. [21]

Šalvěj se nepoužívá pouze v léčitelství, ale má uplatnění i ve farmacii, potravinářství a kosmetickém průmyslu. Některé druhy šalvěže se používají jako koření k ochucení masa (např. masa vepřového), klobás a drůbeže. Dále má šalvěj využití jako antioxidant - stabilizuje tuky a potraviny obsahující tuk. *Salvia eremophila* Boiss. se používá v Íránu jako ochucovadlo do mléčných výrobků a vyrábí se z ní čaj více než tisíciletí. [19,21]

4.4 Meduňka lékařská

Meduňka lékařská (*Melissa officinalis* L.) je vytrvalá bylina s citronovou vůní a svěží chutí. Je asi 1 m vysoká. Její pěstování je velmi jednoduché, rostlina je nenáročná a snadno se množí. Roste v oblasti Středomoří, západní Asie, jihozápadní Sibíři a severní Afriky. Z rostliny se nejvíce využívají čerstvé listy do salátů nebo sušené, ze kterých se připravuje odvar. Velmi často se využívají i kvetoucí vrcholky. [20,33]

Z chemického hlediska meduňka obsahuje silici, alkoholické či fenolové glykosidy (eugenolglykosid), kyselinu kávovou a její derivát kyselinu rozmarýnovou, flavonoidy a fenolové kyseliny (karnosová kyselina, triterpeny kyseliny ursolové a oleanová kyselina). [20]

Latinský název "Melissa" (balzám) má své kořeny v řeckém slově "meliteia", které je odvozené od "Meli, melitos" (med). Význam francouzského slova "Officine" jako "lékárník, laboratoř" byl poprvé doložen v roce 1812. Jméno "balm" je krátká forma slova "balzám", pro nejznámější sladce vonící olej. [20]

V lidovém léčitelství se doporučuje užívat odvar z meduňky při nervových potížích, bolestech břicha, žaludečních potížích, hysterii a melancholii, při chronickém bronchiálním kataru, migréně, nervové slabosti, bolesti zubů, bolesti v uších a bolesti hlavy. Meduňka (obr. 14) pozitivně působí na vysoký krevní tlak, při revmatismu, poškození nervů a na ztuhlý krk. [20,33]



Obr. 14. Meduňka lékařská [49]

4.5 Oregano – dobromysl obecná

Ogerano (*Organum vulgare*) je keříčkovitá, aromatická vytrvalá bylina s velmi specifickou chutí a vůní. Jako koření se využívají celé lístky, někdy i s květy, a to buď čerstvé, nebo sušené. Oregano (obr. 15) se pěstuje po celé Evropě, ale i v oblastech, kde je teplejší klima. Aroma a chuť oregana, které bylo vypěstováno v teplejších oblastech je daleko výraznější než oregano vypěstované v oblastech mírného pásma. Oregano je považováno za univerzální koření a je typické pro řeckou kuchyni. Listy organa byly používány starověkými Řeky k léčbě astmatu, poruch trávení a na bolest hlavy. [22,33]

Silice organa je bohatá na thymol a karvakrol. Tyto látky jsou zodpovědné za antioxidační a antimikrobiální účinek silice organa, která se využívá nejenom v potravinářství, ale i v léčitelství. [24,51]



Obr. 15. Oregano [50]

4.6 Levandule lékařská

Lavandula angustifolia Mill. patří do čeledi *Lamiaceae*. Levandule lékařská (obr. 16) je keř 1-2 m vysoký. V lidovém léčitelství je známá jako silná aromatická léčivá bylina. Odvar připravený z levandule se používá v tradičním lidovém léčitelství při gastrointestinálních potížích, nervových a revmatických onemocnění. [53,54]



Obr. 16. Levandule lékařská [50]

Costa S. B [52] ve své práci uvádí, že obchodní zájem o silici z levandule roste nejenom v kosmetickém průmyslu, kde se využívá na výrobu mýdla, kolínské vody, parfémů nebo pleťového mléka a další kosmetiky, ale také je o ni zájem v aromaterapie a ve farmaceutickém průmyslu. Ve farmácii se silice z levandule přidává do léků, kde působí jako sedativum, antivirová a antibakteriální látka. V poslední době se zvýšil zájem o silici levandule i při výrobě potravin. Silice potravinám dodává příchuť např. do nápojů, zmrzlin, sladkostí, pečiva a žvýkaček.

Silice získaná z květů levandule má silné antiseptické vlastnosti, které jsou schopné zabít mnoho mikroorganismů, jako je tyfus, záškrť, *Streptococcus* a pneumokoky, ale také má antivirové vlastnosti a je účinným prostředkem proti některým hadím jedům. [54]

Chemické složení silice levandule bylo pro Hajhashemi a kol. [53] předmětem studií několika let. Bylo zjištěno, že silice levandule působí proti depresi, křečím a má účinek jako sedativum a lokální anestetikum. Tyto účinky jsou přisuzovány antioxidační a antibakteriální aktivitě. V jejich studii bylo prokázáno, že hlavními komponenty z nadzemních částí a květů levandule byly linalol, linalyl acetát a některé další mono- a seskviterpeny, flavonoidy, jako luteolin, triterpenoidy jako ursolová kyselina a kumariny.

4.7 Řepík lékařský

Agrimonia Eupatoria je latinský název řepíku lékařského (obr. 17) patřící do čeledi růžovité (*Rosaceae*). Je to vytrvalá asi 1m vysoká rostlina. Je rozšířený v celé Evropě, v mírném pásmu Asie a v Severní Americe. U nás roste na suchých lukách, pastvinách, na mezích v křovinách a v příkopech u cest. [56,57]



Obr. 17. Řepík lékařský [55]

V celé rostlině jsou obsažené třísloviny, flavonoidy, silice a hořčiny. Nachází se zde i flavonové barvivo kvercitrin, kyseliny citronová a nikotinová, cholin a kyselina křemičitá. Rostlina se využívala hlavně v lidovém léčitelství. Rostlina se aplikuje v čajových směsích nebo v nálevech a účinkuje svíravě, protizánětlivě, dezinfekčně a proti průjmům. Zvyšuje sekreci, vylučování žluči a pomáhá vylučovat moč. [56,57]

4.8 Heřmánek pravý

Heřmánek (*Matricaria recutita* L.) je jedna z nejběžnějších léčivých rostlin, patřící do čeledi *Asteraceae*, a je součástí lékopisů 26 zemích po celém světě. [58]

Z heřmánku se získává silice, která se používá do léčivých přípravků, je také aplikována v potravinářském průmyslu do potravin, za účelem zvýraznit chuť. Silice z heřmánku se využívá v kosmetickém průmyslu, např. pro výrobu parfémů. Silice heřmánku obsahuje polysacharidy, mastné kyseliny, kumariny, fenolické sloučeniny, konkrétně flavonoidy, kvercetin, apigenin, patuletin, luteolin a jejich glykosidy a taky sesquiterpenické sloučeniny.

Tyto biologicky aktivní chemické složky se nacházejí v silici získané z květů heřmánku (obr. 18). [58]



Obr. 18. Heřmánek pravý [60]

Chemické složení silice heřmánku je závislé na půdě, ve které vyrůstá, na klimatických podmínkách a na odrůdě. [58]

Biologické účinky heřmánku jsou rozděleny do několika skupin. Prvořadou skupinou s biologickými účinky jsou sesquiterpenické sloučeniny. Tato skupina se skládá z α -bisabololu a chamazulenu. α -bisabolol vykazuje protizánětlivé, antimikrobiální i hojivé účinky a zabraňuje vzniku žaludečních a dvanáctíkových vředů. Chamazulen také vykazuje protizánětlivé účinky. V silici heřmánku byly identifikovány i ostatní sesquiterpenické sloučeniny, jako jsou $\text{trans-}\beta$ - α -farnesen a farnesen β -eudesmol, α -bisabolol a jeho deriváty. [58]

Za léčivé účinky u heřmánku odpovídají sesquiterpenické sloučeniny. Ve studiu od Rocha, Petronilo a kol. [58] bylo prokázáno, že heřmánek je potenciálním zdrojem až 32 detekovaných sesquiterpenoidů. Z toho 8 jich bylo identifikováno poprvé.

Ve velké míře se heřmánek konzumuje jako čaj. Tradičně se tato rostlina používá k léčbě mnoha nemocí, jako jsou alergie a zánětlivé onemocnění. Heřmánek se používá k ošetření rán, vředů, ekzémů, dny, podráždění kůže, na revmatické bolesti, hemeroidy, bércové vředy a na záněty prsních žláz. [59]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo stanovit a porovnat antioxidační aktivitu a určit celkový obsah polyfenolů ve vybraných aromatických rostlinách - máta, meduňka, levandule, šalvěj, řepík, heřmánek, oregano a bazalka.

1. Formou literární rešerše popsat oxidační reakce v potravinách a působení antioxidantů a jejich zdroje. Popsat metody využívané pro stanovení antioxidační aktivity a polyfenolických látek. Dále charakterizovat vybrané aromatické rostliny a jejich vlastnosti.
2. Stanovit antioxidační aktivitu vybraných aromatických rostlin (máta, meduňka, levandule, šalvěj, řepík, heřmánek, oregano a bazalka). Pomocí spektrofotometrické metody DPPH stanovit antioxidační aktivitu aromatických rostlin a metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem stanovit celkový obsah polyfenolických látek aromatických rostlin.

6 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

6.1 Vzorky aromatických rostlin

V diplomové práci bylo analyzováno 29 vzorků 8 různých druhů aromatických rostlin (máta, meduňka, levandule, šalvěj, řepík, heřmánek, oregano a bazalka). Jednalo se o sušené vzorky rostlin zakoupené v sypané formě v tržní síti, čerstvé vzorky aromatických rostlin (máta a meduňka) zakoupené v tržní síti, vzorky lyofilizované (máta, meduňka, levandule, oregano a bazalka) a mražené (máta a meduňka), které byly získány z domácího pěstitelství. V tab. 4 je uveden přehled vzorků aromatických rostlin.

6.2 Použité chemikálie

- destilovaná voda
- roztok DPPH – difenylpicrylhydrazyl (Aldrich, USA)
- standard kyseliny askorbové (Fluka – Chemika, Švýcarsko)
- standard kyseliny gallové (Sigma, Německo)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Penta, ČR)
- roztok Na_2CO_3 (Lukeš, Uherský Brod, ČR)
- acetátový pufr (pH = 5,5)

6.3 Požité přístroje a pomůcky

- laboratorní sklo a pomůcky
- analytické váhy (EP 214, Ohaus, Švýcarsko)
- termostat (Venticell 111 Comfort, BMT MMM, ČR)
- Spektrofotometr (Libra S6 Biochrom, Velká Británie)

Tab. 4. Přehled aromatických rostlin používaných k analýze

Vzorek	Forma	Výrobce
Máta 1	sušená	MOKATE s.a, Ustroň, Polsko
Máta 2	sušená	NAURA s.r.o., Děčín, ČR
Máta 3	sušená	OXALIS, spol. s r.o., Slušovice, ČR
Máta 4	sušená	Vyškov – domácí pěstitelství
Máta 4-1	mražená	Vyškov – domácí pěstitelství
Máta 4-2	lyofilizovaná	Vyškov – domácí pěstitelství
Máta 5	čerstvá	TITBIT s.r.o., Praha, ČR
Meduňka 1	sušená	OXALIS, spol. s r.o., Slušovice, ČR
Meduňka 2	sušená	NAURA s.r.o., Děčín, ČR
Meduňka 3	sušená	Vyškov – domácí pěstitelství
Meduňka 3-1	mražená	Vyškov – domácí pěstitelství
Meduňka 3-2	lyofilizovaná	Vyškov – domácí pěstitelství
Meduňka 4	čerstvá	TITBIT s.r.o., Praha, ČR
Bazalka 1	sušená	SONNENTOR s.r.o., Rakousko
Bazalka 2	sušená	NAURA s.r.o., Děčín, ČR
Bazalka 3	lyofilizovaná	Vyškov – domácí pěstitelství
Bazalka 4	lyofilizovaná	Zlín – domácí pěstitelství
Levandule 1	sušená	Vladimír Štefl, Zlín, ČR
Levandule 2	sušená	Milota s.r.o., Vřesina, ČR
Levandule 3	lyofilizovaná	Vyškov – domácí pěstitelství
Šalvěj 1	sušená	NAURA s.r.o., Děčín, ČR
Šalvěj 2	sušená	OXALIS, spol. s r.o., Slušovice, ČR
Heřmánek 1	sušená	NAURA s.r.o., Děčín, ČR
Heřmánek 2	sušená	OXALIS, spol. s r.o., Slušovice, ČR
Řepík 1	sušená	NAURA s.r.o., Děčín, ČR
Řepík 2	sušená	Vladimír Štefl, Zlín, ČR
Oregano 1	sušená	NAURA s.r.o., Děčín, ČR
Oregano 2	sušená	Vladimír Štefl, Zlín, ČR
Oregano 3	lyofilizovaná	Vyškov – domácí pěstitelství

7 METODIKA STANOVENÍ

7.1 Stanovení obsahu sušiny

Sušina představuje pevný zbytek po odstranění vody a těkavých látek, získaný vysušením navážky vzorku při předepsané teplotě za podmínek stanovení. Sušení probíhá v elektrické sušárně při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti.

Ke stanovení byla použita vysušená a zvážená hliníková miska. Do ní byl navážen 1 g vzorku sušené aromatické rostliny na analytických vahách s přesností na 0,0001 g. Vzorek byl vložen do termostatu a při teplotě 105 °C se sušil do konstantní hmotnosti. Po vysušení a vychladnutí byly misky se vzorky zváženy na analytických vahách s přesností na 0,001 g.

Sušina aromatických rostlin S (%):

$$S = 100 - v$$

Obsah vlhkosti v (%):

$$v = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \cdot 100$$

kde: m_0 - hmotnost vysušené prázdné misky [g]

m_1 - hmotnost misky s navážkou vzorku před vysušením [g]

m_2 - hmotnost misky se vzorkem po vysušení [g]

7.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Pro stanovení antioxidační aktivity byla použita spektrofotometrická metoda DPPH a standard kyseliny askorbové. Metoda spočívá v reakci antioxidantů ve vzorku se stabilním radikálem DPPH – difenylpicrylhydrazylem při níž dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpicrylhydrazin). Antioxidační aktivita aromatických rostlin se vyjadřuje v ekvivalentech kyseliny askorbové.

