

# Změny obsahu polyfenolických látek a antioxidační aktivity v extraktech máty

Bc. Denisa Zemánková

---

Diplomová práce  
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin  
akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Denisa Zemánková**  
Osobní číslo: **T15315**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie potravin**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Změny obsahu polyfenolických látek a antioxidační aktivity v extraktech máty**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Charakteristika máty, její popis, chemické složení, vlastnosti a využití
2. Popis antioxidantů, zástupci, zdroje a působení
3. Přehled analytických metod stanovení antioxidantů, polyfenolů a antioxidační aktivity

### II. Praktická část

1. Stanovení sušiny, celkového obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity máty spektrometrickými metodami
2. Stanovení vybraných polyfenolů a vitamínu C v mátě chromatografickými metodami

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] YI, W. a H.Y. Wetzstein. Effects of Drying and Extraction Conditions on the Biochemical Activity of Selected Herbs. HortScience. 2011, 46, 1, s.70-73.  
[2] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 3. Tábor: OSSIS, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.  
[3] Stagos, D. et al. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. Food and Chemical Toxicology. 2012, 50, 11, p. 4115-4124.  
[4] JANČA, Jan a Josef A. ZENTRICH. Herbář léčivých rostlin. Praha: EMINENT, 1994. ISBN 80-85876-02-7.  
[5] ATANNASOVA, M., S. GEORGIEVA a K. IVANCHEVA. Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. 2011, 46 (1), s. 81-88.

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Soňa Škrovánková, Ph.D.**

Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání diplomové práce:

**3. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce:

**28. dubna 2017**

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*děkan*



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

Příjmení a jméno: SEMÁNKOVÁ DENISA

Obor: TP

## 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<sup>1)</sup>;
- 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<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> 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<sup>3)</sup> 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 19. 4. 2014

Semánková

<sup>1)</sup> 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 nevydělečně 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.

<sup>2)</sup> 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, užíje-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).

<sup>3)</sup> 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). Odpirá-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 jim 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 přihlíáde k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se v teoretické části zabývá charakteristikou máty, jejími vlastnostmi a chemickým složením. Dále popisem antioxidantů, jejich působením a popisem analytických metod využívaných ke stanovení antioxidační aktivity, polyfenolů a vitamínu C. Praktická část se zabývá změnami celkového obsahu polyfenolických látek a antioxidační aktivity (DPPH a ABTS) spektrofotometrickou metodou v extraktech máty v závislosti na úpravě vzorku, přípravě extraktu a uchování máty. Také jsou metodou HPLC s UV-VIS detekcí v mátě určeny vybrané polyfenolické látky a vitamin C.

Klíčová slova: máta, polyfenoly, antioxidační aktivita, vitamin C, HPLC

## **ABSTRACT**

The thesis in the theoretical part deals with the characteristics of mint, its properties and chemical composition. It also deals with the description of antioxidants, their effects and description of analytical methods used for determination of antioxidant activity, polyphenols and vitamin C. The experimental part deals with the changes of the total content of polyphenols and antioxidant activity (DPPH and ABTS) using spectrophotometric method in mint extracts depending on sample preparation, extract preparation and preservation of mint. Selected polyphenols and vitamin C in mint are also determined by HPLC method with UV-VIS detection.

Keywords: mint, polyphenols, antioxidant activity, vitamin C, HPLC

Ráda bych poděkovala vedoucí této diplomové práce Ing. Soně Škrovánkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a pomoc při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Lence Fojtíkové za ochotu a pomoc při vykonávání praktické části diplomové práce. Rovněž děkuji mému příteli a rodině za velkou podporu během studia.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 MÁTA</b> .....	<b>12</b>
1.1 DRUHY MÁTY .....	12
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ.....	16
1.3 VYUŽITÍ MÁTY .....	16
1.4 ANTIOXIDAČNÍ VLASTNOSTI.....	17
1.5 ANTIMIKROBIÁLNÍ VLASTNOSTI .....	18
1.6 UCHOVÁNÍ MÁTY .....	19
1.6.1 Sušení .....	19
1.6.2 Zamrazování.....	20
1.6.3 Výluhy, odvary.....	21
1.6.4 Tinkтуры, vína, likéry.....	21
1.6.5 Další způsoby konzervace.....	22
<b>2 ANTIOXIDANTY</b> .....	<b>23</b>
2.1 KLASIFIKACE ANTIOXIDANTŮ .....	24
2.1.1 Fenolické sloučeniny.....	24
2.1.2 Flavonoidy.....	25
2.1.3 Vitamin C .....	26
2.2 MECHANISMUS PŮSOBENÍ ANTIOXIDANTŮ .....	26
2.2.1 Mechanismus působení fenolových sloučenin.....	26
2.2.2 Mechanismus působení kyseliny askorbové .....	27
<b>3 METODY STANOVENÍ PŘÍRODNÍCH ANTIOXIDANTŮ</b> .....	<b>29</b>
3.1 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY .....	29
3.1.1 Metoda využívající ABTS.....	30
3.1.2 Metoda používající DPPH.....	30
3.2 STANOVENÍ POLYFENOLICKÝCH LÁTEK.....	31
3.2.1 Metoda stanovení celkového obsahu polyfenolů za použití Folin-Ciocalteuova činidla.....	31
3.2.2 Stanovení polyfenolických látek metodou HPLC.....	32
3.3 STANOVENÍ VITAMINU C .....	32
3.3.1 Stanovení vitamínu C pomocí HPLC.....	33
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>35</b>
<b>4 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>36</b>
<b>5 MATERIÁL A PŘÍSTROJE</b> .....	<b>37</b>
5.1 MATERIÁL .....	37
5.2 PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	37
5.3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY .....	38
<b>6 METODIKA STANOVENÍ</b> .....	<b>40</b>



6.1	STANOVENÍ VLHKOSTI A SUŠINY VZORKŮ .....	40
6.2	PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ MÁTY .....	41
6.3	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU DPPH.....	42
6.3.1	Příprava extraktů máty pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH.....	42
6.3.2	Stanovení antioxidační aktivity extraktů máty metodou DPPH .....	42
6.3.3	Kalibrační křivka kyseliny askorbové.....	43
6.4	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU ABTS.....	43
6.4.1	Příprava extraktů máty pro stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS.....	43
6.4.2	Měření antioxidační aktivity extraktů máty metodou ABTS .....	44
6.4.3	Kalibrační křivka troloxu .....	44
6.5	STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU POLYFENOLŮ S FOLIN-CIOCALTEUOVÝM ČINIDLEM .....	45
6.5.1	Příprava extraktů máty pro stanovení celkového obsahu polyfenolů .....	45
6.5.2	Měření celkového obsahu polyfenolů extraktů máty .....	45
6.5.3	Kalibrační křivka kyseliny gallové .....	46
6.6	STANOVENÍ VYBRANÝCH POLYFENOLŮ METODOU HPLC/DAD .....	46
6.6.1	Příprava extraktů máty pro stanovení vybraných polyfenolů metodou HPLC/DAD.....	46
6.6.2	Podmínky stanovení vybraných polyfenolů metodou HPLC/DAD .....	46
6.6.3	Stanovení kalibračních křivek standardů .....	47
6.7	STANOVENÍ VITAMINU C METODOU HPLC/DAD.....	48
6.7.1	Příprava extraktů máty pro stanovení vitamínu C metodou HPLC/DAD.....	48
6.7.2	Podmínky stanovení vitamínu C metodou HPLC/DAD .....	48
6.7.3	Stanovení kalibrační křivky kyseliny askorbové .....	48
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>49</b>
7.1	STANOVENÍ VLHKOSTI A SUŠINY .....	49
7.2	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU DPPH.....	50
7.2.1	Kalibrační křivka kyseliny askorbové.....	50
7.2.2	Porovnání účinnosti použitých rozpouštědel v rámci metody DPPH u čerstvých vzorků máty .....	51
7.2.3	Stanovení antioxidační aktivity extraktů ze vzorků čerstvé a 3 dny skladované máty pomocí DPPH.....	52
7.2.4	Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH extraktů ze sušených vzorků máty a porovnání účinnosti použitých rozpouštědel.....	54
7.2.5	Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH u extraktů z mražených vzorků máty a porovnání účinnosti použitých rozpouštědel.....	57
7.2.6	Vliv úpravy na antioxidační aktivitu stanovenou pomocí DPPH .....	58
7.3	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU ABTS.....	61
7.3.1	Kalibrační křivka troloxu .....	62
7.3.2	Porovnání účinnosti použitých rozpouštědel v rámci metody ABTS u čerstvých vzorků máty .....	63
7.3.3	Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS extraktů ze vzorků čerstvé a 3 dny skladované máty.....	64

7.3.4	Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS extraktů ze sušených vzorků máty a porovnání účinnosti použitých rozpouštědel.....	66
7.3.5	Stanovení antioxidační aktivity extraktů pomocí ABTS z mražených vzorků máty a porovnání účinnosti použitých rozpouštědel.....	68
7.3.6	Vliv úprav vzorků na antioxidační aktivitu stanovenou pomocí ABTS .....	69
7.4	STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU POLYFENOLŮ POMOCÍ FOLIN-CIOCALTEUOVA ČINIDLA .....	72
7.4.1	Kalibrační křivka kyseliny gallové .....	73
7.4.2	Porovnání účinnosti použitých rozpouštědel v rámci stanovení celkového obsahu polyfenolů u čerstvých vzorků máty .....	74
7.4.3	Stanovení celkového obsahu polyfenolů u extraktů ze vzorků čerstvé a 3 dny skladované máty .....	75
7.4.4	Stanovení celkového obsahu polyfenolů extraktů ze vzorků sušené máty a porovnání účinnosti použitých rozpouštědel .....	77
7.4.5	Stanovení celkového obsahu polyfenolů extraktů z mražených vzorků máty a porovnání účinnosti použitých rozpouštědel .....	80
7.4.6	Vliv úpravy na celkový obsah polyfenolů .....	81
7.4.7	Korelace celkového obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity.....	84
7.5	STANOVENÍ VYBRANÝCH POLYFENOLŮ POMOCÍ HPLC/DAD .....	88
7.5.1	Kalibrační křivky standardů .....	88
7.5.2	Stanovení vybraných polyfenolů v extraktech máty pomocí HPLC-DAD .....	89
7.6	STANOVENÍ OBSAHU KYSELINY ASKORBOVÉ (VITAMINU C) POMOCÍ HPLC/DAD .....	95
7.6.1	Kalibrační křivka kyseliny askorbové stanovená pomocí HPLC/DAD.....	95
7.6.2	Stanovení KA (vitaminu C) v extraktech z čerstvých vzorků máty.....	96
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>98</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>100</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>106</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>108</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>110</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>111</b>

## ÚVOD

Rod *Mentha* se řadí do čeledi *Lamiaceae* a zahrnuje 25 druhů a několik hybridů. Jedná se o významné aromatické léčivé rostliny, které byly již od nepaměti pěstovány a používány v rámci tradiční medicíny, potravinářství, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Mezi nejvýznamnější druhy patří máta peprná (*Mentha x piperita*), u které existují důkazy, že byla pěstována již ve starověkém Egyptě.

Pro mátu je charakteristická přítomnost silice, kdy její složení udává kvalitu máty. V rámci jednotlivých druhů máty je složení silice rozdílné. Z hlavních látek byly identifikovány mentol, menton, isomenton, sabinen, mentofuran, piperiton, dále trísloviny, hořčiny, flavonové glykosidy, pepermint, flavonoidy, cholin a taniny, přičemž mentol a jeho izomery dodávají mátě její charakteristickou vůni a chuť.

Mátu je možné konzumovat jak v čerstvém, tak i v sušeném stavu, kde je využívána pro přípravu nápojů, sirupů, čokoládových i nečokoládových cukrovinek. V kosmetickém průmyslu je využívána například při výrobě krémů a pleťových vod a v rámci medicíny a farmaceutického průmyslu jsou uplatňovány její antiseptické, antispasmodické a mírné analgetické vlastnosti. Další významnou vlastností je antimikrobiální aktivita obsažených látek.

Kromě uvedených vlastností je však máta významným zdrojem látek, antioxidantů, které vykazují antioxidační aktivitu. Antioxidanty jsou látky, které působí proti volným radikálům. Ty mohou způsobovat či negativně ovlivňovat mnoho onemocnění, jako je například karcinogeneze, kardiovaskulární onemocnění, ateroskleróza, záněty. Antioxidanty také působí proti oxidaci lipidů, čímž pozitivně ovlivňují i trvanlivost potravin. Mezi látky s antioxidační aktivitou se u máty řadí hlavně fenolické sloučeniny a vitamin C. Polyfenoly si máta syntetizuje jako obranné metabolity, které ji chrání například proti UV záření.

## I. TEORETICKÁ ČÁST

# 1 MÁTA

Byliny, speciálně ty, které patří do čeledi *Lamiaceae* neboli hluchavkovitých, jsou populární aromatické rostliny, které rostou v mnoha oblastech světa. Tato čeleď zahrnuje okolo 230 rodů a 7 100 druhů rostlin. Hodně druhů z této čeledi je důležitých pro jejich využití v medicíně, potravinářství, kosmetice a v produkci silic. Některé z těchto bylin jsou využívány ke zlepšení chuti a aroma potravin a jsou rovněž zdrojem látek, které mají příznivý vliv na zdraví a hrají aktivní roli při zmírnění onemocnění [1, 2].

Z významných rodů se sem kromě rodu *Mentha* řadí také, rody jako *Salvia*, *Thymus*, *Rosmarinus* nebo *Origanum* [1].

Rod *Mentha* má za sebou dlouho historii, co se týká jeho pěstování. Byl pěstován v severních i jižních mírných oblastech podél břehů řek a ve vlhkých oblastech. Předpokládá se, že byl pěstován již ve starověkém Egyptě, ačkoliv první záznamy o pěstování jsou doložené až z roku 1750 z Londýna. Avšak přesný původ pěstování máty peprné je sporný i přes to, že existují důkazy, že byla pěstována již ve starověkém Egyptě a o jejím používání Řeky a Římany dokonce napsal římský přírodovědec Plinius starší. Máta peprná byla poprvé zřetelně označena za druh botanikem Johnem Rayem v jeho knize *Synopsis Stirpium Britannicorum* (2. vydání, 1696) a v knize *Historia Plantarum* z roku 1704. Oficiálně tak byla označena v roce 1721 v *London Pharmacopoeia* [3].

Ve východní i západní tradiční medicíně byla a stále je máta a pepermintový olej, který obsahuje, využíván proti nevolnostem, křečím v zažívacím ústrojí, při léčbě poruch trávení, při nachlazení a bolesti v krku. Dále je využívána i při léčbě rakoviny a bolesti zubů [4].

## 1.1 Druhy máty

Rod *Mentha* je reprezentován 25 druhy a několika hybridy. Vykazuje velkou morfologickou variabilitu [5].

Mezi významnější druhy se řadí máta vonná (*Mentha suaveolens*), která byla v dřívější literatuře nazývána mátou okrouhlostou. Máta vonná je známá také pod označením jako máta ananasová, vyznačuje se totiž ovocnou mátovou vůní a chuťově se hodí ke sladkým pokrmům. Má květy růžové barvy a listy jsou vejčité více přisedlé k lodyze, světle zelené

barvy, přičemž lodyhy a stejně tak i spodní strana listů jsou měkce chlupaté. Roste na vlhkých místech od západní po východní část Evropy a na severu Afriky. Je využívána jako koření a pro její široký rozsah působnosti i v tradiční medicíně. Má stimulační, analgetické, protizánětlivé a insekticidní účinky. Také působí proti nadýmání, křečím a bolestem žaludku [6, 7, 8].



Obr. 1 Máta vonná [9]

Dále se mezi významné druhy rodu *Mentha* řadí také máta klasnatá (*Mentha spicata*) a máta peprná (*Mentha x piperita*), které se využívají v průmyslu farmaceutickém, potravinářském, kosmetickém či jiných příbuzných průmyslech [3].

Máta klasnatá je rozvětvená vytrvalá bylina, která má hranaté lodyhy vysoké až 75 cm. Listy mají krátké řapíky a jsou oválné, ostře špičaté, hluboce žilkované a pilovité. Buď mohou být hladké a jasně zelené barvy nebo šedavé, chlupaté a svraskalé. Kvete v létě purpurově či slabě nafialovělými květy. Roste planě, ve vlhkých půdách ve stínu. Jedná se o nejméně štiplavý, jemně vonící druh, který je často používán pro kulinářské účely. Éterický olej z máty klasnaté je využíván k ochucení cukrovinek a dentálních a farmaceutických přípravků [10, 11].



Obr. 2 Máta klasnatá [12]

Mezi nejznámější a co se týká obsahových látek a biologické aktivity nejlépe prozkoumaný druh rodu *Mentha*, je máta peprná (*Mentha x piperita*). Vznikla křížením máty vodní (*Mentha aquatica*) s mátou klasnatou (*Mentha spicata*). Je pěstována ve všech regionech světa, avšak zejména v Evropě, Severní Americe a severní Africe. Máta lépe prospívá v lehkých humózních a vlhkých půdách. Vyhovují jí teplejší slunečné polohy, pokud je pěstována v polostínu má menší obsah účinné silice [4, 13].

Rodové jméno *Mentha* je odvozeno z řeckého Mintha, jména mýtické nymfy, která se změnila v tuto rostlinu, jméno druhové *piperita* pochází z latinského piper, což znamená pepř, a to kvůli její aromatické a pronikavé chuti. Listy máty peprné jsou vejčité kopinaté, řapíkaté a na okrajích nepravidelně ostře pilovité. Mohou být světle i tmavě zelené barvy. Květy jsou bledě nachové barvy, vyrůstající v lichopřeslenech a uspořádané do klasů. Kvetou od července do září [3, 4, 13].



Obr. 3 Máta peprná [14, 15]

Dalším známým druhem je máta rolní (*Mentha arvensis*), která je nazývána také máta japonská, je pěstována v jihovýchodní Asii a částečně i v USA a v Brazílii. Tento druh se vyznačuje vysokým obsahem mentolu v silici, a proto se řadí k důležitým průmyslovým surovinám pro destilaci silice a získávání přírodního mentolu. Dorůstá výšky 60 – 100 cm. Listy jsou okrouhlé, srstnaté, pilovité a zelené barvy. Květy purpurové barvy se objevují v létě [11, 16].



Obr. 4 Máta rolní [17]

Existují rovněž i kultivary jako například máta pomerančová, máta jablečná nebo i máta citronová [18].



## 1.2 Chemické složení

Pro mátu je charakteristická přítomnost silice, přičemž složení silice je v rámci jednotlivých druhů máty rozdílné a udává kvalitu máty. Z hlavních látek byly identifikovány mentol, menton a isomenton, sabinen, mentofuran, piperiton, dále třísloviny, hořčiny, flavonové glykosidy, pepermint, flavonoidy, cholin a taniny. Přičemž mentol a jeho izomery dodávají mátě její charakteristickou vůni a chuť. V listech máty se rovněž vyskytují mastné kyseliny, zejména kyselina linolová, linolenová a palmitová. Také byla zjištěna přítomnost  $\beta$ -karotenu a chlorofylu [4, 5, 19, 20, 21].

Mnoho rostlin má takové složení a biologickou aktivitu, kdy jejich působením dochází k produkci určitých fyziologických reakcí v těle. Proto tyto rostliny mohou být použity k léčbě různých onemocnění. Mezi nejdůležitější látky s biologickou aktivitou rostlin se řadí alkaloidy, taniny, flavonoidy a fenolické sloučeniny. Důležitý je i obsah biologicky aktivních látek, které mají antioxidační aktivitu. Z těchto látek se v mátě vyskytují například fenolické látky, kyselina askorbová,  $\alpha$  a  $\gamma$ -tokoferol. Z fenolických látek jsou v mátě obsaženy hlavně fenolické kyseliny a flavonoidy. Z fenolických kyselin se jedná například o kyselinu kávovou, ferulovou, chlorogenovou, syringovou, gallovou, vanilovou, rozmarýnovou a p-kumarovou. Z flavonoidů se pak v mátě nachází například kvercetin, katechin, epikatechin, luteolin, rutin, apigenin, myricetin a jiné. Obsah sekundárních metabolitů, jako jsou například fenolické látky a jejich biologická aktivita (antioxidační a antimikrobiální), jsou významné pro bylinné nálevy, koření a léčebné použití máty. Bylo zjištěno, že specifické složky, jako je například pulegon, menton a karvon, mají antimikrobiální, insekticidní a genotoxické účinky [4, 19, 20, 22, 23, 24].

## 1.3 Využití máty

Složení pepermintového oleje je variabilní a jeho obsah se liší v závislosti na klimatu, kultivaru a geografické poloze. Pepermintový olej je běžně používán v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu [4].

Mentol má silné antiseptické vlastnosti a je používán jako surovina do zubních past, žvýkacích tabáků, cukrovinek, žvýkaček, bonbónů, do analgetických balzámů, kapek proti kašli, parfémů atd. Čerstvé nebo sušené listy máty se využívají v osvěžovačích dechu, zubních pastách, na antiseptické výplachy úst [4, 21].

V rámci potravinářství je máta využívána také do nápojů, želé, mátových čokolád, sirupů, cukrovinek, zmrzlin a čajů. Dále je rovněž používána i jako koření, nebo k ochucení. Lístky máty jsou nezbytnou přísadou do čajů Touareg, což je čaj populární v zemích severní Afriky a v Arabských zemích [4, 5].

Avšak vzhledem k tomu, že máta peprná působí jako mírné anestetikum, je nevhodné ji konzumovat dlouhodobě, protože by mohla ovlivnit citlivost organismu vůči jemnému působení bylin. Při předávkování je možné, že kromě toxických projevů (například celková ochablost, křeče), může dojít ke vzniku alergie na mentol, přičemž hlavně citlivé jsou na tuto látku děti. Proto je doporučováno mátu peprnou míchat do směsí [21].

#### 1.4 Antioxidační vlastnosti

Mnoho studií poukazuje na to, že byliny z čeledi *Lamiaceae* mají významné antioxidační vlastnosti hlavně díky složení a množství jednotlivých fenolických sloučenin [1].

Terapeutický potenciál léčivých rostlin, jakožto zdroje přírodních antioxidantů, spočívá ve snižování oxidativního stresu zahrnujícího působení volných kyslíkových radikálů, jehož výsledkem je poškození tkání, chronické poruchy a buněčná smrt. Dochází k redukci volných radikálů způsobujících poškození tkáně a ochraně před degenerativními poruchami spojovanými s věkem, jako jsou koronární onemocnění srdce nebo rakovina. V několika studiích bylo poukázáno na to, že za antioxidační potenciál mnoha rostlin je zodpovědný právě obsah fenolických sloučenin [22].

Fenolické sloučeniny, polyfenoly, flavonoidy, jsou funkční složky, které jsou syntetizovány rostlinou jako její obranné metabolity. Rostliny, jako je například máta, jsou jejich důležitým zdrojem. Z fenolických kyselin byli v mátě identifikovány například kyselina kávová, chlorogenová, rozmarýnová, gallová, vanilová, syringová, p-kumarová, ferulová a 3,4-dihydroxybenzoová. Mezi identifikované flavonoidy se například řadí katechin, epikatechin, rutin, luteolin, apigenin, kvercetin, thymonin, diosmin. Jako dominantní fenolická sloučenina ze skupiny flavonoidů, v extraktech ze sušené máty, byl zjištěn kaempferol 3-O-glukosid [19, 23, 25].

Bylo zjištěno, že kromě extraktů z máty vykazují antioxidační účinky i silice z máty, které obsahují například  $\alpha$  a  $\beta$ -pinen, cineol, jasmon, isomentol, isomenton, ledol, limonen, mentofuran, mentol, menton, mentyl acetát, neomentol, piperiton, pulegon a viridiflorol. Hlavní

sloučeninou pepermintového oleje je mentol, dále však obsahuje také mentyl acetát, isovalerát, menton, cineol, neaktivní pinen, limonen a další méně významné složky [3, 26].

## 1.5 Antimikrobiální vlastnosti

Rostliny z čeledi *Lamiaceae* jsou využívány i pro jejich antimikrobiální vlastnosti. V dnešní době je snaha hledat antimikrobiální látky rostlinného původu, i proto, že roste nedůvěra v antimikrobiální látky syntetického původu [2].

Mikroorganismy mohou způsobovat znehodnocení a kažení potravin, farmaceutických a kosmetických prostředků a různá onemocnění. Navíc v posledních letech roste počet rezistentních bakterií vůči běžně užívaným antibiotikům. Proto je nutné hledat nová antimikrobiální činidla [2].

Tyto rostliny mohou také prodlužovat trvanlivost díky obsahu antimikrobiálních látek. Léčivé rostliny a z nich získané silice a izolované sloučeniny obsahují velké množství sekundárních metabolitů, u kterých je známo, že zpomalují nebo inhibují růst bakterií, kvasinek a plísní. Přírodní antimikrobiální látky mohou být v konzervaci potravin použity buď samostatně, nebo v kombinaci s jinými látkami, se kterými mohou působit synergicky [27].

Antimikrobiální účinky rostlinných extraktů jednoho druhu byliny mohou být ovlivněny, nejen oblastí, kde byla daná bylina pěstována, ale i působením různých faktorů, jako je klima, složení půdy, typ použitého rozpouštědla při extrakčním procesu, objem použitého inokula, kultivační médium. Antimikrobiální účinnost silic je také závislá na mnoha faktorech, jako je chemická struktura jejich složek a jejich koncentrace. Ale i další faktory jsou důležité k udržení antimikrobiální účinnosti v potravinách, například interakce se složkami potravin či metoda jejich aplikace [1, 27].

Rostlinné silice mají široké spektrum antimikrobiální účinnosti. Tyto sloučeniny mohou být letální pro mikrobiální buňky nebo mohou inhibovat produkci jejich sekundárních metabolitů, jako jsou například mykotoxiny. Více účinné jsou rostlinné silice proti grampozitivním bakteriím než gramnegativním, ale bylo zjištěno, že některé rostliny, jako oregano nebo tymián působí jak proti grampozitivním, tak i gramnegativním bakteriím. Hlavními složkami silic s antimikrobiálním účinkem v bylinách byly zjištěny fenolické sloučeniny, terpeny, alifatické alkoholy, aldehydy, ketony, kyseliny a isoflavonoidy [27].