7.2.1 Příprava výluhů aromatických rostlin

Pro přípravu vodních výluhů bylo naváženo na analytických vahách 1 g (sušené, mražené, lyofilizované nebo čerstvé) aromatické rostliny s přesností na 0,0001 g. Navážka vzorku byla dvakrát extrahována 50 ml horké destilované vody, celkem tedy 100 ml výluhu. Každá extrakce trvala 10 min při teplotě 80 °C za občasného míchání. Pro aromatické rostliny, které měly nejvyšší antioxidační aktivitu byly připraveny i vodní výluhy o teplotě 60 °C a 80 °C. Takto vytvořený výluh byl podle potřeby ředěn a použit pro analýzu.

7.2.2 Optimalizace stanovení antioxidační aktivity aromatických rostlin

Pro optimalizaci stanovení antioxidační aktivity bylo zjišťováno vhodné složení reakční směsi, koncentrace výluhu a roztoku DPPH. Při zjišťování optimálního stanovení se vycházelo z vědeckých článků [15], [17] a z diplomových prací.

Vzorky se extrahovali v horké destilované vodě při teplotě 60, 70, 80 a 90 °C. Vzniklé výluhy jsme ředili na 50, 30, 25, 15 a 10 %. Pro stanovení jsme zkoušeli tyto koncentrace roztoku DPPH: 0,5, 0,3, 0,25 a 0,13 mM a také vliv přídavku acetátového pufru (pH = 5,5). U vzniklé reakční směsi jsme měřili absorbanci při vlnové délce 515 nm.

Při vyšších koncentracích roztoku DPPH se nám vzniklá reakční směs odbarvovala z fialové až do žluté barvy, což neodpovídalo odstínu fialové barvy.

Vzhledem k tomu, že k měření bylo použito více druhů aromatických rostlin o různé antioxidační aktivitě, byly pro stanovení výluhy aromatických rostlin různě ředěny. Analýzou bylo zjištěno, že u většiny vzorků aromatických rostlin je nejvhodnější ředění je 25 %. U vzorků s vyšší antioxidační aktivitu jsme použili nižší ředění - 5, 10 a 15 %.

Na základě výsledků stanovení jsme zjistili, že pro analýzu vybraných aromatických rostlin je nejvhodnější koncentrace roztoku DPPH 0,25 mM, ředění vzorků 25 % a přídavek acetátového pufru.

Nejvhodnější složení reakční směsi bylo:

- 0,1 ml vzorku
- 1,9 ml roztoku DPPH
- 1 ml acetátového pufru (pH = 5,5)

Absorbance byla měřena při vlnové délce 515 nm.

7.2.3 Stanovení antioxidační aktivity aromatických rostlin

Pro měření antioxidační aktivity byly použity výluhy, které byly připraveny způsobem uvedeným v kapitole 7.2.1. Pro stanovení antioxidační aktivity byl připraven zásobní roztok DPPH (rozpuštěný v methanolu) o koncentraci 0,25 mM. Reakční směs pro stanovení antioxidační aktivity byla získána smícháním 0,1 ml extraktu vzorku s 1,9 ml roztoku DPPH a s 1 ml acetátového pufru (pH = 5,5). Takto vytvořená směs se důkladně protřepala a nechala stát ve tmě při pokojové teplotě 1 hodinu. Po 1 hodině se měřila absorbance pomocí spektrofotometru při vlnové délce 515 nm. Absorbance reakční směsi se vzorkem se měřila proti slepému pokusu. Slepý pokus byl připraven ve stejném složení jako u vzorku, ale bez přídavku DPPH (s destilovanou vodou).

Postup pro stanovení antioxidační aktivity inaktivace vzorku bylo nutné změřit i absorbanci kontrolního vzorku, který se připravil stejně jako reakční směs, ale bez použití extraktu vzorku. Místo výluhu vzorku se přidala destilovaná voda. Rozdíl mezi absorbancí kontrolního vzorku a absorbancí vzorku s extraktem sloužil k výpočtu inaktivace.

Inaktivace (%):

$$I = \frac{K - A}{K} \cdot 100$$

kde: K ... absorbance kontrolního vzorku

A ... absorbance vzorku s výluhem

Antioxidační aktivita vybraných aromatických rostlin stanovená metodou DPPH byla vyjádřena v mg ekvivalentu kyseliny askorbové na gram vzorku a přepočtena i na mg/g sušiny.

7.2.4 Příprava standardního roztoku a kalibrační křivky kyseliny askorbové

Pro přípravu kalibrační křivky standardu kyseliny askorbové byl připraven roztok o koncentraci 0,3 mg/ml. Z tohoto roztoku bylo připraveno 14 kalibračních roztoků o koncentracích 0,03, 0,04, 0,05, 0,055, 0,06, 0,075, 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,21, 0,215, 0,225 a 0,3 mg/ml ředěním zásobního roztoku standardu kyseliny askorbové destilovanou vodou.

Postup pro stanovení inaktivace s kyselinou askorbovou jako standardem byl stejný jako u měření vzorku (kapitola 7.2.3.), jen místo výluhu vzorku byl použit roztok kyseliny askorbové.

Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost inaktivace (procentuálního úbytku absorpance) na koncentraci standardu kyseliny askorbové.

7.2.5 Příprava vzorků a stanovení hodnoty IC_{50}

U třech aromatických rostlin (meduňka, bazalka a oregano), které vykazovaly nejvyšší antioxidační aktivitu byla změřena i hodnota IC_{50} . Pro výpočet hodnoty IC_{50} byla vytvořena kalibrační řada z vodních výluhů aromatických rostlin. Z vodních výluhů bylo připraveno 6 roztoků o koncentraci 1 - 3,5 mg/ml ředěním s destilovanou vodou. Z naředěných roztoků byly připraveny reakční směsi a vypočítaná inaktivace stejným způsobem, jaký je uveden v kapitole 7.2.3.

Z naměřených hodnot byla sestrojena křivka jako závislost inaktivaci na koncentraci výluhu. Ze získané křivky byla pomocí lineární regrese vypočtena hodnota IC_{50} . Hodnota IC_{50} udává hodnotu koncentrace vzorku, při které dochází k odbourání 50 % množství radikálu DPPH. Čím je tato hodnota nižší, tím je antioxidační aktivita vyšší.

7.3 Stanovení celkového obsahu polyfenolů s Folin-Ciocalteuovým činidlem

Pro stanovení obsahu celkových polyfenolů byla použita fotometrická metoda s Folin-Ciocalteuovým činidlem a standardem kyseliny gallové. Principem této metody spočívá v oxidaci nebo redukci fenolových látek při reakci s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Folin-Ciocalteovo činidlo se skládá s wolframu sodného, kyseliny orthofosforečné, kyseliny chlorovodíkové, molybdenanu sodného, síranu lithného a bromu.

7.3.1 Příprava výluhu aromatických rostlin

Pro přípravu vodních výluhů bylo na analytických vahách naváženo 1 g (sušené, mražené, lyofilizované nebo čerstvé) aromatické rostliny s přesností na 0,0001 g. Navážka vzorku byla dvakrát extrahována 50 ml horké destilované vody, tedy 80 °C. Každá extrakce trvala 10 min za občasného míchání. Celková doba extrakce byla 20 minut. Takto vytvořený výluh byl použit pro analýzu. U třech aromatických rostlin (meduňka, oregano a bazalka),

kteřé měly nejvyšší obsah polyfenolických látek byly připraveny i výluhy o teplotě 60 °C a 100 °C.

7.3.2 Optimalizace a stanovení celkového obsahu polyfenolických látek aromatických rostlin

Pro optimalizaci stanovení celkového obsahu polyfenolických látek bylo zjišťováno vhodné složení reakční směsi s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Při zjišťování optimálního stanovení dvěma různými postupy jsme vycházeli z vědeckých článků [25] a [26]. Z aromatických rostlin byly vytvořeny výluhy, které jsme ředili na 75, 50, a 25 %.

Pro stanovení celkového obsahu polyfenolických látek jsme připravili reakční směs smísením 50 µl extraktu s 1 ml destilované vody a s 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Takto připravenou směs jsme nechali 5 min stát ve tmě a následně jsme přidali 1 ml (10 %) roztoku Na₂CO₃, promíchali a uložili ve tmě. Po 15 min se měřila absorbance proti slepému pokusu při 750 nm. Slepý pokus byl připraven stejně jako vzorek, ale místo extraktu se přidala destilovaná voda.

V druhém pokusu jsme reakční směs připravili obdobně: 0,5 ml extraktu, 5 ml destilované vody a 0,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Směs jsme nechali 5 min stát ve tmě, přidali 1 ml (20 %) roztoku Na₂CO₃, promíchali a nechali stát hodinu ve tmě. Absorbance se měřila proti slepému pokusu při 750 nm. Slepý pokus jsme připravili stejně jako vzorek, ale místo extraktu se přidala destilovaná voda.

Na základě výsledků stanovení jako vhodnější metoda pro stanovení celkového obsahu polyfenolů byl vybrán 1. postup.

Celkový obsah polyfenolů byl vypočítán z rovnice regrese kalibrační křivky kyseliny gallové a poté byl vyjádřen v mg ekvivalentu kyseliny gallové na gram vzorku a přepočten i na mg/g sušiny.

7.3.3 Příprava standardního roztoku a kalibrační křivky kyseliny gallové

Byl vytvořen zásobní roztok standardu kyseliny gallové o koncentraci 1 mg/ml. Ze zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada o 10 koncentracích - 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 a 1 mg/ml ředěním s destilovanou vodou. Pro měření absorbance byla připravena reakční směs z kalibračních roztoků stejně jako v kapitole 7.3.2. Z naměřených

hodnot byla sestrojena kalibrační křivka jako závislost absorbance na koncentraci kalibračních roztoků standardu kyseliny gallové.

8 VÝSLEDKY A DISKUSE

8.1 Stanovení sušiny

Postup stanovení a výpočet obsahu sušiny ve vybraných vzorcích sušených aromatických rostlin je uveden v kapitole 7.1. Průměrné hodnoty obsahu sušiny jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tab. 5. Obsah sušiny v aromatických rostlinách

Vzorek	Obsah sušiny [%]	s
Máta 1	93,9	0,00
Máta 2	93,0	0,01
Máta 3	90,4	0,00
Meduňka 1	91,7	0,00
Meduňka 2	93,2	0,01
Levandule 1	89,3	0,01
Levandule 2	88,6	0,01
Šalvěj 1	92,7	0,01
Šalvěj 2	91,9	0,00
Heřmánek 1	94,0	0,02
Heřmánek 2	93,2	0,01
Řepík 1	93,7	0,01
Řepík 2	93,5	0,01
Oregano 1	93,5	0,00
Oregano 2	93,1	0,01
Bazlaka 1	91,2	0,01
Bazalka 2	92,0	0,01

Z výsledků je patrné, že obsah sušiny sušených aromatických rostlin se pohyboval v rozmezí od 88,6 % do 94 %. Nejvyšší podíl vlhkosti obsahovaly vzorky levandule 2 (11,4 %), levandule 1 (10,7 %) a máta 3 (9,6 %). Největší obsah sušiny byl zjištěn ve vzorku heřmánku 1 (94,0 %), máty 1 (93,9 %) a řepíku 1 (93,7 %).

8.2 Stanovení kalibrační křivky kyseliny askorbové pro určení antioxidační aktivity

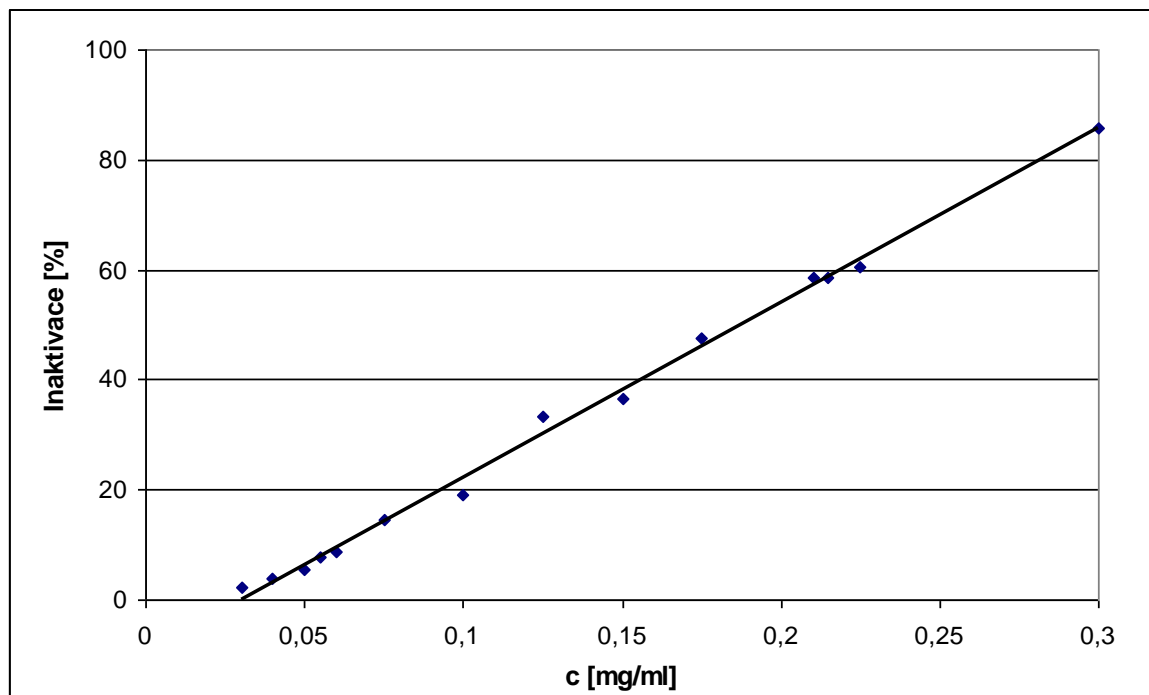
Pro sestavení kalibrační křivky (obr. 19) byl použit standard kyseliny askorbové (KA). Ze standardu KA byl vytvořen zásobní roztok o koncentraci 0,3 mg/ml a 14 kalibračních roztoků o koncentracích v rozpětí 0,03 - 0,3 mg/ml ředěním zásobního roztoku destilovanou vodou. Příprava zásobního roztoku KA a kalibrační křivky je popsána v kapitole 7.2.4.