Mnoho studií poukazuje na antibakteriální aktivitu silic rostlin z čeledi *Lamiaceae*. Mezi hlavní složky silic z rostlin této čeledi, které jsou primárně zodpovědné za baktericidní či bakteriostatické vlastnosti lze uvést eugenol, karvakrol a thymol. Slabé antibakteriální účinky proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím vykazují peprmintový olej a mentol. U peprmintového oleje bylo rovněž zjištěno, že má antivirovou i fungicidní aktivitu [1, 4].

## 1.6 Uchování máty

Čerstvé léčivé rostliny jsou sezónní produkty, které mají krátkou dobu trvanlivosti, proto se využívají různé způsoby jejich možného uchování. Skladování těchto rostlin by se mělo provádět v hermeticky uzavřených skleněných tmavých nádobách. Lze je skladovat i v plechových krabicích, ale je nutné byliny občas provětrat. Byliny by měly být skladovány v suchu, tmě a v chladu, přičemž různé druhy by měly být skladovány odděleně [3, 28].

Delší skladování je většinou možné jen pokud rostlinný materiál projde vhodnou úpravou, nejčastěji sušením nebo zamrazením. Mátu lze konzervovat oběma způsoby, přičemž rostliny by měly být zpracovány co nejdříve po sběru [18, 29].

### 1.6.1 Sušení

Sušení je jedním z nejefektivnějších způsobů uchování léčivých rostlin, jelikož vlhkost vzduchu je hlavní příčinou jejich kontaminace. Do nedávné doby byly byliny sušeny při vyšších teplotách. Avšak některé z aktivních látek mohou být citlivé na působení vyšší teploty a nejsou tak sušením zachovány. Sušícím procesem u bylin nedochází pouze ke snižování vlhkosti, ale také ke snižování obsahu těkavých látek. Například za změny v koncentraci těkavých složek máty během sušení můžou právě podmínky sušení, jako je teplota a rychlost proudění vzduchu, dále obsah vlhkosti, druh a stáří rostliny, klima, půdní a sklizňové podmínky. Podmínky sušení mohou mít vliv na kvalitu a kvantitu obsahu silic máty, na chemickou a biologickou aktivitu bylin [25, 30].

Neadekvátním sušením může dojít k mikrobiologické kontaminaci, ztrátě aktivních látek nebo může dojít k nechtěným změnám, což ve výsledku vede ke snižování kvality. Různé

způsoby sušení byly vyvinuty na základě struktury bylinného materiálu a chemické struktury aktivních léčivých látek [25].

Při sušení je nutné dávat pozor, aby droga rostliny nebyla znehodnocena. Využívat by se mělo umělé teplo a dostatečné proudění vzduchu. Optimální teplota při sušení léčivých rostlin se pohybuje v rozmezí 30 – 45 °C. Pokud při sušení rostlina zhnědne nebo zčerná, došlo k jejímu znehodnocení a nesmí být dále použita [28].

Sušení rostlinného materiálu může být provedeno několika způsoby, včetně sušení horkým vzduchem a sušení pomocí vymrazování neboli lyofilizací [30].

Sušení horkým vzduchem je tradiční metodou sušení rostlin. Během horkovzdušného sušení však dochází u některých těkavých složek k odpařování, zatímco se jiné mohou generovat či degradovat. Pro sušení bylin je vhodné přirozené teplo, a to teplé a stinné místo, s dostatečným přístupem čerstvého vzduchu. Buď je možné rostliny sušit pověšené ve svazcích po zhruba deseti rostlinách, kdy horní část rostliny směřuje dolů, nebo se nařezané listy, výhonky a kořeny mohou rozložit na gázu nebo papír, které je vhodné umístit na drátěný rošt, aby docházelo k proudění vzduchu i ze spodu. Celková doba sušení je závislá na velikosti částí rostlin a obsahu vody dané rostliny. Pokud jsou rostliny nařezány na větší části, je vhodné je opakovaně otáčet. Během sušení je také nutné kontrolovat rostliny, zda nedochází k plesnivění. Pokud ano, je nutné plesnivé rostliny odstranit [29, 30].

Rostliny je možné rovněž sušit v troubě při teplotě do cca 50 °C, případně je možnost sušit rostliny i v mikrovlnné troubě. Každopádně při takovém postupu nemusí být úplně zachovány jejich pozitivní vlastnosti a aroma [29].

Usušené rostliny je vhodné uchovávat ve skleněných nebo porcelánových nádobách [29].

Sušení vymrazováním je metoda dehydratace materiálu sublimací pod vakuem. Tento proces je známý pro jeho schopnost udržet kvalitu potravin během sušení nízkou teplotou s minimální ztrátou příchuti, aroma a cenných látek. Nicméně je tato metoda sušení cenově nákladná, a to kvůli intenzivnímu využití energie, dlouhé době sušení a vysokým investičním nákladům [30].

### 1.6.2 Zamrazování

Byliny je možné rovněž zamrazit. Při tomto způsobu uchování zůstává jejich aroma a účinné látky zpravidla dobře zachovány. Zamrazením vzniknou nepříznivé podmínky pro

činnost enzymů. Je nutné, aby rostliny byly rychle sklizeny, očištěny a zamraženy. Po vyjmutí z mrazírny je potřeba je co nejdříve zpracovat, jinak podléhají rychlým změnám [29, 31].

Z většiny bylin se zamrazují listy a vršky výhonků, a to v malém množství, vhodném pro jednorázovou spotřebu. Nadrobno nakrájené rostliny je vhodné zamrazit v miskách nebo dózách. Je možné je zamrazit ve formičkách na led, kde nasekané byliny jsou zality vodou a zamraženy. Takto připravené kostky bylin mohou být využity do vařených jídel, do polévek, kam se vhazují ještě zmrzlé [32].

### 1.6.3 Výluhy, odvary

Z bylin se mohou připravovat výluhy za tepla (nálevy) či za studena (maceráty) nebo odvary (dekokty). Příprava výluhu za tepla se řadí k nejjednodušším metodám zpracování listů a květů. Rostlinné části jsou přelity vařící vodou a ponechány 5 – 10 minut přikryté. Po vyluhování jsou scezeny a nálev je možno pít nebo přikládat ve formě obkladů na zraněná či bolestivá místa. [29].

Vysokými teplotami však mohou být zničeny některé účinné látky těchto rostlin, proto je vhodné v některých případech připravovat výluhy za studena. Macerát je připravován tak, že zhruba dvě lžíce dané byliny či směsi bylin jsou zality přibližně půl litrem studené vody a jsou ponechány k vyluhování přes noc. Následně jsou scezeny a mohou být použity stejně jako nálev či odvar [29].

Odvar je většinou připravován z tvrdé kůry či kořenů. Jelikož pro získání účinných látek z těchto částí bylin je potřeba více času, tak jsou tyto části rostlin nějakou dobu mírně vařeny. Posléze jsou ponechány několik minut k vyluhování a následně jsou scezeny. Je vhodné použít nálevy a odvary ještě týž den, kdy byly připravovány, případně je možné je uchovat v chladničce po dobu 24 hodin [29, 33].

### 1.6.4 Tinkтуры, vína, likéry

Také je možné z bylin připravovat tinktury. Jedná se o výluhy účinných látek z rostlinného materiálu pomocí vysokoprocenního alkoholu. Byliny jsou ponechány v alkoholu po dobu 2 týdnů a po scezení je možné je uchovávat po dobu zhruba dvou let. Účinek tinktur je

většinou silnější nebo zcela jiný oproti účinkům, které mají nálevy či odvary, které obsahují jen látky rozpustné ve vodě. Z bylin může být také připravováno víno a likér. Od tinktur se liší délkou doby vyluhování. V rámci přípravy bylinného vína je hrst čerstvých bylin zalita suchým vínem. Vyluhování probíhá zhruba týden a následně je provedeno scezení rostlinných zbytků. K přípravě bylinného likéru je místo vína použit vysokoprocentní alkohol, přičemž byliny se v něm ponechají k vyluhování po dobu několika týdnů. Následně jsou přeceděny. Délka louhování a množství bylin je individuální dle požadované chuti [29, 33].

### 1.6.5 Další způsoby konzervace

Byliny lze konzervovat i nakládáním do oleje či octa. Obě z těchto pochutin mají konzervační účinky, které brání napadení mikroorganismy. Při využití této metody dochází po určité době k přechodu aroma a léčivých látek z rostlin do dané tekutiny. Nejprve je nutné rostliny řádně umýt, osušit a vložit do čistých lahví. Následně se byliny zalijí octem či olejem. Rostliny je nutné zalít celé. Z tekutin se doporučuje použít vinný či jiný ovocný ocet nebo rostlinné oleje (například za studena lisovaný olivový olej). Pevně uzavřené lahve se uchovávají na teplém, světlém místě a pravidelně se promíchávají. Po uplynutí dané doby se tekutina zfiltruje a uloží do temna. Ocet je možné zfiltrovat po 2 – 3 týdnech, zatímco olej potřebuje 3 – 6 týdnů, aby došlo k dobrému prosycení [34].

Z bylin lze rovněž připravovat bylinné soli. Ty se mohou připravovat jak z čerstvých, tak ze sušených bylinek. Čerstvé byliny se nakrájí či rozmixují na drobné části, sušené lze nadrtit. Následně jsou prosypány solí a řádně promíchány. Při využití čerstvých bylin je nutné nechat sůl následně uschnout. K delšímu uchovávání bylinné soli je však lepší využít při přípravě sušené byliny [32].

## 2 ANTIOXIDANTY

Antioxidanty jsou řazeny k látkám prodlužujícím údržnost potravin a to tak, že je chrání před oxidací, která se projevuje žluknutím přítomných tuků a jiných snadno se oxidujících složek potravin, jako jsou vonné látky. Oxidací lipidů v potravinách dochází k chemickým změnám, které mají negativní vliv na jejich výživovou, senzoricou (vůně, chuť, barva) a hygienicko-toxikologickou hodnotu [35].

Mnoho onemocnění je způsobeno či negativně ovlivněno volnými radikály. Přírozená obrana lidského organismu proti působení volných radikálů není vždy dostačující, a to zejména kvůli tomu, že lidské tělo je v moderním světě neustále vystavováno působení volných radikálů z externích zdrojů [36].

Všechny důležité makrobiomolekuly (bílkoviny, mastné kyseliny, nukleové kyseliny a sacharidy) mohou být oxidovány volnými radikály. Mezi reaktivní formy kyslíku se řadí superoxidový radikál ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxylový radikál ( $\cdot OH$ ) a peroxylový radikál ( $ROO\cdot$ ) a mohou být spojovány s karcinogenezí, kardiovaskulárními onemocněními, neurodegenerativními poruchami, aterosklerózou, záněty a stárnutím. Pokud se kyslík vyskytuje v přebytku nebo nebyl dostatečně redukován, dochází ke vzniku jeho reaktivních forem. Přírodní antioxidační mechanismy brání působení těchto vysoce toxických reaktivních forem kyslíku. Antioxidanty kromě přímého ukončení reakcí, způsobených reaktivními formami kyslíku, mohou být také použity jako léčebné nebo preventivní přípravky při zdravotních problémech a onemocněních souvisejících se stárnutím [37].

Prísun antioxidantů v potravě hraje důležitou roli v ochraně lidského organismu proti působení volných radikálů. Mnoho klinických a epidemiologických studií poukazuje na spojení mezi antioxidační aktivitou látek přítomných v potravě a prevencí onemocnění jako jsou kardiovaskulární onemocnění či karcinogeneze [36].

Mezi přírodní zdroje antioxidantů se řadí ovoce, zelenina, čaje, vína a některé druhy koření. Pro dostatečný příjem potravinových komodit s antioxidanty jsou prováděny i studie o možných nových zdrojích antioxidantů. Ty by mohly být použity pro přímou spotřebu nebo k výrobě potravinových doplňků, na obohacení potravin s cílem zvýšit jejich výživovou hodnotu. Jedním z takových zdrojů by mohly být léčivé rostliny, které jsou využívány i při léčbě [36].



## 2.1 Klasifikace antioxidantů

Websterův slovník definuje antioxidant jako látku, která inhibuje oxidaci nebo reakce podněcované kyslíkem, peroxidy nebo volnými radikály. Tato definice je jednoduchá, avšak smysl termínu antioxidant se liší podle toho, v jaké oblasti je používán. V lékařství jsou antioxidanty enzymy a jiné organické látky, které jsou schopné působit proti poškození způsobenému oxidací v živočišných tkáních. V průmyslu, zejména v potravinářství, jsou antioxidanty definovány jako přírodní nebo syntetické sloučeniny, které znemožňují nebo brzdí zhoršující účinky kyslíku na produkty, jako jsou tuky a oleje. Nicméně, žádná z těchto definic nepopisuje mechanismus působení těchto sloučenin. Tyto sloučeniny však mohou způsobovat antioxidační efekt různým způsobem. Mohou reagovat s volnými radikály, pak jsou označovány jako antioxidanty primární, nebo redukují vzniklé hydroperoxydy, tyto označujeme za antioxidanty sekundární. Nebo také mohou vázat do komplexů katalyticky působící kovy či eliminovat přítomný kyslík [35, 37, 38].

Mezi primární antioxidanty se řadí veškeré povolené látky, jako je např. kyselina askorbová a erythorbová a jejich deriváty, tokoferoly, galláty, BHA a BHT. Do primárních antioxidantů se rovněž řadí fenolové kyseliny, a to hlavně substituované skořicové kyseliny a jejich estery a glykosidy. Kdy například fenoxylový radikál 4-hydroxysubstituovaných skořicových kyselin je stabilizován rezonancí. Stejně tak se do velmi účinných primárních antioxidantů řadí některé flavonoidní látky například chalkony, jejichž radikály se rovněž stabilizují rezonancí. Mezi sekundární antioxidanty pak patří například methionin, kyselina lipoová, cystein a peptidy, které obsahují cystein a jiné sloučeniny, které se přirozeně vyskytují, avšak se jako antioxidanty nepoužívají [35].

Kromě klasifikace antioxidantů v závislosti na jejich mechanismu, lze antioxidanty také členit podle původu, a to na přírodní a syntetické [35].

Následně jsou popsány antioxidanty, které se vyskytují v mátě.

### 2.1.1 Fenolické sloučeniny

Jedná se o sekundární metabolity rostlin a jsou charakteristické přítomností alespoň jedné hydroxylové skupiny navázané na benzenu. Antioxidační aktivita fenolických sloučenin zahrnuje nejen přímé vychytávání reaktivních forem kyslíku, ale ty sloučeniny, které mají dvě nebo více hydroxylových skupin, jsou schopné vázat ionty přechodných kovů. Chelací (vazbou iontů přechodných kovů) silně klesá schopnost iontů přechodných kovů indukovat

oxidační stres. Polyfenoly rovněž chrání rostlinu proti UV záření a také tvoří základ pro významné zbarvení květin a ovoce (například antokyany). Vysoká koncentrace polyfenolů v nezralém ovoci může také chránit ovoce před napadením hmyzu [39, 40].

Mezi fenolické sloučeniny významné svou antioxidační aktivitou se řadí fenolové kyseliny a jejich deriváty. Fenolové kyseliny se běžně vyskytují ve všech rostlinných materiálech. Antioxidační aktivita fenolových kyselin a jejich derivátů je závislá na počtu hydroxylových skupin v molekule. Mezi aktivnější antioxidanty se obecně řadí kyselina skořicová a její deriváty jako je například kyselina ferulová, kávová a sinapová. Běžnými estery fenolových kyselin jsou depsidy, kdy nejvíce rozšířeným je kyselina chlorogenová, což je přírodní ester kyseliny chinové. Ve významném množství se vyskytuje například v kávě a syrových bramborech. V kávě, jak zelené, tak i pražené, se vyskytuje více než 30 esterů hydroxyskořicových kyselin. [35, 41].

Fenolické sloučeniny se do lidského těla dostávají ze stravy. Tyto sloučeniny procházejí skrz trávicí trakt s různou účinností. Přesný mechanismus vstřebávání je stále analyzován, přičemž výsledky příjmu těchto látek závisí na chemické struktuře a dalších faktorech jako je například složení potravin. Také oligomerizace fenolických sloučenin může mít vliv na vstřebání fenolických sloučenin v těle. Bylo zjištěno, že větší oligomery tělo vstřebává jen ve velmi malém množství. Nicméně kyselým štěpením oligomerů v žaludku dochází ke vzniku dimerů a monomerů, které může tělo vstřebat [39].

### 2.1.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou skupinou polyfenolických sloučenin se známými vlastnostmi jako je vychytávání volných radikálů, inhibice hydrolytických a oxidativních enzymů a protizánětlivé reakce [22].

Jedná se o sloučeniny odvozené z tricyklické struktury (flavan), kdy modifikací vznikají flavanoly (jako epikatechin), flavanony (taxifolin), flavonoly (kvercetin), flavony (apigenin) a antokyanidiny (malvidin) [39].

Tyto látky se řadí k primárním antioxidantům a flavonoly a 5-hydroxysubstituované flavony jsou navíc schopné vázat kovy do neúčinných komplexů. Antioxidační aktivita flavonoidů je ovlivňována počtem a polohou hydroxylových skupin. Z dalších biologických vlastností lze zmínit jejich kladný vliv na pružnost a pevnost cévních stěn a zlepšování

jejich prostupnosti. Dále je prokázán i regenerační účinek na jaterní tkáň, účinky antisklerotické, močopudné a uroseptické [28, 35].

### 2.1.3 Vitamin C

Vitamin C (L-askorbová a L-dehydroaskorbová kyselina) je řazen do skupiny vitaminů, které jsou rozpustné ve vodě. Vyskytuje se hlavně v potravinách rostlinného původu. V rámci rostlinných zdrojů je nejvýznamnějším zdrojem čerstvé ovoce a zelenina. Z 90 – 95 % se nachází ve formě kyseliny askorbové, zbytek je tvořen kyselinou dehydroaskorbovou [42].

Jako antioxidant je schopný detoxikovat reaktivní produkty metabolismu kyslíku (jako je superoxidový radikál a singletový kyslík). Dále je schopný reagovat s oxidovanými formami vitaminu E, čímž zabezpečuje jeho ochranu a také chrání před oxidací i lipidy membrán. Rovněž chrání i labilní formy kyseliny listové a působí proti tvorbě nitrosaminů, čímž funguje jako modulátor mutagenese a karcinogeneze [41, 42].

## 2.2 Mechanismus působení antioxidantů

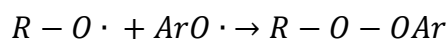
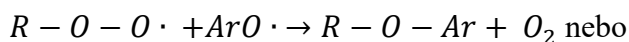
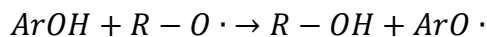
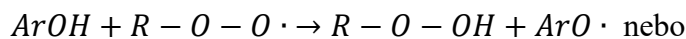
Účinek antioxidantů závisí na faktorech jako je typ oxidačního katalyzátoru, fyzického stavu lipidů a faktorů, které ovlivňují aktivitu samotných antioxidantů (například pH, teplota, schopnost interakce s jinými sloučeninami v potravinách). Také při kombinaci antioxidantů může docházet k synergickým interakcím, čímž dochází k maximalizaci ochrany a umožnění zachování antioxidantů [40].

Antioxidanty reagují tak, že darují vodíkový atom lipidovým radikálům. Radikály získané z antioxidantů s molekulovou strukturou, jakou mají například fenoly, jsou stabilními druhy radikálů, a tak zastavují oxidační řetězovou reakci [22].

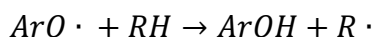
### 2.2.1 Mechanismus působení fenolových sloučenin

Fenolové sloučeniny (ArOH) jako primární antioxidanty mohou ovlivňovat oxidaci lipidů (R-H) v rámci kompetitivní reakce ve fázi propagace autooxidační reakce a to tak, že poskytují atom vodíku hydroperoxylovým (ROO·) nebo alkoxylovým radikálům (RO·), které

vznikly oxidací lipidů. Touto reakcí dojde k přerušení řetězové radikálové reakce. Produkty této reakce jsou fenoxylvé radikály antioxidantu ( $ArO\cdot$ ), které dále reagují v terminaci s volnými hydroperoxylovými nebo alkoxylovými radikály [35]:



Při vysoké koncentraci antioxidantu však může docházet k tomu, že fenoxylvé radikály vstupují do řetězové radikálové reakce nebo iniciují štěpení dalších molekul lipidů, pak tento antioxidant působí jako prooxidant [35]:

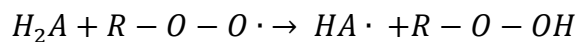


To, že je fenoxylvý radikál relativně stabilní, málo reaktivní a obtížně atakovatelný vzdušným kyslíkem, souvisí s delokalizací nepárového elektronu v aromatickém systému [35].

Fenol sám o sobě je jako antioxidant neúčinný. Pokud však dojde k substituci alkylovými skupinami v *ortho* nebo *para* poloze, zvýší se konjugáčním efektem hustota elektronů na OH skupině, což zapříčiní zvýšení schopnosti fenolu reagovat s volnými radikály. Pokud se v poloze *ortho* nachází objemný substituent, zvýší to stabilitu vzniklého fenoxylvého radikálu (například se jedná o BHA a BHT). Pokud je v poloze *ortho* nebo *para* přítomná další hydroxylová skupina, dochází pak rovněž ke zvýšení antioxidační aktivity fenolu (například TBHQ) [35].

### 2.2.2 Mechanismus působení kyseliny askorbové

S volnými radikály reaguje kyselina askorbová a její isomery, deriváty. Působí tak jako antioxidanty, jelikož brzdí řetězovou autooxidační reakci. Kyselina askorbová ( $H_2A$ ) reaguje s peroxylovým radikálem mastné kyseliny ( $R-O-O\cdot$ ) případně s alkoxylovým radikálem ( $R-O\cdot$ ) a vzniká askorbylradikál ( $HA\cdot$ ) a hydroperoxid mastné kyseliny ( $R-O-OH$ ). Askorbylradikál nevyvolá další řetězovou reakci a disproportionuje na kyselinu askorbovou a dehydroaskorbovou [42]:



Účinnějším antioxidantem se kyselina askorbová stává tehdy, pokud je použita v kombinaci s tokoferoly. Pak dochází nejprve k reakci tokoferolů s volnými radikály lipidů za vzniku radikálů tokoferolů, které jsou však kyselinou askorbovou redukovány zpět na tokoferoly. Následně z askorbylpalmitátu dochází ke vzniku radikálu dehydroaskorbylpalmitátu, který však není schopen tvořit cyklický hydrát jako je tomu u dehydroaskorbové kyseliny [42].

Podobně dochází k reakci kyseliny askorbové také s toxickými formami kyslíku jako je například hydroxylový radikál ( $HO\cdot$ ), anion superoxidového radikálu ( $O_2\cdot^-$ ) nebo singletový kyslík ( $^1O_2$ ) [42].

### 3 METODY STANOVENÍ PŘÍRODNÍCH ANTIOXIDANTŮ

V rostlinných materiálech závisí celková antioxidační aktivita nejen na obsahu a složení fenolických sloučenin, ale také na obsahu dalších antioxidantů, jako je například kyselina askorbová. Navíc může mezi antioxidanty přítomnými v daném materiálu docházet k synergickým či antagonistickým efektům a z tohoto důvodu je odhad antioxidační aktivity v reálných materiálech obtížný a celkový antioxidační účinek musí být stanoven experimentálně [43].

#### 3.1 Stanovení antioxidační aktivity

Přírodní antioxidanty jsou většinou do lidského organismu přijímány jako součásti směsí, kde jejich složky mohou reagovat s různými radikály různým způsobem, i synergicky nebo inhibičně. Z tohoto důvodu je snaha charakterizovat antioxidační účinnost směsi jako celku, tedy celkovou antioxidační aktivitu. Jde o parametr, který udává schopnost vzorku eliminovat radikály [44].

Vzhledem k tomu, že mnoho látek přítomných v rostlinném materiálu podléhá metabolickým změnám v trávicím traktu a jejich účinek je v organismu ovlivněn různou mírou resorpce, je možné, že zjištěná antioxidační aktivita *in vitro* nemusí mít významný účinek *in vivo* [44].

Nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy, proto existuje řada metod, které jsou používány ke stanovení antioxidační aktivity. Tyto metody lze rozdělit na chemické a fyzikální [44, 45].

Z chemických metod se nejvíce využívají metody založené na vychytávání volných radikálů, pod které spadají metody, které hodnotí vychytávání syntetických radikálů (DPPH, ABTS<sup>•+</sup>, galvinoxyl), dále metody, které hodnotí eliminaci kyslíkových radikálů (ORAC, metoda vychytávání OH-radikálů a vychytávání superoxidového anion-radikálu) a metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace [44].

U fyzikálních metod stanovení není bezprostředně sledována chemická reakce nebo změna obsahu jednotlivých látek, ale změna fyzikálních vlastností, které tyto procesy doprovázejí.

Je využívána spinová rezonance, chemiluminiscence či stanovení redoxního potenciálu [45].

### 3.1.1 Metoda využívající ABTS

Tato metoda se používá ke stanovení celkové antioxidační aktivity, kdy je testována schopnost vzorku zhaset kation-radikál  $ABTS^{\cdot+}$  (2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Vzhledem k tomu, že je výsledná antiradikálová aktivita vzorku srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboxylová kyselina), je tato metoda někdy označována za metodu TEAC neboli Trolox equivalent antioxidant capacity [44].

Jde o spektrofotometrickou metodu, kdy testovaný vzorek reaguje s kation-radikálem  $ABTS^{\cdot+}$ . V reakční směsi je kation-radikál  $ABTS^{\cdot+}$  generován oxidací ABTS. Využíván je buď systém ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/peroxidáza či ABTS/metmyoglobin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nebo je možné využít i chemickou oxidaci ABTS například peroxodisíranem draselným či oxidem manganičitým. V rámci samotného testování je možné použít dva postupy. Buď je antioxidant přidáván do reakční směsi, která již obsahuje vygenerovaný kation-radikál  $ABTS^{\cdot+}$  nebo je antioxidant v reakční směsi přítomen v době generování kation-radikálu  $ABTS^{\cdot+}$ . Častěji je však využíván způsob, kdy je antioxidant přidán, k již vygenerovanému kation-radikálu  $ABTS^{\cdot+}$  pomocí peroxidázy. Toto stanovení lze provádět i pomocí komerčních setů či pomocí mikrodestiček [44].