Pro stanovení inaktivace kyseliny askorbové byla měřena absorbance 14 kalibračních roztoků. Stanovení a výpočet inaktivace je popsán v kapitole 7.2.3.

Kalibrační křivka kyseliny askorbové pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH byla sestavena jako závislost inaktivace na koncentraci kalibračních roztoků KA. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 6.

Tab. 6. Vypočtené hodnoty inaktivace pro jednotlivé koncentrace kyseliny askorbové

Koncentrace KA [mg/ml]	Inaktivace [%]
0,03	2,12
0,04	3,85
0,05	5,38
0,06	7,76
0,06	8,65
0,08	14,55
0,10	19,04
0,13	33,33
0,15	36,41
0,18	47,50
0,21	58,51
0,22	58,64
0,23	60,37
0,3	85,77



Obr. 19. Kalibrační křivka kyseliny askorbové

Sestrojená kalibrační křivka má rovnici regrese:

$$y = 316,84 \cdot x - 9,4$$

kde: y ... inaktivace I [%]

x ... koncentrace kyseliny askorbové [mg/ml].

Korelační koeficient závislosti koncentrace kyseliny askorbové na inaktivaci: $R = 0,9961$.

8.3 Stanovení antioxidační aktivity aromatických rostlin

Antioxidační aktivita byla stanovena spektrofotometricky metodou DPPH radikálu. Postup stanovení a výpočet hodnoty inaktivace je uveden v kapitole 7.2.3.

Dosažením vypočtené hodnoty inaktivace vzorku aromatické rostliny do rovnice regrese kalibrační křivky kyseliny askorbové a přepočtem původní koncentrace aromatické byliny ve vyluhu použitým ve stanovení, byla zjištěna antioxidační aktivita vyjádřena jako mg

ekvivalentu kyseliny askorbové na gram vzorku a následně, přepočtem na základě hodnoty obsahu sušiny, byla stanovena hodnota AA mg KA/g sušiny vzorku.

U sušených vzorků aromatických rostlin byl také zjišťován vliv teploty výluhu (60 °C, 80 °C, 100 °C) na antioxidační aktivitu. Dále byl zjišťován i rozdíl v AA u lyofilizovaných, zmrazených a čerstvých vzorků aromatických rostlin stejného druhu.

Pro porovnání antioxidační aktivity byla stanovena i hodnota IC₅₀ u 3 vybraných aromatických rostlin (meduňka 1, bazalka 1 a oregano 1), u kterých byla zjištěna výrazná antioxidační aktivita. Význam a výpočet této hodnoty je uveden v kapitole 7.2.5.

8.3.1 Stanovení antioxidační aktivity máty

Vzorky máty, které byly použity ke stanovení antioxidační aktivity, byly analyzovány ve formě sušené, mražené, lyofilizované a čerstvé.

V tab. 7 a 8 jsou uvedeny vypočtené hodnoty inaktivace odpovídající antioxidační aktivitě vyjádřené v mg kyseliny askorbové na g vzorku sušených rostlin a hodnoty přepočtené i na sušinu vzorku.

Tab. 7. Výsledky stanovení antioxidační aktivity sušené máty - výluhu

Vzorek / teplota [°C]	Inaktivace [%]	AA [mg KA/ g vzorku]	Sušina [%]	AA [mg KA/ g sušiny]
Máta 1 / 60 °C	25,86	44,32	93,9	47,20
Máta 1 / 80 °C	30,49	50,16		53,42
Máta 2 / 60 °C	27,99	47,19	93,0	50,74
Máta 2 / 80 °C	39,39	61,36		66,00
Máta 3 / 60 °C	25,83	44,15	90,4	48,84
Máta 3 / 80 °C	35,23	56,27		62,25
Máta 4 / 60 °C	4,12	17,05	-	-
Máta 4 / 80 °C	7,33	21,02	-	-

Z výsledků stanovení antioxidační aktivity u sušené máty (tab. 7) je patrné, že antioxidační aktivita vzorků máty se pohybovala v rozmezí od 17,05 do 61,36 mg KA/g vzorku. Vzorky máty, které byly přepočteny na sušinu vzorku, měly AA v rozmezí od 47,20 do 66,00 mg KA/g sušiny vzorku.

Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly vzorky máty 2 (61,30 mg KA/g), máty 3 (56,27 mg KA/g) a vzorek máty 1 (50,16 mg KA/g), při teplotě výluhu 80 °C. Nejnižší AA měl vzorek máty 4 při obou teplotách výluhu (17,05 mg KA/g při teplotě 60 °C a 21,02 mg KA/g při 80 °C). Nejvyšší AA u máty přepočtených na sušinu vykazovaly vzorky máty 2 (66 mg KA/g sušiny) a vzorek máty 3 (62,25 mg KA/g sušiny), při teplotě 80 °C. Vzorek máty 1 při teplotě výluhu 60 °C měl nejnižší AA (47,2 mg KA/g sušiny).

Z tabulky 7 také vyplývá, že teplota výluhu má vliv na antioxidační aktivitu, při nižší teplotě výluhu (60 °C) vykazovaly výluhy i nižší AA. U všech vzorků máty se vzrůstající teplotou se zvyšuje AA, tedy při vyšší teplotě dochází k lepšímu výluhu složek vykazujících antioxidační aktivitu.

Z porovnání výsledků antioxidační aktivity u jednotlivých sušených vzorků máty je zřejmé, že AA se výrazně neliší. Malé rozdíly v AA můžou být způsobeny různými faktory, které ovlivňují i chemické složení máty, jako jsou odrůda, půdní a klimatické podmínky při pěstování, a při stanovení AA i heterogenita rostlinného materiálu (kvantitativní zastoupení jednotlivých částí – podíl listů, natě a případných rostlinných nečistot ve vzorku) použitého pro analýzu.

Tab. 8. Výsledky stanovení antioxidační aktivity mražené, lyofilizované a čerstvé máty - výluhu

Vzorek / teplota [°C]	Inaktivace [%]	AA [mg KA/ g vzorku]
Máta 4-1 / 60 °C	6,04	18,85
Máta 4-1 / 80 °C	8,25	21,43
Máta 4-2 / 60 °C	13,65	72,55
Máta 4-2 / 80 °C	48,75	73,15
Máta 5 / 60 °C	13,15	3,46
Máta 5 / 80 °C	13,65	3,57

Z tab. 8 vyplývá, že antioxidační aktivita u výluhu z lyofilizované formy máty 4-2 byly nejvyšší (72,55 a 73,15 mg KA/g). Lyofilizovaný vzorek máty v koncentrované formě je nejvhodnější zdroj pro přípravu výluhu.

Vzorek čerstvé máty vykazoval nejnižší antioxidační aktivitu (3,46 mg KA/g), protože čerstvý vzorek máty je méně koncentrovaný než sušený vzorek. Nízká AA vzorku čerstvé máty mohla být ovlivněna faktory, jako jsou půdní, klimatické a pěstitelské podmínky.

Buřičová a Réblová zjišťovaly antioxidační aktivitu vodných a ethanolových výluhů máty spektrofotometricky metodou DPPH [15]. Z výsledků měření vyplývá, že AA ve vodném výluhu sušených listů máty byla 72,2 mg KA/g sušiny, což je vyšší hodnota, než při našem stanovení (max. 66 mg KA/g sušiny). Tento rozdíl byl způsoben i tím, že teplota výluhu sušených listů máty v práci českých vědců byla 98 °C a v našem pokusu byla teplota 80 °C.

Ve své práci se Chrprová a spol. zabývali stanovením antioxidační aktivity metodou DPPH u sušené máty. Z výsledků analýzy vyplývá, že vodní výluh o teplotě 70 °C měl jednu z nejvyšších AA (203,8 mg KA/g sušiny vzorku). [17]

8.3.2 Stanovení antioxidační aktivity meduňky

Ke stanovení antioxidační aktivity meduňky byly analyzovány vzorky meduňky ve formě sušené, mražené, lyofilizované a čerstvé.

V tab. 9 a 10 jsou uvedeny vypočtené hodnoty inaktivace odpovídající antioxidační aktivitě vyjádřené v mg kyseliny askorbové na g vzorku a hodnoty přepočtené i na sušinu vzorku.

Tab. 9. Výsledky stanovení antioxidační aktivity sušené meduňky - výluhu

Vzorek / teplota [°C]	Inaktivace [%]	AA [mg KA/ g vzorku]	Sušina [%]	AA [mg KA/ g sušiny]
Meduňka 1 / 60 °C	35,64	93,96	91,68	102,49
Meduňka 1 / 80 °C	30,59	125,88		137,30
Meduňka 1 / 100 °C	17,54	164,14		179,04
Meduňka 2 / 60 °C	50,39	74,84	93,23	80,27
Meduňka 2 / 80 °C	56,52	107,10		114,88
Meduňka 2 / 100 °C	20,91	180,50		193,61
Meduňka 3 / 60 °C	11,68	48,61	-	-
Meduňka 3 / 80 °C	30,09	75,20	-	-

Antioxidační aktivita meduňkového výluhu se pohybovala v rozmezí od 48,61 do 180,5 mg KA/g. Po přepočtu antioxidační aktivity na sušinu vzorku bylo toto rozmezí 80,27 – 193,61 mg KA/g sušiny.

Nejvyšší antioxidační aktivitu sušených vzorků meduňky byla zjištěna u meduňky 2 při 180,5 mg KA/g) a u meduňky 1 (164,14 mg KA/g), při teplotě výluhu 100 °C. Nejnižší AA sušených vzorků meduňky měl vzorek meduňky 3 při obou teplotách výluhu (48,61 a 75,2 mg KA/g) a vzorek meduňky 2 při teplotě výluhu 60 °C (74,84 mg KA/g). Porovnáním výsledků vzorků meduňky přepočtených na sušinu vzorku bylo potvrzeno, že meduňka 2 (100 °C) má nejvyšší AA (193,61 mg KA/g sušiny).

Buřičová s Réblovou [15] uvádějí ve své práci, že vodní výluh (98 °C) připravený ze sušených lístků meduňky má antioxidační aktivitu odpovídající 100,0 mg ekv. KA/g sušiny vzorku. Oproti tomu Chrpová a spol. [17] uvádějí, že AA měřená metodou DPPH ve vodním výluhu sušené meduňky (70 °C) byla vyšší a to 171,5 mg ekv. KA/g sušiny vzorku.

Porovnáním výsledků lze říci, že námi stanovená AA vodních výluhů meduňky byla podobná a blížila se k oběma hodnotám meduňkových výluhů uvedených v literatuře [15] a [17].

Marcinčák, Popelka a Šoltysová ve své práci zjišťovali antioxidační aktivitu methanolo- vých extraktů vybraných rostlin. Schopnost rostlinných extraktů vychytávat volné radikály proti stabilnímu DPPH radikálu byla měřená spektrofotometricky. Bylo zjištěno, že methanolo- vý výluh sušené meduňky byl jeden z nejsilnějších, který odbourával DPPH radikál. [62]

Z tab. 10 vyplývá, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly koncentrované lyofilizova- né vzorky meduňky 3-2 při obou teplotách výluhu (168,12 a 162,6 mg KA/g). Nejnižší AA vykazoval vzorek čerstvé meduňky 4 (60 °C) 13,92 mg KA/g vzorku.

I v případě meduňky bylo dokázáno, že čím vyšší teplota výluhu byla použita, tím vyšší byla antioxidační aktivita.

Tab. 10. Výsledky stanovení antioxidační aktivity mražené, lyofilizované a čerstvé meduňky - výluhu

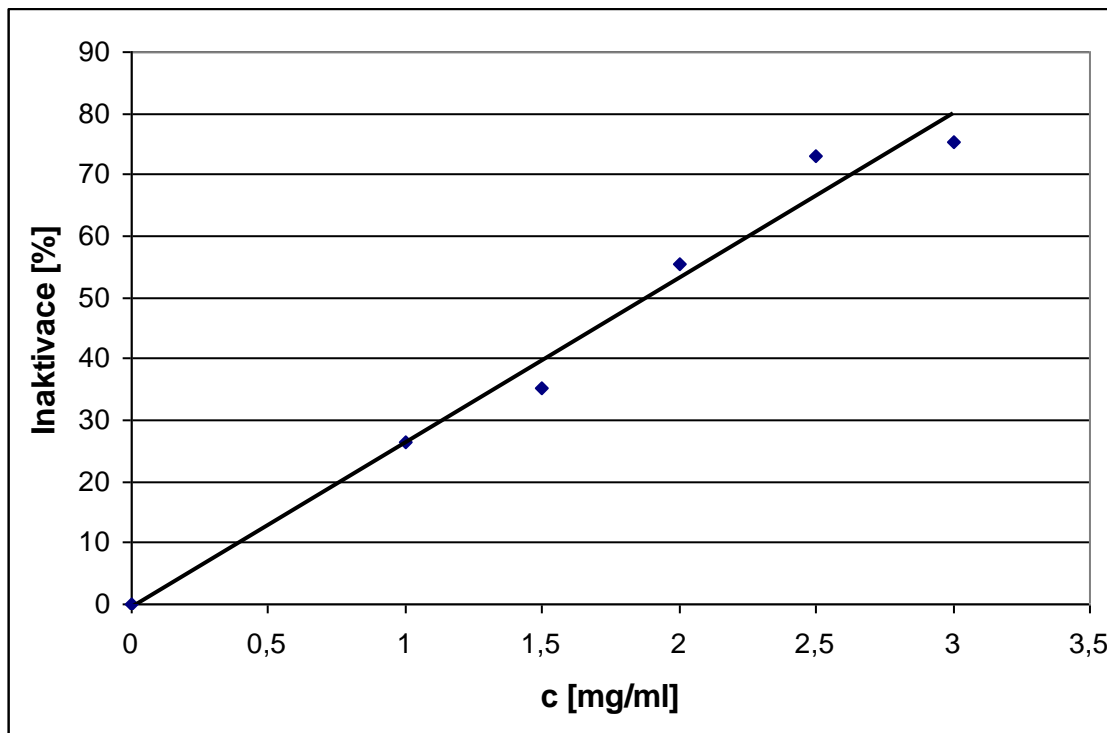
Vzorek / teplota [°C]	Inaktivace [%]	AA [mg KA/g]
Meduňka 3-1 / 60 °C	25,46	43,89
Meduňka 3-1 / 80 °C	29,51	47,41
Meduňka 3-2 / 60 °C	16,44	162,60
Meduňka 3-2 / 80 °C	17,33	168,12
Meduňka 4 / 60 °C	1,86	13,92
Meduňka 4 / 80 °C	4,75	17,76

Na obr. 20 je zobrazena závislost koncentrace výluhu z meduňky 1 (mg/ml) na inaktivaci (%), ze kterého byla vypočítána hodnota IC₅₀.