### 3.1.2 Metoda používající DPPH

Jedná se rovněž o jednu ze základních metod, kdy je posuzována antiradikálová aktivita čistých látek, ale i různých směsných vzorků. V rámci této metody dochází k reakci testovaného vzorku se stabilním radikálem difenylpikrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky, kdy je radikál DPPH redukován za vzniku difenylpikrylhydrazinu - DPPH-H a dochází k poklesu absorbance při vlnové délce 517 nm. Pokles absorbance je možné sledovat buď po uplynutí konstantní reakční doby, nebo je možné pracovat i v kinetickém režimu. Stanovení antio-

xidační aktivity touto metodou lze provádět i pomocí mikrodestiček. Antiradikálová aktivita je u směsných vzorků vyjadřována v ekvivalentech kyseliny askorbové či v jednotkách standardu Troloxu [44].

## 3.2 Stanovení polyfenolických látek

Metody využívané v rámci analýzy polyfenolických látek lze rozdělit na metody skupinové a metody stanovení jednotlivých polyfenolických látek. U metod skupinových se využívá společných vlastností větších či menších skupin polyfenolických sloučenin. Patří sem například stanovení anthokyanogenů podle Harrise a Ricketse, stanovení tanoidů podle Chapona a stanovení flavonoidů [46].

Široce využívanou metodou pro analýzu celkových fenolických látek je stanovení s Folin-Ciocalteuovým činidlem, které bylo původně vyvinuto pro měření fenolických látek v hroznech a víně, ale dnes je široce používáno i pro jiné rostlinné materiály a potraviny [47].

Do metod stanovení jednotlivých polyfenolických látek se řadí vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) na reverzní fázi s různými možnostmi detekce, například UV-VIS, detektor s diodovým polem – DAD, hmotnostní detektor – MS. Dále lze využít kapilární plynovou chromatografii (CGC), papírovou chromatografii (PC), chromatografii na tenké vrstvě (TLC) [46].

### 3.2.1 Metoda stanovení celkového obsahu polyfenolů za použití Folin-Ciocalteuova činidla

Mezi obvyklé metody stanovení celkového obsahu polyfenolů se řadí stanovení pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Tato metoda je založena na chemické oxidaci redukovaných molekul působením dvou silných anorganických oxidačních činidel, kyseliny fosfowolframové a kyseliny fosfomolybdenové. Produkty této oxidačně-redukční reakce mají modré zbarvení. Nejvyšší absorbanci vykazují tyto produkty při vlnové délce 765 nm. Intenzita absorpce světla při této vlnové délce je úměrná koncentraci fenolů [47, 48].



Protože je při analýze stanovován celkový obsah fenolických sloučenin a tato skupina obsahuje mnoho různých sloučenin, je vhodné tento celkový obsah vztáhnout k jedné sloučenině. Nejčastěji je pro to využívána kyselina gallová z důvodu ceny tohoto standardu a stability. Jako standard mohou být používány i jiné fenolické látky, ale je vhodné používat jeden standard, a to kvůli snazšímu porovnání dat mezi sebou [47].

Vzhledem k tomu, že tvorba barvy při reakci je založena na chemické redukci reakčního činidla, je možné, že tato reakce bude ovlivňována rušivými elementy různých zdrojů. Může to být například oxid siřičitý, kyselina askorbová, glukóza, fruktóza i bílkoviny. Není proto vhodné metodu stanovení celkového obsahu polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla používat u vzorků, které obsahují velké množství bílkovin [47].

### 3.2.2 Stanovení polyfenolických látek metodou HPLC

Tato metoda se v dnešní době řadí k nejvíce používaným ve stanovení polyfenolických látek.

Pro analýzy pomocí HPLC se nejčastěji využívají kolony o délce 10 – 25 cm, o vnitřním průměru zhruba 0,2 – 5 mm. V rámci analýzy fenolických látek je využívána výhradně stacionární fáze C<sub>18</sub> s vnitřním průměrem kolony v rozmezí 2 – 5 mm (pokud je používán hmotnostní detektor, jsou využívány menší průměry). Velikost částic se pohybuje od 3 do 5 μm. Mobilní fáze je složena jak z polární, tak z nepolární části a někdy může obsahovat i roztoky, které mají pufrací kapacitu. Jako organická rozpouštědla jsou využívána metanol, acetonitril, butanol, propanol, etylacetát a jiná, a ve vodné fázi se často vyskytuje i přísádek kyseliny octové. V mobilní fázi mohou být přítomny příměsi organických kyselin, a to kvůli zvýšení retence slabě kyselých látek nebo příměsi slabých zásad kvůli zvýšení retence slabě zásaditých látek. Podle druhu použité stacionární fáze je volena mobilní fáze a její pH. Eluce je většinou prováděna s binárním lineárním gradientem. [46].

### 3.3 Stanovení vitamínu C

Vitamin C je velmi citlivý k oxidačním reakcím. Navíc působením vyššího pH a přítomností železitých a měďnatých iontů je náchylnější k oxidaci, a proto musí být jeho analýza prováděna při nízkém pH a v přítomnosti chelatačních činidel [49].

Mírná oxidace kyseliny askorbové má za následek vznik kyseliny dehydroaskorbové, která je rovněž biologicky aktivní a je schopná přejít zpět v kyselinu askorbovou pomocí redukčních činidel včetně  $\beta$ -merkaptoetanolu, dithiothreitolu apod. [49].

V rámci analýzy kyseliny askorbové existuje mnoho metod, jako jsou například elektrochemické a ampérometrické metody, kapilární elektroforéza nebo přesné stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Mezi časově náročnější metody se řadí spektrofotometrie, enzymová analýza a chemiluminiscenční analýza. Titrační metody patří mezi nejjednodušší techniky pro stanovení kyseliny askorbové. Mezi nejznámější a nejvíce využívané jsou řazeny metody kde se, jako oxidační roztok využívá 2,6-dichlorfenolindofenol, bromid draselný, jodid draselný nebo N-bromsukcinimid. Další jednoduchou metodou ke stanovení kyseliny askorbové je fluorimetrie, která je založena na kondenzační reakci mezi kyselinou askorbovou a o-fenylendiaminem [50].

### 3.3.1 Stanovení vitamínu C pomocí HPLC

Jednou z nejběžnějších metod používaných pro stanovení přesného množství kyseliny askorbové ve vzorcích je využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Tato metoda je selektivní a specifická v mnoha modifikacích s využitím UV/DAD, elektrochemikální nebo fluorescenční detekce. Pro zjištění obsahu vitamínu C v různých vzorcích, je nutné měřit současně jak kyselinu askorbovou, tak i její produkt oxidace kyselinu dehydroaskorbovou [50].

Kyselina askorbová je polární molekula a za použití konvenční reverzní fáze má nízký retenční čas, tudíž je těžce rozlišitelná od jejích epimerů, jako je kyselina isoaskorbová a dehydroaskorbová. Kyselina askorbová silně absorbuje při vlnové délce 245 nebo 265 nm. Kyselina dehydroaskorbová je měřena po derivatizaci s 4,5-dimetyl-o-fenylendiaminem při UV absorbanci v 360 nm [50].

Kyselina askorbová je náchylná k oxidaci ve vodném roztoku, a proto by její stabilita ve vzorcích měla být posílena přidávkem vhodné sloučeniny, jako je například kyselina metafosforečná. Ta poskytuje účinnou extrakci vzorku a kyselina askorbová je tak lépe chráněna před oxidací. Kyselina askorbová je relativně stabilní při nízkém pH, kdy je maximálně stabilní v rozmezí pH 4 – 6. Redukce kyseliny dehydroaskorbové může být provedena redukčními činidly včetně sulfhydrylových sloučenin jako je například dithiotreitol

(DTT), cystein, homocystein, glutathion či merkaptoetanol. Sloučeniny obsahující thiolovou skupinu jsou účinné pouze v mírně kyselém a neutrálním pH [50].

V přítomnosti oxidačních činidel je kyselina askorbová reverzibilně přeměňována na kyselinu dehydroaskorbovou, takže je nutné zabránit degradaci a oxidaci kyseliny askorbové během odběru vzorku, jeho zacházení a analýze, jelikož by mohlo dojít ke zkreslení poměru kyseliny askorbové a dehydroaskorbové. Kvůli nízké absorpci kyseliny askorbové bylo navrhováno provedení redukce kyseliny dehydroaskorbové na kyselinu askorbovou pomocí homocystein dithiotreitolu, nicméně jde o časově náročný krok [50].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo stanovit změny v obsahu celkových polyfenolů a v antioxidační aktivitě v extraktech máty v závislosti na úpravě vzorku, přípravě extraktu a uchování máty.

V teoretické části práce charakterizovat mátu, popsat antioxidanty a uvést popis analytických metod, využívaných ke stanovení antioxidační aktivity, polyfenolů a vybraných polyfenolických látek a vitamínu C.

V praktické části práce stanovit u extraktů máty celkový obsah polyfenolických látek spektrofotometrickou metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem při různé úpravě vzorku, přípravě extraktu a uchování máty. Také určit jejich antioxidační aktivitu pomocí fotometrické metody s využitím DPPH a ABTS. Dále v extraktech máty stanovit vybrané polyfenolické látky a vitamin C metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV-VIS detekcí. Získané výsledky vyhodnotit a porovnat mezi sebou a s odbornou literaturou.

## 5 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

### 5.1 Materiál

Ke zpracování praktické části této práce byly využity vzorky máty, které jsou uvedeny v tab. 1.

*Tab. 1 Testované vzorky*

Číslo vzorku	Charakteristika vzorku	Země původu
1	Máta vonná, domácí pěstitelství	ČR
2	Máta vonná, domácí pěstitelství	ČR
3	Máta peprná, var. "Agnes", domácí pěstitelství	ČR
4	Máta peprná, tržní síť	ČR
5	Máta peprná, tržní síť	Německo
6	Máta peprná, zahradnictví	ČR
7	Máta peprná, odrůda Durinská, zahradnictví	ČR

### 5.2 Přístroje a pomůcky

- spektrofotometr (PerkinElmer, Lambda 25, Velká Británie)
- spektrofotometr (Libra S6 biochrom, Velká Británie)
- analytické váhy Voyager PRO VP214C (Ohaus corporation, Pine Brook USA)
- sušárna (Venticell, BMT, ČR)
- lednice (Liebherr comfort, Rakousko)
- hliníkové misky na sušení
- mikrofiltry (LNY 1345-100, LABICOM, ČR)
- vlhkoměr (HTH 04. Hüttermann, ČR)
- teploměr
- laboratorní třepačka na zkumavky (Chromservis, ČR)
- laboratorní třepačka – baňky (LT2 – Kavalier, ČR)
- laboratorní sklo
- Aparatura pro HPLC-DAD (Dionex Ultimate 3000 System, USA)
  - autosampler Dionex Ultimate 3000 WPS-3000 SL A WPS-3000 RS

- pumpa Dionex Ultimate 3000 SD
- kolona Phenomenex Kinetex C 18 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm)
- kolona Dionex Acclaim C 8 (150 mm x 2,1 mm; 5 µm)
- detektor Dionex Diode Array Detector, DAD-3000 RS
- vyhodnocovací program Chromeleon 7 (verze 7.2.1.5537)

### 5.3 Chemikálie a roztoky

- etanol p.a. (Penta, ČR)
- metanol p.a. (Lachner, s.r.o., ČR)
- acetátový pufr (pH = 5,5) (Lukeš, ČR)
- uhličitan sodný (Lukeš, ČR)
- kyselina octová (Lukeš, ČR)
- octan sodný (Penta, ČR)
- DPPH (Sigma Aldrich, Francie)
- ABTS (Sigma Aldrich, Francie)
- Trolox (Sigma Aldrich, Francie)
- Folin – ciocalteau roztok (Penta, ČR)
- acetonitril (Lachner, s.r.o., ČR)
- kyselina o-fosforečná (Lukeš, ČR)
- standard kyseliny askorbové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kyseliny gallové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kyseliny neochlorogenové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kyseliny 4-hydroxybenzoové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard epigalokatechinu (Sigma Aldrich, Francie)

- standard katechinu (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kyseliny chlorogenové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kyseliny vanilové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kyseliny kávové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kyseliny syringové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard epikatechinu (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kyseliny trans-p-kumarové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kyseliny ferulové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kyseliny sinapové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kyseliny elagové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard rutinu (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kyseliny trans-hydroxyskořicové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard etylesteru kyseliny protokatechové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard resveratrolu (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kyseliny trans-skořicové (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kaempferolu (Sigma Aldrich, Francie)
- standard kvercetin (Sigma Aldrich, Francie)
- demineralizovaná voda



## 6 METODIKA STANOVENÍ

### 6.1 Stanovení vlhkosti a sušiny vzorků

Ke stanovení vlhkosti ve vzorcích máty byla použita gravimetrická metoda, kdy sušení vzorků probíhalo do konstantní hmotnosti, dokud rozdíl mezi dvěma posledními váženími nebyl nižší než 3 mg.