Pro stanovení inaktivace byla měřena absorbance 5 vodných výluhů z meduňky. Stanovení a výpočet inaktivace je popsán v kapitole 7.2.3. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 11.

Tab. 11. Vypočtené hodnoty inaktivace pro jednotlivé koncentrace výluhu meduňky 1

Koncentrace [mg/ml]	Inaktivace [%]
1,00	26,26
1,50	35,14
2,00	55,35
2,50	73,03
3,00	75,35



Obr. 20. Závislost koncentrace výluhu z meduňky 1 na inaktivaci

Sestrojená křivka má rovnici regrese:

$$y = 26,803 \cdot x - 0,5007$$

kde: y ... inaktivace I [%] \rightarrow pro IC_{50} je hodnota $I = 50$ %

x ... koncentrace meduňkového výluhu [mg/ml]

Korelační koeficient závislosti koncentrace meduňkového výluhu na inaktivaci:
 $R = 0,9983$

Z rovnice kalibrační křivky na obrázku 20 byla vypočítána hodnota IC_{50} pro meduňku 1. Hodnota IC_{50} meduňky 1 byla 1,88 mg/ml, což je koncentrace, při které se odbourá 50 % množství radikálu DPPH.

V diplomové práci byly stanoveny hodnoty IC_{50} u meduňky 1, oregana 1 a bazalky 1. Vzorek meduňky 1 měl tuto hodnotu nejnižší, z toho vyplývá, že měl nejsilnější antioxidační účinek.

8.3.3 Stanovení antioxidační aktivity levandule

Ke stanovení antioxidační aktivity levandule byly analyzovány vzorky levandule ve formě sušené a lyofilizované.

V tab. 12 jsou uvedeny vypočtené hodnoty inaktivace odpovídající antioxidační aktivitě vyjádřené v mg kyseliny askorbové na g vzorku sušených rostlin a hodnoty přepočtené i na sušinu vzorku.

Tab. 12. Výsledky stanovení antioxidační aktivity levandule - výluhu

Vzorek / teplota [°C]	Inaktivace [%]	AA [mg KA/ g vzorku]	Sušina [%]	AA [mg KA/ g sušiny]
Levandule 1 / 60 °C	10,34	24,87	89,25	27,67
Levandule 1 / 80 °C	26,53	45,26		50,71
Levandule 2 / 60 °C	6,89	20,49	88,58	23,13
Levandule 2 / 80 °C	23,86	41,62		46,99
Levandule 3 / 60 °C	11,59	26,40	-	-
Levandule 3 / 80 °C	14,09	29,64		-

Z výsledků stanovení antioxidační aktivity u levandule bylo zjištěno, že AA u sušených vzorků se pohybovala od 20,49 do 45,26 mg KA/g. U vzorků přepočtených na sušinu bylo toto rozmezí od 23,13 do 50,71 mg KA/g sušiny.

Nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u výluhu sušené levandule 1 (80 °C) 45,26 mg KA/g a nejnižší u vzorku levandule 2 (60 °C) 20,49 mg KA/g. I po přepočtu sušených vzorků na sušinu se výsledky, shodovaly nejvyšší AA měl vzorek levandule 1 (50,71 mg KA/g sušiny) a nejnižší AA levandule 2 (23,13 mg KA/g sušiny).

Lyofilizovaný vzorek levandule 3 při teplotě výluhu 60 °C měl AA 26,40 mg KA/g. Při teplotě výluhu 80 °C se AA zvýšila na 29,64 mg KA/g.

I zde bylo dokázáno, že teplota výluhu má vliv na antioxidační aktivitu levandule sušené i lyofilizované formy. U levandule 2 byl rozdíl v AA 52 % mezi hodnotami výluhu při teplotách 60 °C a 80 °C.

8.3.4 Stanovení antioxidační aktivity šalvěže

Vzorky šalvěže, které byly použity ke stanovení antioxidační aktivity, byly analyzovány v sušené formě.

V tab. 13 jsou uvedeny vypočtené hodnoty inaktivace odpovídající antioxidační aktivitě šalvěže vyjádřené v mg kyseliny askorbové na g vzorku sušených rostlin a hodnoty přepočtené i na sušinu vzorku.

Tab. 13. Výsledky stanovení antioxidační aktivity šalvěže - výluhu

Vzorek / teplota [°C]	Inaktivace [%]	AA [mg KA/ g vzorku]	Sušina [%]	AA [mg KA/ g sušiny]
Šalvěj 1 / 60 °C	23,86	41,98	92,70	45,29
Šalvěj 1 / 80 °C	30,95	50,89		54,99
Šalvěj 2 / 60 °C	19,13	35,98	91,88	39,16
Šalvěj 2 / 80 °C	26,30	45,00		48,98

Z tabulky 13 vyplývá, že AA výluhu sušené šalvěže se pohybuje v rozmezí 35,98 – 50,89 mg KA/g. Po přepočtu na sušinu vzorku se toto rozmezí AA zvýšilo (od 39,16 mg KA/g sušiny do 54,99 mg KA/g sušiny).

Z výsledků vyplývá, že nejvyšší AA má vzorek šalvěže 1 při teplotě výluhu 80 °C (50,89 mg KA/g), a nejnižší šalvěj 2 při teplotě výluhu 60 °C (35,98 mg KA/g). Hodnota antioxidační aktivity vyjádřená v mg KA/g sušiny byla vyšší. AA obou vzorků šalvěže přepočtená na sušinu byla dost podobná.

Porovnáním antioxidační aktivity vodního výluhu vzorku šalvěže podle literatury [17] (60,6 mg KA/g sušiny) s vodním výluhem naší šalvěže (max. 54,99 mg KA/g sušiny) vyplývá, že AA šalvěj z našeho stanovení dosahuje nejnižších hodnot. I zde hrají důležitou roli faktory (odrůda, půdní a klimatické podmínky a další) ovlivňující množství sloučenin odpovědných za antioxidační aktivitu.

8.3.5 Stanovení antioxidační aktivity heřmánku

Vzorky heřmánku, které byly použity ke stanovení antioxidační aktivity, byly analyzovány v sušené formě.

V tab. 14 jsou uvedeny vypočtené hodnoty inaktivace odpovídající antioxidační aktivitě heřmánku vyjádřené v mg kyseliny askorbové na g vzorku a hodnoty přepočtené i na sušinu vzorku heřmánku.

Tab. 14. Výsledky stanovení antioxidační aktivity heřmánku - výluhu

Vzorek / teplota [°C]	Inaktivace [%]	AA [mg KA/ g vzorku]	Sušina [%]	AA [mg KA/ g sušiny]
Heřmánek 1 / 60 °C	6,83	20,45	93,99	21,76
Heřmánek 1 / 80 °C	8,38	23,32		24,81
Heřmánek 2 / 60 °C	4,51	17,52	93,23	18,79
Heřmánek 2 / 80 °C	9,6	23,84		25,57

Zjištěné hodnoty uvedené v tabulce 14 ukazují, že antioxidační aktivita obou vzorků heřmánku se výrazně neliší. AA výluhu sušeného heřmánku byla nižší než u předešlých výluhů aromatických rostlin a pohybovala se v rozmezí 17,52 – 23,84 mg KA/g. U heřmánku přepočteného na sušinu byla AA vyšší (18,79 – 25,57 mg KA/g sušiny).

Výluh heřmánku 2 o teplotě 80 °C vykazoval vyšší AA 23,84 mg KA/g než při teplotě 60 °C (17,52 mg KA/g).

Buřičová s Réblovou [15] také studovaly antioxidační aktivitu heřmánku metodou DPPH. Ve vodním výluhu z květů heřmánku byla nalezena nízká antioxidační aktivita (34,8 mg KA/g sušiny). AA heřmánku byla podle literatury [15] asi o třetinu vyšší, než námi zjištěná AA vodního výluhu heřmánku (max. 25,57 mg KA/g sušiny).

8.3.6 Stanovení antioxidační aktivity řepíku

Vzorky řepíku, které byly použity ke stanovení antioxidační aktivity, byly analyzovány v sušené formě.

V tab. 15 jsou uvedeny vypočtené hodnoty inaktivace odpovídající antioxidační aktivitě řepíku vyjádřené v mg kyseliny askorbové na g vzorku a hodnoty přepočtené i na sušinu vzorku řepíku.

Tab. 15. Výsledky stanovení antioxidační aktivity řepíku – výluhu

Vzorek / teplota [°C]	Inaktivace [%]	AA [mg KA/ g vzorku]	Sušina [%]	AA [mg KA/ g sušiny]
Řepík 1 / 60 °C	18,39	87,52	93,70	93,04
Řepík 1 / 80 °C	39,41	61,27		65,39
Řepík 2 / 60 °C	13,11	70,66	93,53	75,55
Řepík 2 / 80 °C	46,19	69,78		74,61

Z výsledků měření lze konstatovat, že antioxidační aktivita výluhu sušeného řepíku se pohybovala v rozmezí 61,27 – 87,52 mg KA/g. AA výluhu přepočteného na sušinu vzorku byla 65,39 – 93,04 mg KA/g sušiny.

Z výsledků měření vyplývá, že nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u vzorku řepíku 1 (60 °C) 87,52 mg KA/g. U vzorku výluhu při teplotě 80 °C byla zjištěna nejnižší AA řepíku 1 (61,27 mg KA/g).

Marcinčák a kol. [15] ve své práci stanovovali antioxidační aktivitu v methanolových extraktech vybraných bylin. Výsledky stanovení ukazují, že řepík má dobrou schopnost vychytávat volné radikály proti stabilnímu DPPH radikálu (85,2 % inaktivace).

Gião a kol. se ve své práci zabývali závislostí míry extrakce látek odpovědných za AA vodních výluhů léčivých rostlin (řepíku, šalvěže a saturejky) na čase vyluhování a velikosti vyluhovaných částic rostlinného materiálu. Bylo zjištěno, že účinek extrakce byl závislý na době vyluhování a i na velikosti vyluhovaných částic. Za minimální dobu potřebnou k zajištění přijatelné míry extrakce je možno považovat 5 minut, a pro lepší účinek výluhu je doporučována hodnota velikosti částic rostlinného materiálu 0,2 mm. [56]

8.3.7 Stanovení antioxidační aktivity oregana

Ke stanovení antioxidační aktivity oregana byly analyzovány vzorky ogerana ve formě sušené a lyofilizované.

V tab. 16 jsou uvedeny vypočtené hodnoty inaktivace odpovídající antioxidační aktivitě oregana vyjádřené v mg kyseliny askorbové na g vzorku a hodnoty přepočtené i na sušinu vzorku oregana.

Tab. 16. Výsledky stanovení antioxidační aktivity oregana - výluhu

Vzorek / teplota [°C]	Inaktivace [%]	AA [mg KA/ g vzorku]	Sušina [%]	AA [mg KA/ g sušiny]
Oregano 1 / 60 °C	13,14	70,29	93,53	75,15
Oregano 1 / 80 °C	52,62	78,26		83,67
Oregano 1 / 100 °C	60,38	86,03		91,98
Oregano 2 / 60 °C	36,89	144,12	93,10	154,80
Oregano 2 / 80 °C	37,32	146,97		157,86
Oregano 2 / 100 °C	24,01	208,80		224,27
Oregano 3 / 60 °C	6,00	19,42	-	-
Oregano 3 / 80 °C	7,10	20,80		-

Z výsledků stanovení antioxidační aktivity u oregana je patrné, že AA oregana se lišila vzhledem k použité formě aromatických rostlin. Pohybovala se v rozmezí od 19,42 do 208,80 mg KA/g. U vzorků přepočtených na sušinu se AA pohybovala v rozmezí od 75,15 do 224,27 mg KA/g sušiny.

Nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u vzorku oregana 2 při teplotách výluhu 60, 80 i 100 °C. Výluh o teplotě 100 °C měl nejvyšší AA - 208,8 mg KA/g, AA výluhu o teplotě 80 °C byla 146,97 mg KA/g a při teplotě 60 °C to bylo 144,12 mg KA/g. Nejnižší AA měl lyofilizovaný vzorek oregana 3 (60 °C) 19,42 mg ekv. KA/g. U sušených vzorků oregana přepočtených na sušinu vzorku byla AA nejvyšší u oregana 2 (100 °C) 224,27 mg KA/g sušiny a nejnižší u oregana 1 (60 °C) 75,15 mg KA/g sušiny.

Antioxidační aktivita u výluhu z lyofilizované formy oregana byly 20,8 mg KA/g v koncentrované formě. Lyofilizovaná forma je považována za nejvhodnější zdroj pro přípravu výluhu.

Z tabulky 16 vyplývá, že teplota výluhu má vliv na antioxidační aktivitu. Se vzrůstající teplotou roste i množství látek odpovědných za AA. Výluh o teplotě 100 °C oregana 2 vykazoval o 31 % vyšší AA, než výluh o teplotě 60 °C.

Celkově nejvyšší AA byla zjištěna u výluhu sušeného oregana 2 a nejnižší AA u výluhu lyofilizovaného vzorku oregana 3.

Námi získané výsledky antioxidační aktivity sušených výluhů oregana jsou ve shodě s literárními údaji [15] a [17]. Buřičová a Réblová [15] ve své studii zjistili AA vodního výluhu sušeného oregana (listů) - 118,2 mg KA/g sušiny. Chrpová a kol. [17] stanovili ve své práci antioxidační aktivitu vodního výluhu sušeného oregana vyšší 209,1 mg KA/g sušiny.

Na Obr. 21 je vyobrazen graf závislosti inaktivace (%) na koncentraci výluhu oregana 1 (mg/ml). Z křivky regrese, která byla vyhodnocena z grafu, byla vypočtena hodnota IC_{50} .

Pro stanovení inaktivace byla měřena absorbance 5 vodných výluhů z meduňky. Stanovení a výpočet inaktivace je popsán v kapitole 7.2.3. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 17.

Sestrojená křivka má rovnici regrese:

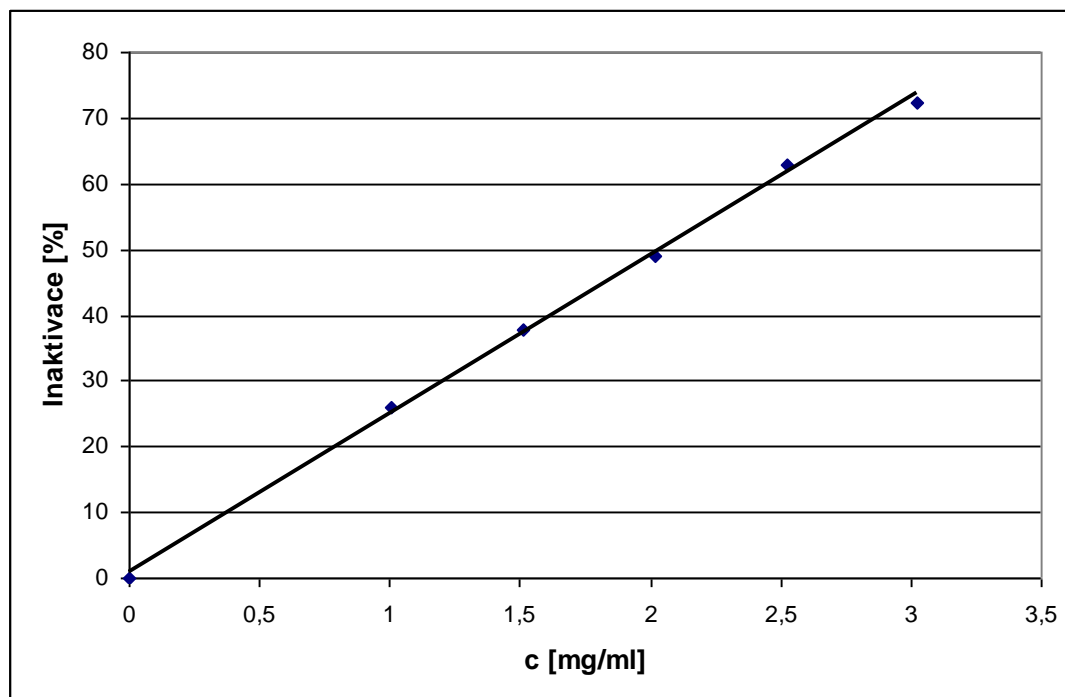
$$y = 24,083 \cdot x + 0,916$$

kde: y ... inaktivace I [%] → pro IC_{50} je hodnota I = 50 %
x ... koncentrace výluhu z oregana [mg/ml]

Korelační koeficient závislosti koncentrace výluhu oregana na inaktivaci: $R = 0,9983$

Tab. 17. Vypočtené hodnoty inaktivace pro jednotlivé koncentrace výluhu oregana 1

Koncentrace [mg/ml]	Inaktivace [%]
1,0087	26,09
1,513	37,89
2,0174	49,01
2,5217	62,99
3,0261	72,44



Obr. 21. Závislost koncentrace výluhu z oregana 1 na inaktivaci

Z rovnice křivky na obrázku 21 byla vypočítána hodnota IC_{50} pro oregano 1. Hodnota IC_{50} oregana 1 byla 2,04 mg/ml, což je koncentrace, při které se odbourá 50 % množství radikálu DPPH. V diplomové práci byly stanoveny 3 hodnoty IC_{50} (meduňky 1, oregana 1 a bazalky 1). Vzorek oregana měl průměrnou hodnotu IC_{50} .

Hodnotu IC_{50} zjišťovali ve své práci Su, Lan a kol. [22] u methanolových a acetonových výluhů oregana metodou DPPH. Vyšší hodnota DPPH radikálové zhášecí aktivity je spojena s nižší hodnotou IC_{50} . Z výsledků měření bylo zjištěno, že acetonový extrakt oregana měl nižší hodnotu IC_{50} než jeho methanolový extrakt. Acetonový extrakt je vhodnější pro vyluhování antioxidační aktivity složek oregana.

8.3.8 Stanovení antioxidační aktivity bazalky

Ke stanovení antioxidační aktivity bazalky byly analyzovány vzorky bazalky ve formě sušené a lyofilizované.

V tab. 18 jsou uvedeny vypočtené hodnoty inaktivace odpovídající antioxidační aktivitě bazalky vyjádřené v mg kyseliny askorbové na g vzorku a hodnoty přepočtené i na sušinu vzorku bazalky.

Tab. 18. Výsledky stanovení antioxidační aktivity bazalky - výluhu

Vzorek / teplota [°C]	Inaktivace [%]	AA [mg KA/ g vzorku]	Sušina [%]	AA [mg KA/ g sušiny]
Bazalka 1 / 60 °C	35,62	56,75	91,22	62,21
Bazalka 1 / 80 °C	53,06	77,81		85,30
Bazalka 1 / 100 °C	53,28	75,94		83,25
Bazalka 2 / 60 °C	17,64	84,56	91,98	91,93
Bazalka 2 / 80 °C	17,51	84,90		92,30
Bazalka 2 / 100 °C	53,67	78,67		85,53
Bazalka 3 / 60 °C	3,50	16,23	-	-
Bazalka 3 / 80 °C	6,00	19,40		-
Bazalka 4 / 60 °C	18,86	35,65	-	-
Bazalka 4 / 80 °C	10,83	63,40		-

Antioxidační aktivita výluhu sušené bazalky byla v rozmezí 56,75 – 84,9 mg KA/g. Po přepočtu na sušinu vzorku se AA pohybovala v rozmezí od 62,21 do 92,3 mg KA/g sušiny. Lyofilizované vzorky měly AA v rozmezí 16,23 až 63,4 mg KA/g.

Nejvyšší antioxidační aktivita mezi sušenými vzorky bazalky byla stanovena u vzorku bazalky 2 (80 °C) - 84,9 mg KA/g, i při teplotě výluhu 60 °C (84,56 mg KA/g). Nejnižší AA mezi sušenými vzorky byla zjištěna u vzorku bazalky 1 (60 °C) - 56,75 mg KA/g. Po přepočtu AA na sušinu vzorku bylo zjištěno, že nejvyšší AA obsahoval vzorek bazalky 2 (80 °C) 92,3 mg KA/g sušiny a nejnižší vzorek bazalky 1 (60 °C) 62,21 mg KA/g sušiny.

Porovnáním výsledků lyofilizovaných vzorků bazalky bylo zjištěno, že bazalka 4 má vyšší antioxidační aktivitu (63,4 mg KA/g), než bazalka 3 (19,4 mg KA/g). Koncentrované formy lyofilizované bazalky 3 a 4 vykazovaly vyšší AA.

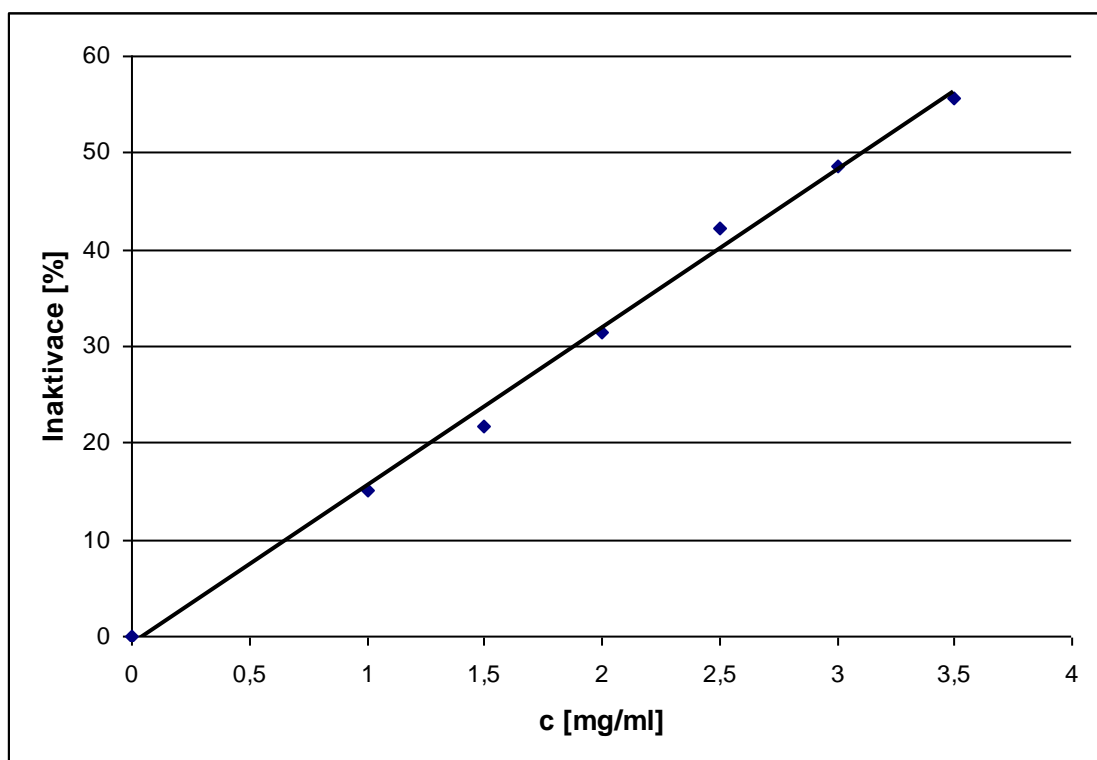
Antioxidační aktivitu bazalky stanovovali Chrpová a kol. za použití metody DPPH [17]. Vodní výluh sušené bazalky při teplotě 70 °C měl antioxidační aktivitu 55,5 mg KA/g sušiny. AA vodního výluhu námi stanovené sušené bazalky byla vyšší max. 92,3 mg KA/g sušiny při teplotě výluhu 80 °C.

Na Obr. 22 je vyobrazena závislost koncentrace výluhu bazalky 1 (mg/ml) na inaktivaci (%). Z křivky regrese, která byla vyhodnocena z grafu, byla vypočtena hodnota IC_{50} .

Pro stanovení inaktivace byla měřena absorbance 6 vodných výluhů bazalky. Stanovení a výpočet inaktivace je popsán v kapitole 7.2.3. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 19.

Tab. 19. Vypočtené hodnoty inaktivace pro jednotlivé koncentrace výluhu bazalky 1

Koncentrace [mg/ml]	Inaktivace [%]
1,00	15,04
1,50	21,65
2,00	31,37
2,50	42,24
3,00	48,54
3,50	55,64



Obr. 22. Závislost koncentrace výluhu z bazalky 1 na inaktivaci

Sestrojená křivka má rovnici regrese:

$$y = 16,353 \cdot x - 0,913$$

kde: y ... inaktivace I [%] \rightarrow pro IC_{50} je hodnota $I = 50$ %

x ... koncentrace výluhu z bazalky [mg/ml]

Korelační koeficient závislosti koncentrace výluhu bazalky na inaktivaci: $R = 0,9954$

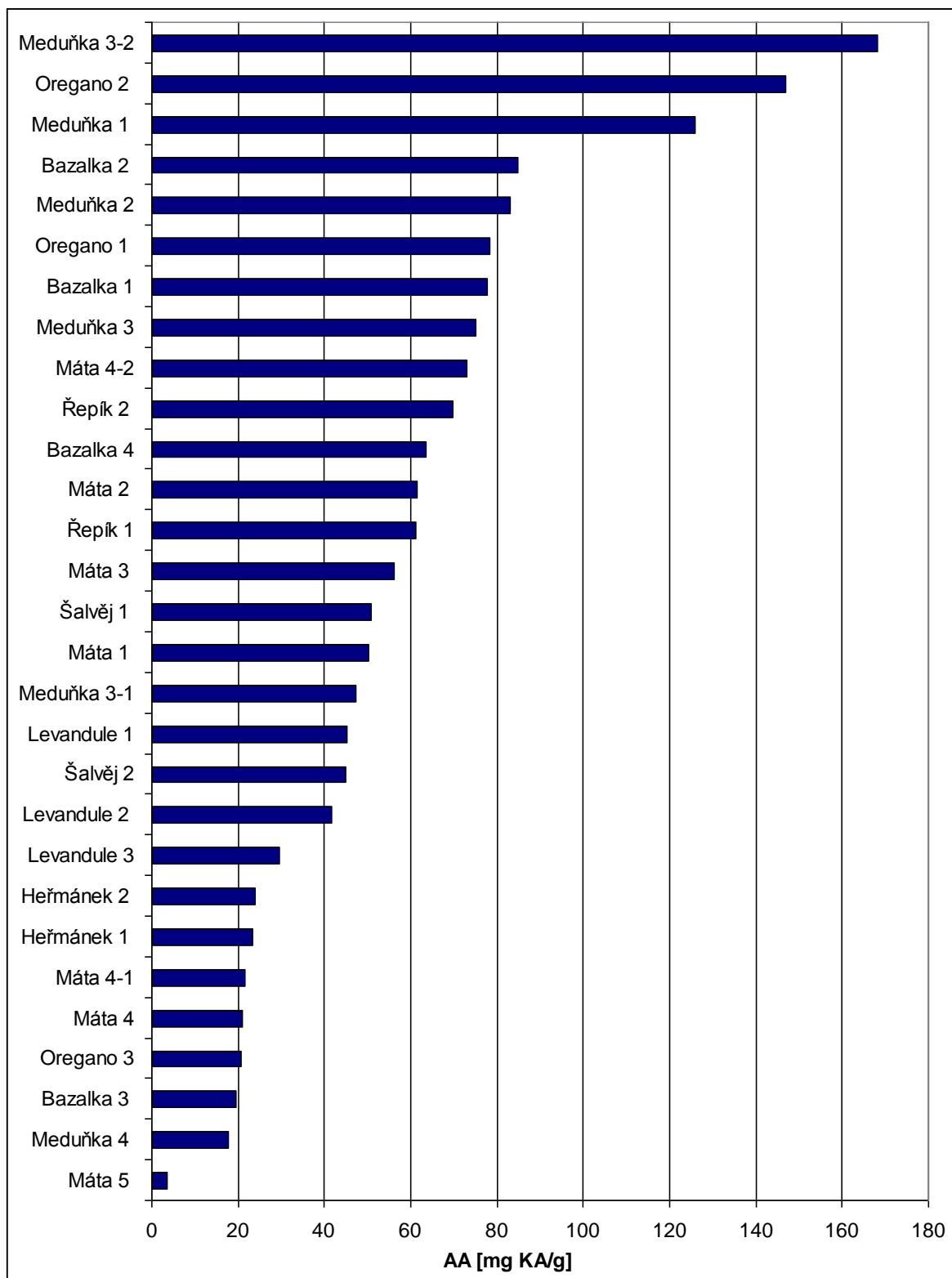
Z rovnice regresní křivky byla vypočítána hodnota IC_{50} pro bazalku 1. Hodnota IC_{50} byla 3,08 mg/ml, což je koncentrace, při které docílí k odbourání 50 % množství radikálu DPPH.