Hliníkové misky s víčkem byly předsušeny v elektrické sušárně a po vychladnutí v exsikátoru byly zváženy na analytických vahách s přesností na 0,0001 g. Lístky máty byly natrhány na přibližně stejně velké části a do každé misky bylo naváženo 1,5 g vzorku s přesností na 0,0001 g. Misky se vzorkem byly sušeny v elektrické sušárně dvoustupňově - při teplotě 50 °C po dobu 3 hodin s následným zvýšením teploty na 105 °C do konstantní hmotnosti. Po sušení byla miska se vzorkem vyjmuta a vložena do exsikátoru. Po vychladnutí byla miska se vzorkem zvážena s přesností na 0,0001 g.

Výsledkem měření byl průměr ze 3 stanovení.

Ze získaných hodnot byl vypočítán obsah vlhkosti [%, w/w] podle vztahu:

$$Sv = \frac{m_3 - m_1}{m_3 - m_2} \cdot 100$$

$m_1$  - hmotnost misky s vysušeným vzorkem [g]

$m_2$  - hmotnost prázdné misky [g]

$m_3$  - hmotnost naváženého vzorku před vysušením [g]

Obsah sušiny [%] byl počítán podle vztahu:

$$Ss = 100 - Sv$$

## 6.2 Příprava extraktů máty

Antioxidační aktivita metodou DPPH, ABTS a obsah polyfenolických látek byly stanovovány v extraktech z čerstvých vzorků máty, v extraktech 3 dny skladovaných vzorků v lednici, v extraktech námi mražených a námi sušených vzorků máty.

U čerstvého vzorku máty bylo naváženo 0,5 g vzorku s přesností na 0,0001 g. Vzorek byl rozetřen v třecí misce a následně extrahován s 25 ml rozpouštědla v Erlenmayerově baňce na třepačce. Jako rozpouštědlo byly použity tyto roztoky: demineralizovaná voda, metanol, etanol, směs vody a metanolu v poměru 50:50 a směs vody a etanolu v poměru 50:50. Při rozpouštědlu demineralizovaná voda byla při extrakci použita i vyšší teplota - 80 °C. Po 15minutovém třepání byl extrakt zfiltrován přes filtrační papír a dle potřeby ředěn a použit k analýze. Z každého vzorku máty byly připraveny dva extrakty.

U vzorků ze skladované máty se postupovalo tak, že do Petriho misky bylo naváženo na analytických vahách s přesností na 0,0001 g 0,5 g vzorku máty, zakryto víčkem Petriho misky a ponecháno 3 dny v lednici při teplotě 6,5 – 8 °C a relativní vlhkosti 62 - 64 %. Třetí den byly z těchto vzorků připraveny extrakty stejným postupem jako ze vzorků čerstvých. Z každého vzorku máty byly připraveny dva extrakty.

Pro přípravu mražených vzorků bylo do Petriho misky naváženo s přesností na 0,0001 g 0,5 g vzorku máty. Miska se vzorkem byla vložena do mrazáku při teplotě v rozmezí od -15 do -17 °C na dobu 1 měsíce. Po uplynutí této doby byly z těchto vzorků připraveny extrakty. Po rozmrznutí byl vzorek rozetřen v třecí misce. Následně byla provedena extrakce s 25 ml rozpouštědla na třepačce. Jako rozpouštědlo byly použity tyto roztoky: demineralizovaná voda, metanol a etanol. Po 15minutovém třepání byl extrakt zfiltrován a dle potřeby ředěn a použit k analýze. Z každého vzorku máty byly připraveny dva extrakty.

Sušení vzorků máty bylo prováděno při dvou různých teplotách - 25 °C po dobu 24 hodin a 50 °C po dobu 8 hodin. Po uplynutí dané doby sušení byla miska se vzorkem vyjmuta a vložena do exsikátoru. Následně byly usušené vzorky využity k přípravě extraktů, kdy bylo naváženo 0,25 g s přesností na 0,0001 g. Poté byl vzorek extrahován s 15 ml rozpouštědla. Jako rozpouštědlo byly použity tyto roztoky: demineralizovaná voda, metanol a etanol. Při rozpouštědlu demineralizovaná voda byla při extrakci použita i vyšší teplota - 80 °C. Po 15 minutovém třepání byla provedena filtrace vzorku a takto připravený extrakt byl dále ředěn a analyzován. Z každého vzorku máty byly připraveny dva extrakty.

### 6.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

#### 6.3.1 Příprava extraktů máty pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Antioxidační aktivita metodou DPPH byla stanovována v extraktech z čerstvých vzorků máty, v extraktech 3 dny skladovaných vzorků v lednici, v extraktech námi mražených a námi sušených vzorků máty postupem uvedeným v kapitole 6.2.

#### 6.3.2 Stanovení antioxidační aktivity extraktů máty metodou DPPH

Ke stanovení antioxidační aktivity byly použity extrakty máty, které byly dle potřeby ředěny na 50, 25 a 10% koncentraci.

Koncentrace použitého roztoku DPPH byla 0,2 mM. Jako rozpouštědlo pro DPPH byly voleny rozpouštědla jako u extraktů, tedy etanol, voda, metanol či směsi vody a etanolu (50:50) anebo vody a metanolu (50:50). Pro stanovení antioxidační aktivity podle modifikovaného postupu [51] byla do zkumavek pipetována reakční směs, která byla experimentálně ověřena, o složení:

- 1,9 ml roztoku DPPH
- 1 ml acetátového pufru o pH = 5,5
- 0,1 ml vzorku.

Zkumavky byly zazátkovány, promíchány a 1 hodinu ponechány ve tmě při laboratorní teplotě. Během reakce byly zkumavky promíchávány. Po uplynutí reakční doby byla změřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 517 nm proti slepému pokusu. Z extraktu byly připraveny dva vzorky, u kterých byla absorbance měřena třikrát.

Slepý pokus byl připraven obdobně jako reakční směs, kdy místo DPPH byla použita voda, etanol, metanol, směs vody a etanolu (50:50) a směs vody a metanolu (50:50) v závislosti na tom, které extrakty byly měřeny.

Pro stanovení hodnoty inaktivace bylo nutné zjistit absorbanci kontrolního vzorku. Složení kontrolního vzorku bylo: 1 ml acetátového pufru, 1,9 ml DPPH a 0,1 ml rozpouštědla místo vzorku. Z naměřených hodnot absorbance extraktu a kontrolního vzorku byla zjištěna hodnota inaktivace.

Hodnota inaktivace [%] byla vypočtena podle vztahu:

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

K – absorbance kontrolního vzorku při vlnové délce 517 nm

A – absorbance extraktu máty při vlnové délce 517 nm

Antioxidační aktivita byla přepočítána z hodnot inaktivace na standard kyselinu askorbovou a vyjádřena jako ekvivalent kyseliny askorbové v miligramech na gram vzorku.

### 6.3.3 Kalibrační křivka kyseliny askorbové

Pro stanovení kalibrační křivky byl připraven zásobní roztok kyseliny askorbové (KA) o koncentraci 0,2 mg/ml. Z tohoto zásobního roztoku byly ředěním připraveny roztoky KA o koncentracích 0,18; 0,12; 0,08 a 0,03 mg/ml. Příprava reakčních směsí, měření absorbance i výpočet inaktivace [%] byly provedeny stejným postupem, který je uveden v kapitole 6.3.2, kde jednotlivé kalibrační roztoky nahradily extrakt vzorku. Měření absorbance reakční směsi každého roztoku KA bylo provedeno třikrát.

Z vypočtených hodnot inaktivace byla sestrojena kalibrační křivka jako závislost inaktivace na koncentraci kalibračních roztoků KA. Body tohoto grafu byly proloženy přímkou a byla zjištěna rovnice lineární regrese.

## 6.4 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

### 6.4.1 Příprava extraktů máty pro stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Antioxidační aktivita metodou ABTS byla zjišťována v extraktech těchto vzorků máty: čerstvý, 3 dny skladovaný v lednici, námi sušený a námi mražený. Skladování, sušení a mražení probíhalo za stejných podmínek, které jsou popsány v kap. 6.2.

#### 6.4.2 Měření antioxidační aktivity extraktů máty metodou ABTS

Pro zjištění antioxidační aktivity byly použity extrakty máty, které byly dle potřeby ředěny na 50, 25 a 10% koncentraci. Byl použit modifikovaný postup [23] s využitím reakční směsi, která byla složena z:

- roztok ABTS (3,5 mM) a peroxodisíran draselný (60 mM) v poměru 50:1. Takto připravený roztok byl ponechán ve tmě po dobu 16 hodin při pokojové teplotě.

- octanový pufr o pH 4,3, který byl smíchán s roztokem vygenerovaného radikálu kationtu ABTS v poměru 39:1.

Do zkumavky bylo napipetováno 8 ml reakční směsi a 100 µl extraktu máty. Zkumavka byla ponechána ve tmě po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Během reakční doby byla zkumavka opětovně promíchávána. Po uplynutí reakční doby byla změřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 734 nm. Jako slepý pokus byl použit octanový pufr. Z extraktu byly připraveny dva vzorky, u kterých byla absorbance měřena třikrát.

Pro výpočet úbytku absorbance bylo nutné změřit i absorbanci reakční směsi.

Z naměřených hodnot absorbance extraktu a reakční směsi bez vzorku byla vypočítána inaktivace  $I$  [%] podle vztahu:

$$I = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100$$

$A_0$  – absorbance reakční směsi bez vzorku při vlnové délce 734 nm

$A_1$  – absorbance extraktu máty při vlnové délce 734 nm

Antioxidační aktivita byla přepočítána z hodnot inaktivace (úbytků absorbance) na standard troloxu a vyjádřena jako ekvivalent troloxu v miligramech na gram vzorku.

#### 6.4.3 Kalibrační křivka troloxu

Pro sestavení kalibrační křivky byl připraven zásobní roztok troloxu o koncentraci 0,5 g/l. Ředěním zásobního roztoku byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 0,4; 0,3; 0,2; 0,15; 0,1 a 0,05 g/l. Příprava reakčních roztoků, měření jejich absorbancí a výpočet úbytku absorbance byl proveden obdobným postupem jako v kap. 6.4.2.

Na základě vypočtených hodnot úbytku absorbance byla sestavena kalibrační křivka jako závislost úbytku absorbance na koncentraci kalibračních roztoků troloxu. Body tohoto grafu byly proloženy přímkou a byla zjištěna rovnice lineární regrese.

## **6.5 Stanovení celkového obsahu polyfenolů s Folin-Ciocalteuovým činidlem**

### **6.5.1 Příprava extraktů máty pro stanovení celkového obsahu polyfenolů**

Pro stanovení celkového obsahu polyfenolů byly použity vzorky máty čerstvé, 3 dny skladované v lednici, námi sušené a námi mražené. Skladování, sušení a mražení probíhalo stejným postupem a za stejných podmínek, které jsou uvedeny v kap. 6.2. Extrakty máty byly připravovány stejným postupem, který je uveden v kap. 6.2.

### **6.5.2 Měření celkového obsahu polyfenolů extraktů máty**

Po předchozí optimalizaci modifikovaného postupu [52] byla připravena reakční směs, která se skládala z:

- 1 ml 10% Folin-Ciocalteuova činidla
- 0,1 ml extraktu máty.

Extrakty máty byly dle potřeby ředěny na koncentraci 50, 25 a 10 %. Reakční směs byla promíchána a uložena v zazátkovaných zkumavkách do tmy při laboratorní teplotě. Po 5 minutách byl přidán 1 ml 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , směs byla opět promíchána a uložena na 15 minut v temnu. Během reakční doby byla směs promíchávána. Po uplynutí reakční doby byla změřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 750 nm proti slepému pokusu. Slepý pokus byl připraven stejným postupem jako reakční směs, jen místo 0,1 ml extraktu máty byl použit 0,1 ml rozpouštědla. Z extraktu byly připraveny dva vzorky, u kterých byla absorbance měřena třikrát.

Celkový obsah polyfenolů v extraktu máty byl přepočítán na standard kyseliny gallové a vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové v miligramech na gram vzorku.

### 6.5.3 Kalibrační křivka kyseliny gallové

Pro sestrojení kalibrační křivky byl připraven zásobní roztok kyseliny gallové (KG) o koncentraci 0,06 mg/ml. Ředěním zásobního roztoku KG byly připraveny roztoky o koncentraci: 0,05; 0,04; 0,03 a 0,015 mg/ml. Příprava reakčních směsí kalibračních roztoků a měření absorbance bylo provedeno stejným způsobem, který je uveden v kapitole 6.5.2, přičemž kalibrační roztoky nahradily extrakt vzorku.

Absorbance reakční směsi každého roztoku KG byla změřena třikrát. Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka jako závislost absorbance na koncentraci kalibračních roztoků KG. Body grafu byly proloženy přímkou a byla zjištěna rovnice lineární regrese.

## 6.6 Stanovení vybraných polyfenolů metodou HPLC/DAD

### 6.6.1 Příprava extraktů máty pro stanovení vybraných polyfenolů metodou HPLC/DAD

Pro stanovení vybraných polyfenolů metodou HPLC/DAD byly použity vzorky čerstvé máty a extrakty máty byly připravovány postupem, který je uveden v kap. 6.2.

### 6.6.2 Podmínky stanovení vybraných polyfenolů metodou HPLC/DAD

Pro stanovení vybraných polyfenolů v daných vzorcích byla použita metoda HPLC s UV-VIS detekcí.

Separace polyfenolů probíhala na koloně Phenomenex Kinetex C 18 (150 mm x 4,6 mm) o velikosti částic 5  $\mu$ m. Mobilní fáze A byla složena z vody a kyseliny octové (99,8%) v poměru 99:1. Mobilní fáze B byla složena z vody, acetonitrilu a kyseliny octové (99,8%) v poměru 67:32:1. Byla použita gradientová eluce, přesné složení mobilních fází v průběhu analýzy je uvedeno v tab. 2. Teplota kolony byla 30 °C, průtok mobilní fáze - 1 ml/min a objem nástřiku vzorku byl 10  $\mu$ l. Délka analýzy byla 45 minut.

Tab. 2 Složení mobilních fází během gradientové eluce

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0 - 10	90 - 80	10 - 20
10-16	80 - 60	20 - 40
16 - 20	60 - 50	40 - 50
20 - 25	50 - 30	50 - 70
25 - 30	30	70
30 - 40	30 - 90	70 - 10
40 - 45	90	10

Měření probíhalo při vlnových délkách 210, 254, 275 a 375 nm a vyhodnocení pak bylo provedeno, dle experimentálně zjištěných hodnocení, při vlnové délce 275 nm.

Vyhodnocení chromatogramů, bylo provedeno vůči naměřeným standardům.

### 6.6.3 Stanovení kalibračních křivek standardů

Pro stanovení vybraných polyfenolů bylo připraveno 22 kalibrační křivek standardů fenolických látek - kyseliny gallové, kyseliny protokatechové (3,4-dihydroxybenzoové), kyseliny neochlorogenové, kyseliny 4-hydroxybenzoové, epigallokatechinu, katechinu, kyseliny chlorogenové, kyseliny vanilové, kyseliny kávové, kyseliny syringové, epikatechinu, kyseliny trans-p-kumarové, kyseliny ferrulové, kyseliny sinapové, kyseliny elagové, rutinu, kyseliny trans-hydroxyskořicové, etylesteru kyseliny protokatechové, resveratrolu, kyseliny trans-skořicové, kaempferolu a kvercetin.

Byl připraven zásobní roztok každého standardu o koncentraci 100 µg/ml, který byl ředěn mobilní fází A a byly připraveny koncentrace standardu 5; 20; 30 a 50 µg/ml. Roztoky standardů o daných koncentracích byly proměřeny za podmínek daných v kap. 6.6.2. Na základě zjištěných hodnot byla sestavena kalibrační křivka jako závislost plochy píku na koncentraci kalibračních roztoků standardů. Body grafu byly proloženy přímkou a byla zjištěna rovnice lineární regrese.



## 6.7 Stanovení vitamínu C metodou HPLC/DAD

### 6.7.1 Příprava extraktů máty pro stanovení vitamínu C metodou HPLC/DAD

Pro stanovení vitamínu C metodou HPLC/DAD byly použity čerstvé vzorky máty, kdy bylo naváženo 0,5 g vzorku máty s přesností na 0,0001 g. Vzorek byl rozetřen v třecí misce a následně extrahován s 25 ml extrakční směsí v Erlenmayerově baňce na třepačce. Extrakční směs se skládala z metanolu, kyseliny o-fosforečné a vody, v poměru 99:0,5:0,5. Po 10minutovém třepání byl extrakt zfiltrován přes filtr Syringe a dle potřeby ředěn a použit k analýze. Z každého vzorku máty byly připraveny dva extrakty.

### 6.7.2 Podmínky stanovení vitamínu C metodou HPLC/DAD

Pro stanovení vitamínu C byla použita metoda HPLC s UV-VIS detekcí.

Pro separaci byla využita kolona Dionex Acclaim C 8 (150 mm x 2,1 mm) o velikosti částic 5  $\mu\text{m}$ . Při měření byla využita izokratická eluce, kdy složení mobilní fáze bylo tvořeno metanolem, kyselinou o-fosforečnou a vodou, a to v poměru 99:0,5:0,5. Analýza probíhala při teplotě kolony 25 °C, průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min a objem nástřiku vzorku byl 20  $\mu\text{l}$ . Délka analýzy byla 10 minut. Měření probíhalo při vlnové délce 254 nm.

### 6.7.3 Stanovení kalibrační křivky kyseliny askorbové

Pro sestavení kalibrační křivky kyseliny askorbové (KA) byl připraven zásobní roztok KA o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ . Ředěním zásobního roztoku KA mobilní fází byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 20; 40, 60 a 80  $\mu\text{g/ml}$ , které byly včetně zásobního roztoku proměřeny za podmínek uvedených v kap. 6.7.2. Z naměřených hodnot byla sestavena kalibrační křivka závislosti plochy píků na koncentraci. Body grafu byly proloženy přímkou a byla zjištěna rovnice lineární regrese.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 7.1 Stanovení vlhkosti a sušiny

Byla stanovena vlhkost a vypočten obsah sušiny u všech čerstvých vzorků máty podle postupu uvedeného v kap. 6.1. V tab. 3 je uveden průměr ze tří stanovení vlhkosti a sušiny se směrodatnou odchylkou (s).

Tab. 3 Vlhkost a sušina vzorků máty

Vzorek	Vlhkost [%]	Sušina [%]	s [%]
1	83,2	16,8	1,9
2	74,0	26,0	1,3
3	75,9	24,1	1,1
4	88,7	11,3	0,3
5	86,8	13,2	1,0
6	83,5	16,5	0,3
7	81,5	18,5	0,1

Obsah vlhkosti se pohyboval v rozmezí od 74,0 % do 88,7 % s průměrem 81,9 %. Takový rozptyl lze přičíst hlavně podmínkám, ve kterých byly dané vzorky máty pěstovány. Jedná se například o typ půdy, zálivku, povětrnostní podmínky, délku a typ osvětlení (umělé nebo slunce) a další. Tyto podmínky však nebylo možné u vzorků určit.

Nejvyšší obsah sušiny byl zjištěn u vzorků máty 2 a 3. Jedná se o mátu vonnou (2) a mátu pepřnou (3), které pocházely z domácího pěstování, kde byly pěstovány za podobných podmínek. Oproti tomu byl nejnižší obsah sušiny zjištěn u vzorků máty pepřné 4 a 5, které pocházely z tržní sítě.

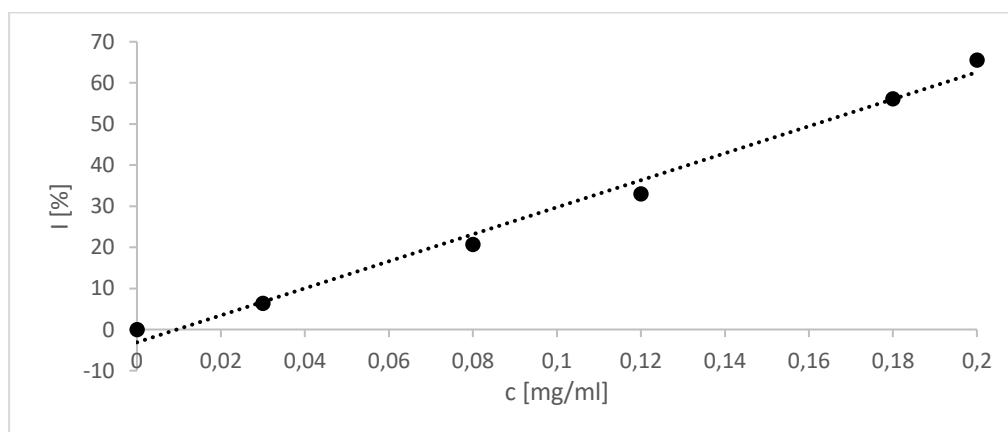
Dyab [53] uvádí průměrný obsah vlhkosti v listech máty 79,4 %, což je obdobné našemu stanovení, avšak jak již bylo uvedeno, obsah vlhkosti/sušiny závisí na druhu rostliny a podmínkách pěstování.

## 7.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Antioxidační aktivita (AA) pomocí metody DPPH byla stanovována u 119 extraktů. Extrakty byly připravovány z čerstvých vzorků máty (35), 3 dny skladovaných vzorků máty v lednici (21), námi mražených (21) a námi sušených vzorků máty (42). Skladování, sušení, mražení a příprava extraktů byla provedena postupem uvedeným v kap. 6.2. Stanovení antioxidační aktivity bylo provedeno postupem, který je popsán v kap. 6.3.2. Antioxidační aktivita všech extraktů byla vypočítána z rovnice lineární regrese grafické závislosti inaktivace na koncentraci kalibračních roztoků kyseliny askorbové (KA) a vyjádřena jako ekvivalent KA v miligramech na gram vzorku.

### 7.2.1 Kalibrační křivka kyseliny askorbové

Stanovení kalibrační křivky KA bylo provedeno postupem uvedeným v kap. 6.3.3 a následně byla z vypočtených hodnot inaktivace sestrojena kalibrační křivka (obr. 5) jako závislost inaktivace na koncentraci kalibračních roztoků KA. Body tohoto grafu byly proloženy přímkou a byla zjištěna rovnice lineární regrese.



Obr. 5 Kalibrační křivka KA pro rozpouštědlo voda

Rovnice regrese zjištěná z kalibrační křivky KA má tvar:

$$y = 328,58 \cdot x - 3,1167$$

y – hodnota inaktivace I [%]

x – hodnota koncentrace KA c [mg/ml]

Hodnota spolehlivosti  $R^2 = 0,9899$ .

Kalibrační křivky byla připravovány pro všechny rozpouštědla, které byly použity při přípravě extraktů. V tab. 4 jsou uvedeny hodnoty všech rovnic regrese a jejich spolehlivost.

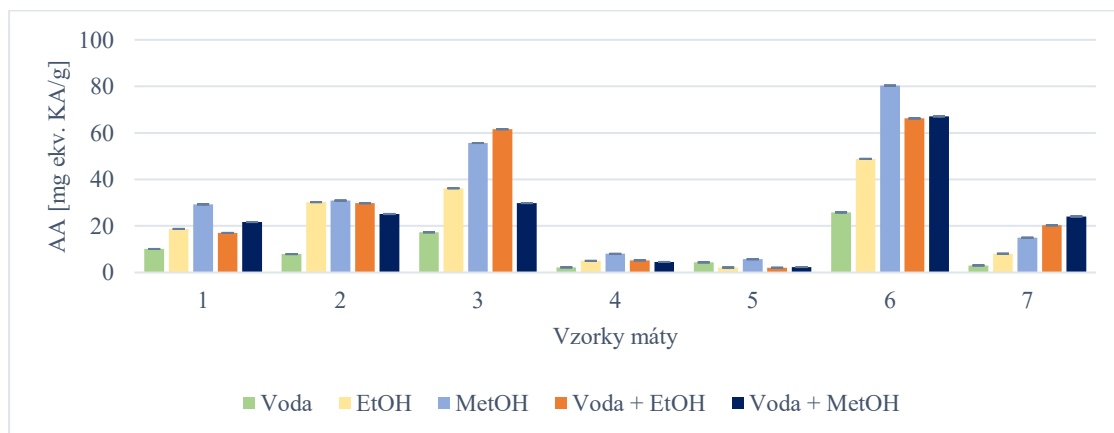
*Tab. 4 Rovnice regrese kalibračních křivek KA pro použitá rozpouštědla*

Rozpouštědlo	Rovnice regrese	$R^2$
Etanol	$y = 318,11 \cdot x + 1,5539$	0,9799
Metanol	$y = 317,08 \cdot x + 1,3021$	0,9805
Voda + Etanol	$y = 336,83 \cdot x - 2,4398$	0,9927
Voda + Metanol	$y = 335,48 \cdot x - 2,7526$	0,9914

y...hodnota inaktivace [%], x...hodnota koncentrace KA [mg/ml],  $R^2$ ...hodnota spolehlivosti

## 7.2.2 Porovnání účinnosti použitých rozpouštědel v rámci metody DPPH u čerstvých vzorků máty

Extrakty z čerstvých vzorků máty byly připravovány pomocí 5 druhů rozpouštědel pro určení, které rozpouštědlo je nejúčinnější podle stanovení obsahu antioxidantů metodou DPPH. Bylo připraveno 35 extraktů z čerstvých vzorků máty pomocí rozpouštědel voda, etanol, metanol, směs vody a etanolu (50:50) a směs vody a metanolu (50:50). Na obr. 6 je uvedeno porovnání použitých rozpouštědel.