V diplomové práci byly stanoveny hodnoty IC_{50} u 3 aromatických rostlin (meduňka, oregano a bazalka). Ze všech tří hodnot IC_{50} , které byly v práci stanoveny, je hodnota u bazalky 1 nejvyšší, z toho vyplývá, že má nejnižší antioxidační účinek.

8.3.9 Porovnání antioxidační aktivity aromatických rostlin

Ze stanovení antioxidační aktivity vybraných aromatických rostlin (sušených, mražených, čerstvých a lyofilizovaných) byl sestrojen graf, který ukazuje sestupné pořadí antioxidační aktivity aromatických rostlin (obr. 23). Pro sestrojení tohoto grafu byly použity pouze výluhy aromatických rostlin o teplotě 80 °C a antioxidační aktivitě přepočtené na mg KA/g vzorku.

Z výsledků na obr. 23 je patrné, že nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u vzorku meduňky 3-2 (lyofilizovaný vzorek), oregana 2 (sušený vzorek), meduňky 1 (sušený vzorek) a bazalky 2 (sušený vzorek). Nejnižší antioxidační aktivitu vykazoval vzorek máty 5 (čerstvý vzorek), vzorky meduňky 4 (čerstvý vzorek), bazalky 3 (lyofilizovaný vzorek), oregana 3 (lyofilizovaný vzorek), máty 4 a 4-1 (sušený a mražený vzorek) a heřmánek 1 (sušený vzorek).



Obr. 23. Sestupné porovnání antioxidační aktivity aromatických rostlin

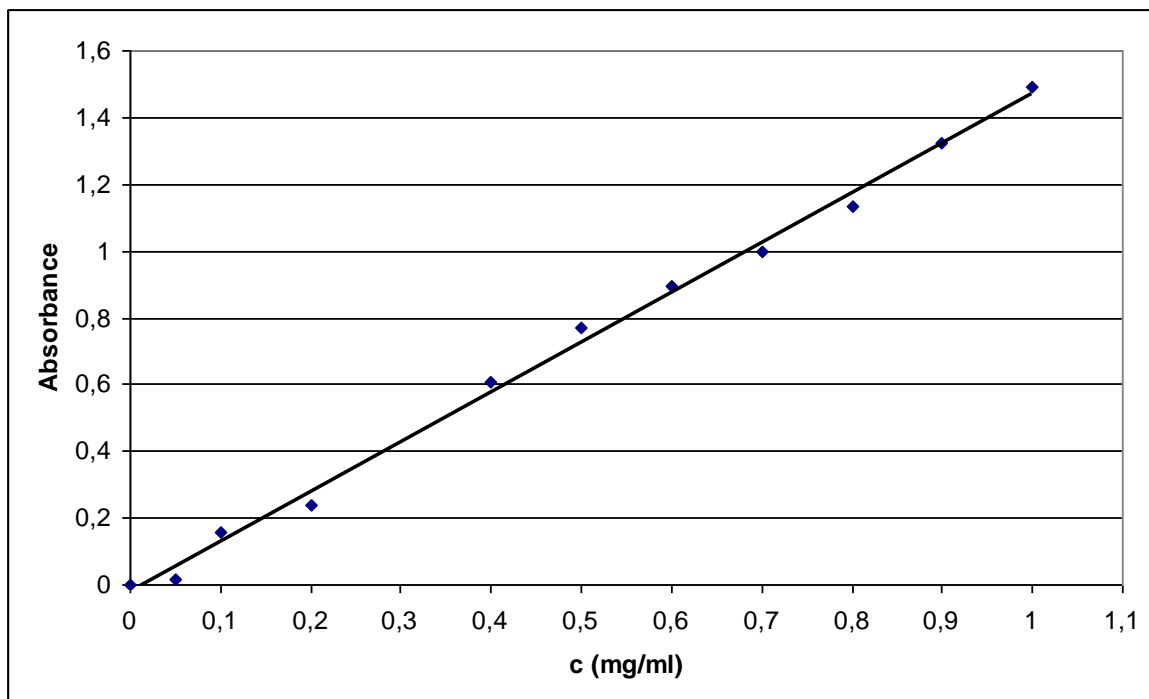
8.4 Stanovení kalibrační křivky kyseliny gallové pro určení obsahu celkových polyfenolů

Pro sestavení kalibrační křivky (obr. 24) byl použit standard kyseliny gallové (GA). Ze standardu GA byl vytvořen zásobní roztok o koncentraci 1 mg/ml. Ze zásobního roztoku bylo vytvořeno 10 kalibračních roztoků o koncentracích v rozpětí 0,05 - 1 mg/ml ředěním zásobního roztoku destilovanou vodou. Příprava zásobního roztoku GA a kalibrační křivky je popsána v kapitole 7.3.4.

Kalibrační křivka GA pro stanovení celkových polyfenolů metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem byla sestavena jako závislost absorbance na koncentraci kalibračních roztoků GA. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 20.

Tab. 20. Naměřené hodnoty absorbance pro jednotlivé koncentrace gallové kyseliny

Koncentrace GA [mg/ml]	Absorbance
0,05	0,017
0,1	0,156
0,2	0,236
0,4	0,607
0,5	0,768
0,6	0,893
0,7	0,997
0,8	1,131
0,9	1,324
1	1,49



Obr. 24. Kalibrační křivka kyseliny gallové

Sestrojená kalibrační křivka má rovnici regrese:

$$y = 1,4912 \cdot x - 0,0191$$

kde: y ... absorbance A

x ... koncentrace kyseliny gallové [mg/ml].

Korelační koeficient závislosti koncentrace kyseliny gallové na absorbanci: $R = 0,9964$.

8.5 Celkový obsah polyfenolů

Celkový obsah polyfenolů (CP) u sušených, lyofilizovaných a mražených vzorků aromatických rostlin byl stanoven spektrofotometricky s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Postup stanovení a výpočet CP je uveden v kapitole 7.3.3.

Dosažením naměřené hodnoty absorbance vzorku aromatické rostliny do rovnice regrese kalibrační křivky GA a přepočtem původní koncentrace aromatické byliny ve výluhu použitým ve stanovení, byl zjištěn a vyjádřen obsah CP jako mg ekvivalentu kyseliny gallové

na gram vzorku a následně, přepočtem na základě hodnoty obsahu sušiny, byla stanovena hodnota mg KG/g sušiny.

Teplota výluhu aromatických rostlin byla zvolena 80 °C. U 3 vzorků aromatických rostlin - meduňka 1, bazalka 1 a oregano 1, které obsahovaly nejvyšší množství polyfenolů, byly pro porovnání připraveny i výluhy o teplotě 60 °C a 100 °C.

Námi zjištěné výsledky celkového obsahu polyfenolů sušených, liofilizovaných a mražených vzorků aromatických rostlin jsou uvedeny v tab. 21 a 22.

Z tab. 21 vyplývá, že celkový obsah polyfenolů u sušených vzorků aromatických rostlin se pohyboval v rozmezí 9,71 – 86,91 mg GA/g. Vzorky, které byly přepočteny na sušinu měly vyšší obsah CP, a to od 10,42 do 93,35 mg GA/g sušiny.

Mezi aromatické rostliny, které měly nejvyšší obsah celkových polyfenolů patří oregano 2 (86,91 mg GA/g), meduňka 2 (74,29 mg GA/g) a oregano 1 (68,78 mg GA/g). Oproti tomu nejnižší hodnotu CP vykazovaly heřmánek 2 (9,71 mg GA/g), heřmánek 1 (11,54 mg GA/g) a šalvěj 2 (24,18 mg GA/g).

U vzorků přepočtených na sušinu vzorku bylo zjištěno, že nejvyšší obsah celkových polyfenolů vykazovaly vzorky oregana a meduňky. Naopak nejnižší obsah CP byl zjištěn u vzorků heřmánku, šalvěje a máty 1.

Z výsledků je zřejmé, že teplota výluhu má vliv na obsah celkových polyfenolů. Čím vyšší teplota výluhu byla použita, tím více celkových polyfenolů se vyluhovalo, s výjimkou výluhu oregana 2 při teplotě 100 °C. Tento výluh měl nižší obsah CP, než výluh připravený při teplotě 80 °C. Tento rozdíl mohla způsobit např. heterogenita navážky vzorku.

Tab. 21. Výsledky stanovení celkového obsahu polyfenolů sušených aromatických rostlin

Vzorek / teplota 80 °C	Odpovídající koncentrace GA [mg/ml]	Obsah polyfeno- lů [mg ekv. GA/g vzorku]	Sušina [%]	Obsah polyfenolů [mg ekv. GA/g sušiny vzorku]
Máta 1 / 80 °C	0,27	26,83	93,9	28,57
Máta 2 / 80 °C	0,39	38,71	93,0	41,62
Máta 3 / 80 °C	0,33	32,76	90,4	36,24
Máta 4	0,24	23,67	-	-
Heřmánek 1 / 80 °C	0,12	11,54	94,0	12,28
Heřmánek 2 / 80 °C	0,10	9,71	93,2	10,42
Meduňka 1 / 80 °C	0,57	56,93	91,7	62,08
Meduňka 2 / 60 °C	0,67	65,41	93,2	70,75
Meduňka 2 / 80 °C	0,66	64,94		69,68
Meduňka 2 / 100 °C	0,75	74,29		79,71
Meduňka 3	0,54	52,97	-	-
Bazalka 1 / 80 °C	0,36	35,56	91,2	38,99
Bazalka 2 / 60 °C	0,35	34,15	92,0	37,12
Bazalka 2 / 80 °C	0,44	43,21		46,97
Bazalka 2 / 100 °C	0,46	45,52		49,48
Levandule 1 / 80 °C	0,38	37,60	89,3	42,11
Levandule 2 / 80 °C	0,34	33,75	88,6	38,09
Šalvěj 1 / 80 °C	0,42	41,82	92,7	45,11
Šalvěj 2 / 80 °C	0,24	24,18	91,9	26,31
Řepík 1 / 80 °C	0,42	41,10	93,7	43,86
Řepík 2 / 80 °C	0,38	38,12	93,5	40,77
Oregano 1 / 80 °C	0,69	68,78	93,5	73,56
Oregano 2 / 60 °C	0,63	60,94	93,1	65,46
Oregano 2 / 80 °C	0,88	86,91		93,35
Oregano 2 / 100 °C	0,79	78,27		84,07

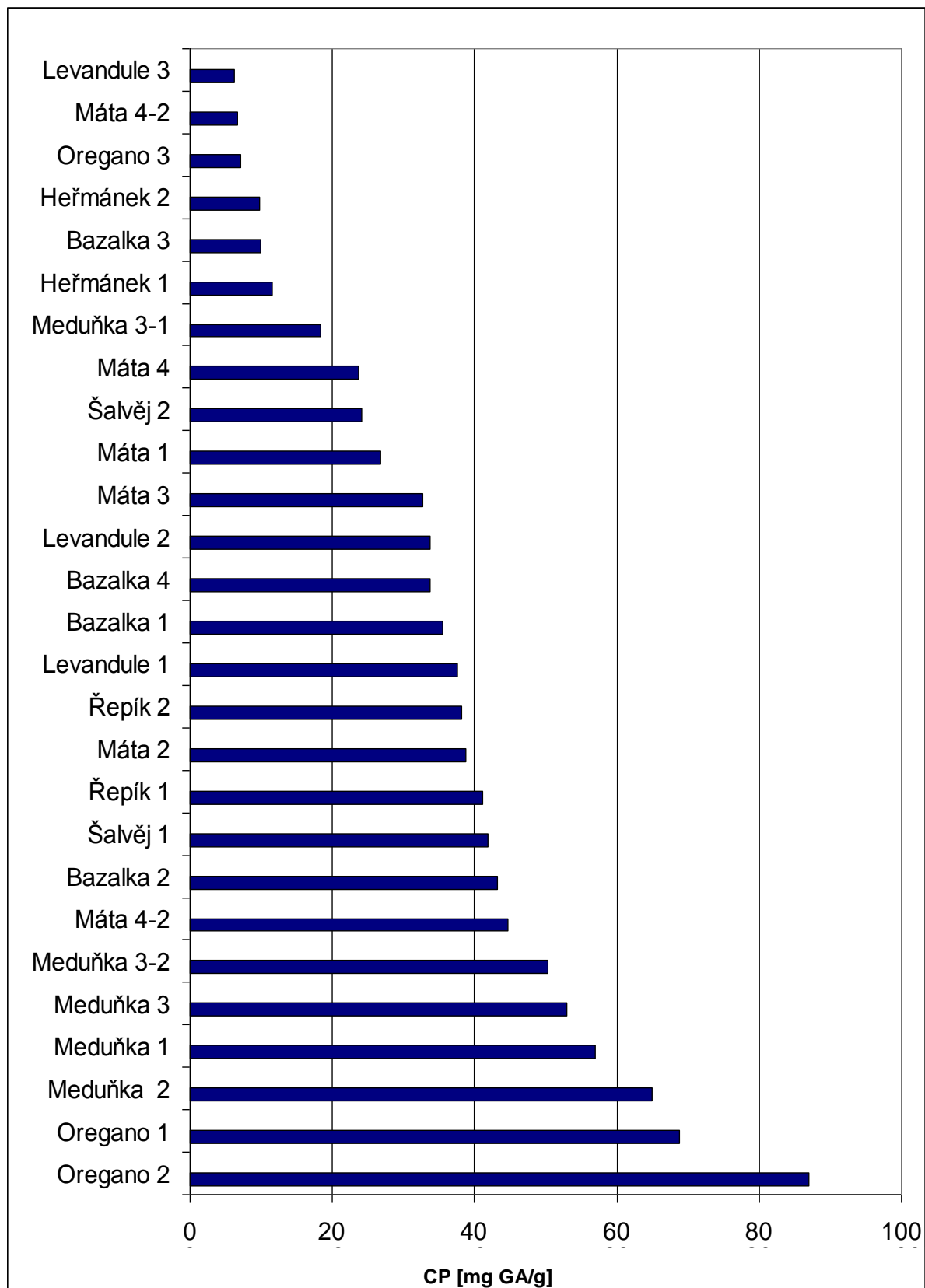
Tab. 22. Výsledky stanovení celkového obsahu polyfenolů mražených a lyofilizovaných vzorků aromatických rostlin

Vzorek / teplota 80 °C	Odpovídající kon- centrace GA [mg/ml]	Obsah polyfenolů [mg ekv. GA/g vzor- ku]
Máta 4-1	0,07	6,69
Máta 4-2	0,45	44,63
Meduňka 3-1	0,19	18,37
Meduňka 3-2	0,51	50,25
Bazalka 3	0,10	9,95
Bazalka 4	0,34	33,80
Levandule 3	0,06	6,17
Oregano 3	0,07	7,04

Nejvyšší obsah celkových polyfenolů vzorků lyofilizovaných aromatických rostlin byl zjištěn u meduňky 3-2 (50,25 mg GA/g), máty 4-2 (44,63 mg GA/g) a u bazalky 4 (33,8 mg GA/g). Naopak nejnižší obsah CP lyofilizovaných vzorků byl stanoven u levandule 3 (6,17 mg GA/g), oregana 3 (7,04 mg GA/g) a u bazalky 3 (9,95 mg GA/g). Vzorek mražené máty 4-1 měl obsah CP (6,69 mg eGA/g) a meduňky 3-1 (18,37 mg GA/g).

Ze stanovení celkového obsahu polyfenolických látek vybraných aromatických rostlin (sušených, mražených a lyofilizovaných) byl sestrojen graf, který ukazuje vzestupné pořadí obsahu CP aromatických rostlin (obr. 25). Pro sestrojení tohoto grafu byly použity pouze výluhy aromatických rostlin o teplotě 80 °C a obsah CP přepočtený na mg KA/g vzorku.

Z výsledků na obr. 25 je patrné, že nejvyšší obsah celkových polyfenolů byl zjištěn u sušených vzorků oregana a meduňky, dále u lyofilizované meduňky a máty. Nejnižší obsah celkových polyfenolů vykazoval vzorek levandule 3 (lyofilizovaný vzorek), máta 4-1 (mražený vzorek) a oregano 3 (lyofilizovaný vzorek). Nízký obsah CP vykazovaly vzorky heřmáněk 1 a 2 (sušené vzorky) a meduňka 3-1 (mražený vzorek).



Obr. 25. Vzestupné porovnání obsahu celkových polyfenolů aromatických rostlin

Chrpová a kol. [17] ve své studii stanovovali metodou s Folin-Ciocalteovým činidlem celkový obsah polyfenolů u vybraných bylin. Z jejich výsledků bylo zjištěno, že celkový obsah polyfenolů se pohyboval v rozmezí 20 – 92 mg GA/g sušiny. Nejvyšší obsah CP byl nalezen u oregana (91,4 mg GA/g), dále pak u máty (89,6 mg GA/g) a bazalky (85 mg GA/g). Po porovnání s našimi výsledky bylo zjištěno, že jsme stanovili nižší obsah CP, než byl obsah uvedený v tomto zdroji [17].

Shan *at. al.* [32] zkoumali kvantitativní množství fenolických látek a obsah celkových polyfenolů u 26 extraktů koření z 12 botanických čeledí. Analýza měření obsahu celkových polyfenolů byla prováděna metodou s použitím Folin-Ciocalteu činidla. Nejvyšší obsah celkových polyfenolů byl stanoven ve vzorku skořice (11,9 g GA/100 g) a ve vzorku oregana (10,17 g GA/100 g). Průměrnou hodnotu CP obsahovaly vzorky šalvěže (5,32 g GA/100g), máty (5,15 g GA/100 g) a bazalky (3,64 g GA/100 g). V této práci bylo zjištěno, že hlavními sloučeninami fenolového složení vyskytující se u oregana byla kyselina kávová, rozmarýnová a p-kumarová. I šalvěj, máta a bazalka obsahovaly rozmarýnovou kyselinu a máta také menthol.

Marcinčák, Popelka a Šoltysová [62] stanovovali spektrofotometricky celkový obsah polyfenolů u methanolových extraktů 10 vybraných bylin. Požitím metody s Folin-Ciocalteuovým činidlem bylo zjištěno, že nejvyšší obsah CP byl nalezen u vzorku oregana (262,1 mg GA/g sušiny), bazalky (249,85 mg GA/g sušiny) a u řepíku (179,2 mg GA/g sušiny).

Chrpová [17] a Shan [32] ve svých studiích sledovali korelaci mezi obsahem celkových polyfenolů a antioxidační aktivitu bylin. Chrpová a kol. našli dobrou korelaci výsledků mezi oběma uvedenými metodami. Shan a kol. určili také dobrou lineární korelaci.

Z výše uvedených literárních zdrojů [32], [17] a [62] vyplývá, že oregano patří mezi nejlepší zdroje obsahu celkových polyfenolů, což se shoduje i s našimi výsledky. Další bohaté zdroje polyfenolů jsou máta a bazalka, které jsou v dobré korelaci s našimi výsledky.

ZÁVĚR

Ke zhoršující kvalitě potravin dochází při jejich zpracování a skladování, a to díky oxidačním procesům především u tuků, sacharidů a bílkovin. Dochází k omezení údržnosti mnohých produktů. Antioxidanty jsou látky, které prodlužují údržnost potravin tak, že je chrání před oxidací, jejíž projevem je žluknutí přítomných tuků a dalších snadno se oxidujících látek. Antioxidační vlastnosti vykazuje řada rostlinných potravinářských materiálů např. aromatické rostliny (rozmarýn, šalvěj, oregano, tymián a hřebíček), dále ovoce a zelenina.

Cílem diplomové práce bylo stanovení antioxidační aktivity a obsahu celkových polyfenolů u vybraných druhů aromatických rostlin. Antioxidační aktivita aromatických rostlin byla stanovována metodou DPPH a obsah celkových polyfenolů metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem.

Byla zjištěna antioxidační aktivita a celkový obsah polyfenolů Provedením analýzy 29 vzorků 8 různých druhů aromatických rostlin (máta, meduňka, levandule, šalvěj, řepík, heřmánek, oregano a bazalka) ve vodních extraktech ze sušené, lyofilizované, mražené nebo čerstvé formy.

Principem stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH je reakce volného radikálu DPPH• (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) s antioxidanty obsaženými ve vzorku a porovnáním se standardem kyseliny askorbové. Pro stanovení celkových polyfenolů byla použita fotometrická metoda s Folin-Ciocalteuovým činidlem a standardem kyseliny gallové. Principem této metody je oxidace nebo redukce fenolových látek při reakci s Folin-Ciocalteuovým činidlem, které se skládá s wolframu sodného, kyseliny orthofosforečné, kyseliny chlorovodíkové, molybdenanu sodného, síranu lithného a bromu.

Dle metody DPPH byla zjištěna antioxidační aktivita aromatických rostlin při teplotě výluhu 80 °C. Nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u lyofilizovaného vzorku meduňky (168,12 mg KA/g), sušeného vzorku oregana (146,97 mg KA/g), meduňky (125,88 mg KA/g) a bazalky (84,90 mg KA/g). Nejnižší antioxidační aktivitu vykazoval čerstvý vzorek máty 5 (3,57 mg KA/g). Nízkou antioxidační aktivitu vykazovaly vzorky čerstvé meduňky (17,76 mg KA/g), lyofilizovaný vzorek bazalky (19,40 mg KA/g) a lyofilizovaný vzorek oregana (20,80 mg KA/g).

Dle metody s Folin-Ciocalteuovým činidlem byl zjištěn celkový obsah polyfenolických látek u aromatických rostlin při teplotě výluhu 80 °C. Nejvyšší obsah celkových polyfenolů byl zjištěn u sušených vzorků oregana (86,91 mg GA/g a 68,78 mg GA/g), a meduňky (64,94 mg GA/g a 56,93 mg GA/g). Nejnižší obsah celkových polyfenolů vykazoval vzorek lyofilizované levandule (6,17 mg GA/g), vzorek mražené máty (6,69 mg GA/G) a lyofilizovaný vzorek oregana (7,04 mg GA/g). Nízký obsah celkových polyfenolů vykazovaly i sušené vzorky heřmánku (9,71 mg GA/g a 11,54 mg GA/g).

V diplomové práci byl zkoumán i vliv teploty výluhu (60, 80 a 100 °C) na množství vyluhovaných látek odpovědných za antioxidační aktivitu u aromatických rostlin. Z výsledků měření vyplývá, že teplota výluhu má vliv na AA. Rozdíly zjištění v antioxidační aktivitě mohly být způsobeny různými faktory, které ovlivňují i chemické složení aromatických rostlin, jako jsou odrůda, půdní a klimatické podmínky při pěstování, a i heterogenita rostlinného materiálu (kvantitativní zastoupení jednotlivých částí – podíl listů, natě a případných rostlinných nečistot ve vzorku) použitého pro analýzu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HINNEBURG, I., DORMAN, D. H. J., HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*. 2006, roč. 97, č. 1, s. 122-129.
- [2] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1983, 632 s. Typ.č. L18-C3-V-41f/88175.
- [3] POKORNÝ, J., YANISHLIEVA, N., GORDEN, M. *Antioxidants in Food: Practical applications*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2001. 380s. ISBN 1-85573-463-0.
- [4] PLÁTENÍK, J. Reaktivní formy kyslíku v lidském těle. Antioxidační ochrana. LFUK. [online]. [cit. 2012-3-31]. Dostupný z WWW:<http://che1.lf1.cuni.cz/html/ROS_CZE_081209b.pdf>
- [5] IN-HYE, P., SHIN-KYO, CH., KYUNG-BOK, L., YUNG-CHOON, Y., SUK-KYUNG, K., SOOG, K., KYUNG-SIK, S. An antioxidant hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*. *Biomedical and Life Science*. 2004, roč. 27, č. 6, s. 615-618.
- [6] RILEY, P. A. Oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Free Radicals in Biology*. 1994, roč. 65, č. 1, s. 27-33.
- [7] ŠTÍPEK, S. A KOLEKTIV. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Praha: GRADA, 2000. 320 s. ISBN 80-7169-704-4.
- [8] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin 1*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-3-7
- [9] PRASAD, K.CH. a kol. Multiple antioxidants in the prevention and treatment of alzheimer disease: Analysis of biological rationale. *Clinical Neuropharmacology*. 2000, roč. 23, č. 1, s. 2-13.
- [10] DAVÍDEK, J., HAJŠLOVÁ, J., POKORNÝ, J., VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. Praha: Olympia 1991. 142 s.
- [11] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.
- [12] AKOH, C. C., MIN, D. B. *Food Lipids-Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. USA: CRC Press, 2002. ISBN 0-8247-0749-4.

- [13] *Antioxidanty pro zdraví*. [online]. [cit. 2012-3-31]. Dostupný z WWW: http://www.viscojis.cz/teens/index.php?option=com_content&view=article&id=131:115&catid=56&Itemid=106
- [14] *Obrázek*. [online]. [cit. 2012-3-31]. Dostupný z WWW: <http://www.royalcanin.cz/veterinari/pece/kastrovany-pes.html>
- [15] BUŘIČOVÁ, L., RÉBLOVÁ, Z. Czech medical plants as possible sources of antioxidants. *Czech J. Food Sci.* 2008, roč. 26, č. 2, s. 132-138.
- [16] PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ, H., TÁBORSKÁ, E. Metody stanovení anti-oxidanční aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, roč. 98, č. 4, s. 174-179. ISSN 0009-2770.
- [17] CHRPOVÁ, D., KOUŘIMSKÁ, L., GORDON, M. H., HEŘMANOVÁ, V., ROUBÍČKOVÁ, I., PÁNEK, J. Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medical conditions. *Czech J. Food Sci.* 2010, roč. 28, č. 4, s. 317-325.
- [18] SINGH, R., SHUSHNI, M. A. M., BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activities of *Menta piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*. 2011, právě v tisku.
- [19] EBRAHIMABADI, A. H., MAZOOCHI, A., KASHI, F. J., DJAFARI-BIDGOLI, Z., BATOOLI, H. Essentials oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the series parts of *Salvia eremophila* Boss. from Iran. *Food and Chemical Toxicology*. 2010, roč. 48, č. 5, s. 1371-1376.
- [20] HERODEŽ, Š. S., HADOLIN, M., ŠKERGET, M., KNEZ, Ž., Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry*. 2003, roč. 80, č. 2, s. 275-282.
- [21] DELAMARE, A. P. L., MOSCHEN-PISTORELLO, I. T., ARTICO, L., ATTISERAFINI, L., ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of the Essentials oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*. 2007, roč. 100, č. 2, s. 603-608.
- [22] SU, L., YIN, J. J., CHARLES, D., ZHOU, K., MOORE, J., YU, L. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black pepper-

- corn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chemistry*. 2006, roč. 100, č. 3, s. 990-997.
- [23] GLISIC, S., IVANOVIC, J., RISTIC, M., SKALA, D. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2010, roč. 52, č. 1, s. 62-70.
- [24] KULISIC, T., RADONIC, A., KATALINIC, V., MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 2004, roč. 85, č. 4, s. 633-640.
- [25] ZLOCH, Z., ČELAKOVSKÝ, J., AUJEZDSKÁ, A. Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu. Plzeň: ÚHLF UK, 2004, 37s.
- [26] ČÍŽ, M., ČÍŽOVÁ, H., DENEV, P., KRATCHANOVA, M., SLAVOV, A., LOJEK, A. Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Kontrol*. 2010, roč. 21, č. 4, s. 518-523.
- [27] GOMES, A., FERNANDES, E., LIMA, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2005, roč. 65, č. 2-3, s. 45-80.
- [28] KWEE, E. M., NIEMEYER E. D. Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry*. 2011, roč. 128, č. 4, s. 1044-1050.
- [29] PHUONG, M., NGUYEN and EMILY, D., NIEMEYER. Effects of Nitrogen Fertilization on the Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Food Chemistry*. 2008, roč. 56, č. 18, s. 8685-8691.
- [30] HNÍZDOVÁ, I., LUHOVÁ, L., PETŘIVALSKÝ, M. Nitrace proteinů reaktivními formami dusíku. *Chem. listy*. 2009. roč. 103, č. 8, s. 788-794.
- [31] CAPECKA, E., MARECZEK, A., LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. *Food Chemistry*. 2005, roč. 93, č. 2, s. 223-226.

- [32] SHAN, B., Z CAI, Y., SUN, M., CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, roč. 53, č. 20, s. 7749-7759.
- [33] CHRPOVÁ, D. *S výživou zdravě po celý rok*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2010. 136s. ISBN 978-80-247-2512-3.
- [34] BUREŠOVÁ P., PAVELKOVÁ K. Přídavné látky (aditiva). [online]. [cit. 2012-1-30]. Dostupný z WWW: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1005724&docType=ART&nid=11324>
- [35] POKORNÝ, J., SCHMIDT, Š. Trendy použití přírodních antioxidantů pro stabilizaci tuků a olejů proti oxidačnímu žluknutí. *Vitamíny 2003 – Přírodní antioxidanty a volné radikály*. 2003.
- [36] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. 2. Tábor: OSSIS 1999, 328 s. ISBN 80-902391-4-5.
- [37] LENAŽ, G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta*. 1909. roč. 10. č. 1-2. s. 53-67.
- [38] SMITH, J., HONG-SHUM, L. *Food Additives Data Book*. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2003. ISBN 978-0-632-06395-6.
- [39] Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídavných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin Příl.7. [online]. [cit. 2012-3-31]. Dostupný z WWW: <http://eagri.cz/public/web/mze/potravin/legislativa/zakonopotravinach/provadeci-predpisy-mzd/100065007.html>
- [40] SCALBERT, A., WILLIAMSON, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*. 2000, roč. 130, č. 8, s. 2073-2085. ISSN 0022-3166.
- [41] FILER, M., KOLÁŘOVÁ, L., HOLČAPEK, M. *Analýza antioxidantů v chmelu a pivu*. [online]. [cit. 2012-3-31]. Dostupný z WWW: <http://www.vscht.cz/anl/soutez2007/abstrakt-Fidler.pdf>
- [42] SCALZO, R. L. Organic acids influence on DPPH· scavenging by ascorbic acid. *Food Chemistry*, 2008, roč. 107, č. 1, s. 40-43.

- [43] BULÁNKOVÁ, I. *Léčivé rostliny na naší zahradě*. Praha: GRADA, 2005. 104 s. ISBN 80-247-1274-1.
- [44] *Obrázek bazalky*. [online]. [cit. 2012-3-31]. Dostupný z WWW: <http://www.garten.cz/a/cz/3001-ocimum-basilicum-bazalka-prava/f>
- [45] *Obrázek máty peprné*. [online]. [cit. 2012-4-3]. Dostupný z WWW: <http://www.burrzo.cz/bylinky-a-leceni-mata-peprna.html>
- [46] LEE, S.J., UMANO, K., SHIBAMOTO, T., LEE, K.G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 2005. roč. 91, č. 1, s. 131-137.
- [47] TYAGI, A. K., MALIK, A. Antimicrobial potencial and chemical composition of *Menta piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control*, 2011. roč. 22, č. 11, s. 1707-1714.
- [48] *Obrázek šalvěže lékařské*. [online]. [cit. 2012-4-3]. Dostupný z WWW: <http://www.salvej.com/>
- [49] *Obrázek meduňka lékařské*. [online]. [cit. 2012-4-3]. Dostupný z WWW: <http://sxcurlain.en.made-in-china.com/product/boYQMIBuAOhP/China-Lemon-Balm-Extract.html>
- [50] *Obrázek oregana a levandule*. [online]. [cit. 2012-4-3]. Dostupný z WWW: http://www.ufseeds.com/Oregano_0f1257189041.html
- [51] PORTO, C., DECORTI, D., KIKIC, I. *Lavandula angustifolia* L. ti use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods . *Food Chemistry*, 2009. roč. 112, č. 4, s. 1072-1078.
- [52] COSTA, S. B. and all. Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. *Journal of Food Engineering*, 2012. roč. 110, č. 2, s. 190-199.
- [53] HAJHASHEMI, V., GHANNADI, A., SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003. roč. 89, č. 1, s. 67-71.

- [54] PIRALI-KHEIRABADI, K., SILVA, A. A. T. *Lavandula angustifolia* Essentials oil as a novel and promising natural candidate for tick (*Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*) control. *Experimental Parasitology*, 2010. roč. 126 č. 2, s. 184-186.
- [55] *Obrázek řepíku*. [online]. [cit. 2012-4-4]. Dostupný z WWW: <http://www.luontoportti.com/suomi/en/kukkakasvit/common-agrimony>
- [56] GIAO, M. S., PEREIRA, C. I., FONSECA, S. C., PINTADO, M. E., MALCATA, F. X. Effect of partocle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants *Agrimonia eupatoria*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. *Food Chemistry*, 2009. roč. 117 č. 3, s. 412-416.
- [57] WONG, J. *Vypěstujte si své vlastní léky*. Praha: GRADA, 2011. 223 s. ISBN 9788024736549 8024736543.
- [58] ROCHA, S. M., PETRONILHO, S. at all. Sesquiterpenic composition of the inflorescences of Brazilian chamomile (*Matricaria recutita* L.): Impact of the agricultural practices. *Industrial Crops and Products*, 2011. roč. 34 č. 3, s. 1482-1490.
- [59] CHANDRASHEKHAR, V. M., HALAGALI, K. S., NIDAVANI, R. B., SHALAVADI, M. H., BIRADAR, B. S., BISWAS, D., MUCHACHANDI, I. S. Anti-allergic activity of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) in mast cell mediated allergy model. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011. roč. 137 č. 1, s. 336-340.
- [60] *Obrázek heřmánku*. [online]. [cit. 2012-4-4]. Dostupný z WWW: http://hobby.idnes.cz/hermanek-pravy-matricaria-recutita-d6e/herbar.aspx?c=A080715083506herbar_lud
- [61] ZHENG, W., WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.*, 2001. roč. 49, č. 11, s. 5165-5170.
- [62] MARCINČÁK, S., POPELKA, P., ŠOLTYSOVÁ, L. Polyphenols and antioxidative capacity of extracts from selected slovakian plants. *Sci. Pol.*, 2008. roč. 7, č. 2, s. 9-14.
- [63] WOJDYŁO, A., OSZMIAŃSKI, J., CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selcted herbs. *Food Chemistry*, 2007. roč. 105, č. 3, s. 940-949.

- [64] KULISIC, T., RADONIC, A., KATALINIC, V., MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 2004. roč. 85, č. 4, s. 633-640.
- [65] *Rostliny jako zdroje přírodních antioxidantů*. PARKÁNYIOVÁ, J., PARKÁNYIOVÁ, L., POKORNÝ, J. VŠCHT, Praha, 2003. [online]. [cit. 2012-4-25]. Dostupný z WWW: <www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/p/P_30C.doc>
- [66] CICCO, N., LANORTE, M. T., PARAGGIO, M., VIGGIANO, M., LATTANZIO, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 2009, 91, s. 107 – 110.
- [67] PICCAGLIA, R., MAROTTI, M., GIOVANELLI, E., DEANS, S.G., EAGLESHAM, E. Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 1993. roč. 2 č. 1, s. 47-50.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ROS	Reaktivní formy kyslíku.
BHA	Butylhydroxyanisol.
BHT	Butylhydroxytoulén.
AK	Kyselina askorbová
GA	Kyselina Gallová.
AA	Antioxidační aktivita.
CP	Celkové polyfenoly.
DPPH	Difenylpikrylhydrazyl.
TAC	Celková antioxidační aktivita.
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity.
FRAP	Ferric reduction ability of plasma.
FOX	Ferrous oxidation assay.
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-S-triazin.
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie.
ABTS	2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát).
β -PE	β -fykoerytrin.
AAPH	2,2-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid.

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Schéma autooxidačního mechanismu</i>	16
<i>Obr. 2. Působení volných radikál</i>	19
<i>Obr. 3. Reakce primárních fenolových antioxidantů</i>	28
<i>Obr. 4. Thymol, karvakrol a guajakol</i>	28
<i>Obr. 5. Kyselina gallová, kyselina skořicová a kyselina chlorogenová</i>	28
<i>Obr. 6. Kyselina rozmarýnová a kávová</i>	29
<i>Obr. 7. Sinapin</i>	29
<i>Obr. 8. Kapsaicin</i>	29
<i>Obr. 9. Karnosol a rosmarol</i>	29
<i>Obr. 10. Chemická struktura DPPH radikálu</i>	33
<i>Obr. 11. Bazalka pravá</i>	39
<i>Obr. 12. Máta peprná</i>	40
<i>Obr. 13. Šalvěj lékařská</i>	41
<i>Obr. 14. Meduňka lékařská</i>	43
<i>Obr. 15. Oregano</i>	43
<i>Obr. 16. Levandule lékařská</i>	44
<i>Obr. 17. Řepík lékařský</i>	45
<i>Obr. 18. Heřmánek pravý</i>	46
<i>Obr. 19. Kalibrační křivka kyseliny askorbové</i>	59
<i>Obr. 20. Závislost koncentrace výluhu z meduňky I na inaktivaci</i>	65
<i>Obr. 21. Závislost koncentrace výluhu z oregana I na inaktivaci</i>	72
<i>Obr. 22. Závislost koncentrace výluhu z bazalky I na inaktivaci</i>	74
<i>Obr. 23. Sestupné porovnání antioxidační aktivity aromatických rostlin</i>	76
<i>Obr. 24. Kalibrační křivka kyseliny gallové</i>	78
<i>Obr. 25. Vzestupné porovnání obsahu celkových polyfenolů aromatických rostlin</i>	82

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Přehled reaktivních forem kyslíku</i>	14
<i>Tab. 2. Příklady antioxidantů obsažených v potravinách rostlinného původu</i>	21
<i>Tab. 3. Seznam povolených antioxidantů v ČR</i>	25
<i>Tab. 4. Přehled aromatických rostlin používaných k analýze</i>	50
<i>Tab. 5. Obsah sušiny v aromatických rostlinách</i>	57
<i>Tab. 6. Vypočtené hodnoty inaktivace pro jednotlivé koncentrace kyseliny askorbové</i>	58
<i>Tab. 7. Výsledky stanovení antioxidační aktivity sušené máty - výluhu.....</i>	60
<i>Tab. 8. Výsledky stanovení antioxidační aktivity mražené, lyofilizované a čerstvé máty - výluhu</i>	61
<i>Tab. 9. Výsledky stanovení antioxidační aktivity sušené meduňky - výluhu</i>	62
<i>Tab. 10. Výsledky stanovení antioxidační aktivity mražené, lyofilizované a čerstvé meduňky - výluhu</i>	64
<i>Tab. 11. Vypočtené hodnoty inaktivace pro jednotlivé koncentrace výluhu meduňky I</i>	64
<i>Tab. 12. Výsledky stanovení antioxidační aktivity levandule - výluhu</i>	66
<i>Tab. 13. Výsledky stanovení antioxidační aktivity šalvěže - výluhu</i>	67
<i>Tab. 14. Výsledky stanovení antioxidační aktivity heřmánku - výluhu</i>	68
<i>Tab. 15. Výsledky stanovení antioxidační aktivity řepíku – výluhu</i>	69
<i>Tab. 16. Výsledky stanovení antioxidační aktivity oregana - výluhu.....</i>	70
<i>Tab. 17. Vypočtené hodnoty inaktivace pro jednotlivé koncentrace výluhu oregana I</i>	71
<i>Tab. 18. Výsledky stanovení antioxidační aktivity bazalky - výluhu</i>	73
<i>Tab. 19. Vypočtené hodnoty inaktivace pro jednotlivé koncentrace výluhu bazalky I</i>	74
<i>Tab. 20. Naměřené hodnoty absorbance pro jednotlivé koncentrace gallové kyseliny</i>	77
<i>Tab. 21. Výsledky stanovení celkového obsahu polyfenolů sušených aromatických rostlin.....</i>	80
<i>Tab. 22. Výsledky stanovení celkového obsahu polyfenolů mražených a lyofilizovaných vzorků aromatických rostlin</i>	81