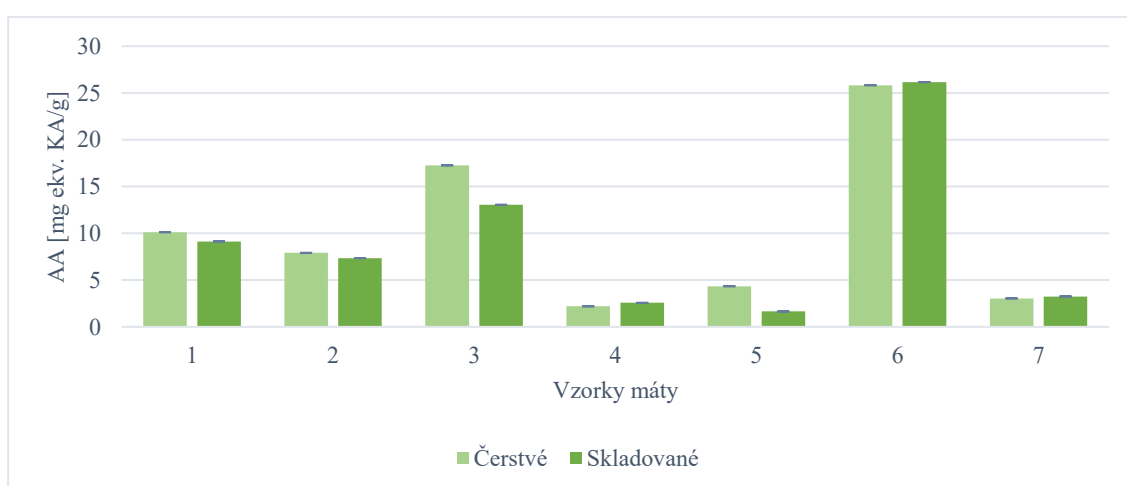


*Obr. 6 Porovnání účinnosti použitých rozpouštědel v rámci metody DPPH*

U pěti ze sedmi analyzovaných vzorků má být nejvíce účinným rozpouštědlem metanol, který byl účinnější oproti jiným rozpouštědlům v rozmezí od 2,2 % do 35,0 % vůči hodnotě druhého nejúčinnějšího rozpouštědla. Výjimku tvoří vzorek máty peprné, který byl získán z domácího pěstitelství. U tohoto vzorku máty bylo jako nejúčinnější extrakční činidlo stanovena směs vody a etanolu (50:50), která byla účinnější o více než 9 % oproti metanolu. U vzorku 7, máty peprné odrůdy durinské, který pocházel ze zahradnictví, se jako nejúčinnější rozpouštědlo pro extrakci antioxidantních látek jevila směs vody a metanolu (50:50). Avšak i u těchto dvou vzorků, bylo zjištěno, že i metanol byl velmi účinným rozpouštědlem pro extrakci antioxidantů. Proto je možné usuzovat, že metanol byl v rámci testovaných rozpouštědel nejúčinnějším.

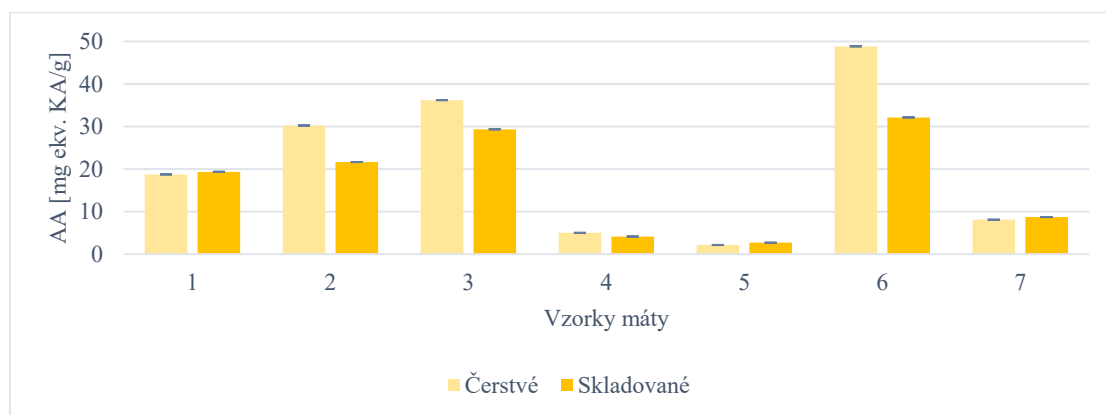
### 7.2.3 Stanovení antioxidační aktivity extraktů ze vzorků čerstvé a 3 dny skladované máty pomocí DPPH

Antioxidační aktivita (AA) metodou DPPH byla stanovována u 21 dvojic extraktů ze vzorků čerstvé a 3 dny skladované máty v chladu. Extrakty byly připravovány pomocí rozpouštědel voda, etanol a metanol. V rámci tohoto stanovení byly porovnávány změny AA mezi extrakty připravovanými z čerstvých vzorků máty a skladovaných vzorků máty. Výsledky tohoto stanovení jsou pro lepší přehlednost uvedeny graficky na obr. 7, 8 a 9.



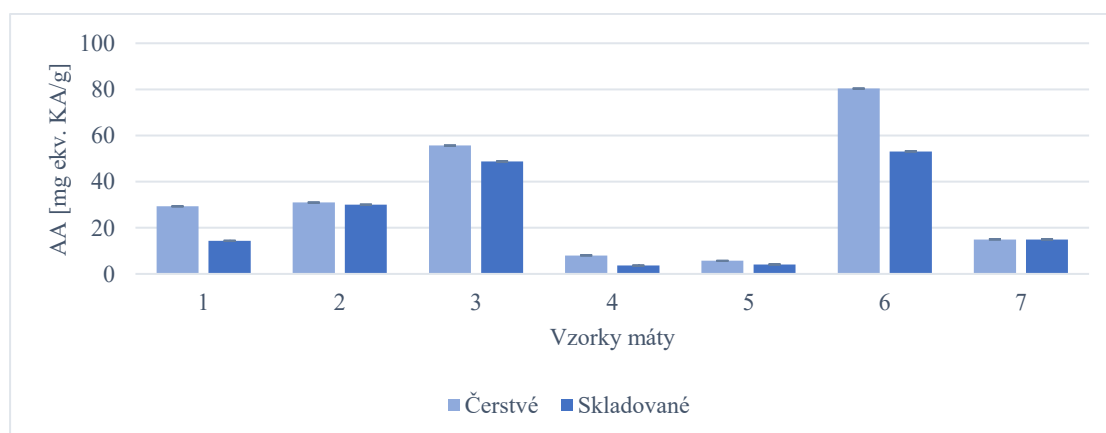
Obr. 7 Výsledky AA stanovované metodou DPPH vodných extraktů z čerstvé a skladované máty

U vodných extraktů se AA pohybovala v rozmezí od 1,64 mg/g do 26,16 mg/g. Nejnižší AA byla stanovena u vzorků máty 4, 5 a 7, kdy vzorky máty peprné 4 a 5 pocházely z tržní sítě a byly původem z ČR a Německa. Vzorek 7, máta peprná odrůda durinská, byl získán ze zahradnictví. Nejvyšší AA byla zjištěna u vzorků máty peprné 3 a 6. Vzorek máty 3 pocházel z domácího pěstitelství. Vzorek máty 6 byl získán ze zahradnictví.



Obr. 8 Výsledky AA stanovované metodou DPPH etanolových extraktů z čerstvé a skladované máty

V rámci etanolových extraktů se AA pohybovala v rozmezí od 2,14 mg/g do 48,85 mg/g, byla tedy vyšší než u vzorků připravených extrakcí s vodou. Stejně jako u vodných extraktů byla i zde zjištěna nejnižší AA u extraktů ze vzorků máty peprné 4 a 5 a nejvyšší AA u extraktů ze vzorků máty peprné 3 a 6.



Obr. 9 Výsledky AA stanovované metodou DPPH metanolových extraktů z čerstvé a skladované máty

AA metanolových extraktů byla stanovena v rozmezí od 3,62 mg/g do 80,35 mg/g, byla tedy vyšší než u vzorků, které byly připravovány pomocí etanolu. Stejně jako v předchozích dvou případech (vodných i etanolových extraktů) byla nejnižší AA zjištěna opět u extraktů ze vzorků máty peprné 4 a 5 a nejvyšší AA opět u extraktů ze vzorků máty peprné 3 a 6.

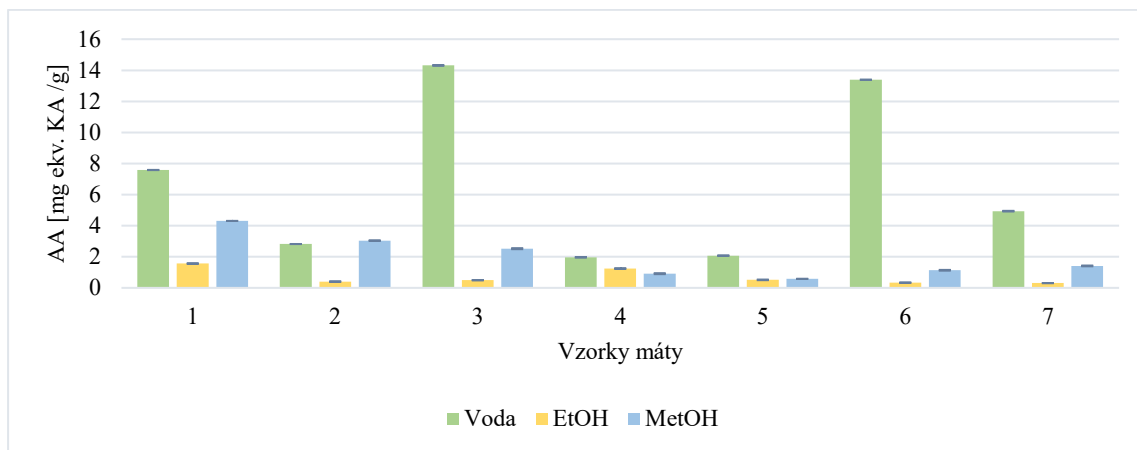
Rozdíl ve zjištěné AA u všech extraktů ze vzorků čerstvé a skladované máty lze přisuzovat hlavně druhu a podmínkám při pěstování daných bylin [1, 54]. Dále má na obsah antioxidantů v extraktech máty vliv také použité rozpouštědlo (viz kap. 7.2.3).

U téměř poloviny (9 dvojic) extraktů bylo zjištěno, že extrakty připravované z čerstvé a skladované máty, měly přibližně stejnou AA. U ostatních (12 dvojic) extraktů bylo stanoveno, že extrakty připravené z čerstvé máty měly vyšší AA než ty připravované ze skladované máty. Avšak ve většině případů nebyla AA extraktů z čerstvé máty vyšší o více než 10 mg/g a z toho lze usuzovat, že skladováním máty v chladu do 3 dnů nedochází k velkému snížení AA.

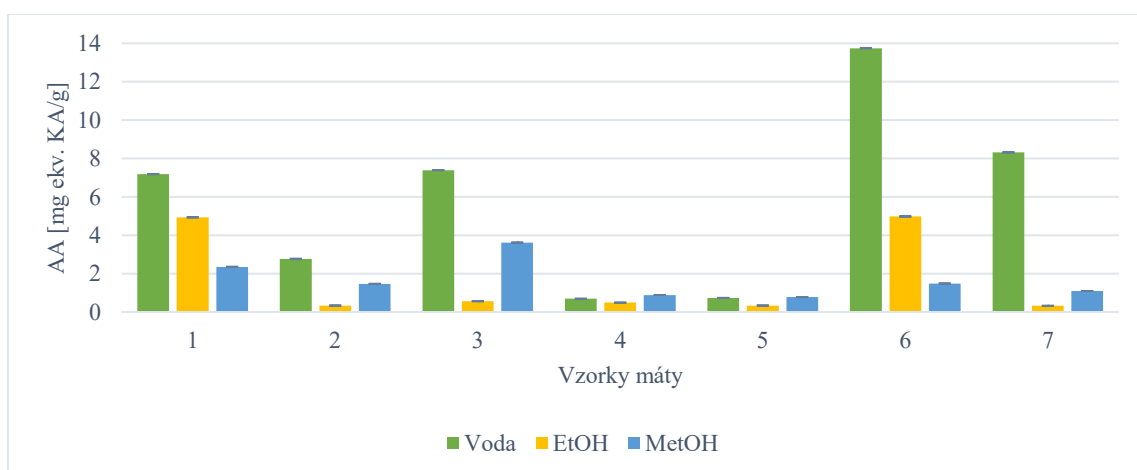
Uribe E. a kol. [20] zjišťovali ve své studii AA metanolových extraktů z čerstvé máty, kterou následně přepočítali na mM ekvivalentu troloxu/g. AA stanovovali pomocí metody DPPH, přičemž zjistili, že AA metanolových extraktů z čerstvých vzorků činila 25,87 mM ekv. troloxu/g vzorku. Vzhledem k tomu, že používali jiný standard, odlišný způsob extrakce s vyšší navázkou, menším objemem extrakčního činidla a delší dobou extrakce než v našem testování, nedají se tyto výsledky přímo porovnat.

#### **7.2.4 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH extraktů ze sušených vzorků máty a porovnání účinnosti použitých rozpouštědel**

Antioxidační aktivita (AA) metodou DPPH byla stanovována i u extraktů ze vzorků máty, které byly sušeny při 25 °C/24 hodin a 50 °C/8 hodin. Bylo připraveno 42 extraktů pomocí rozpouštědel voda, etanol a metanol postupem uvedeným v kap. 6.2. Výsledky stanovení AA pomocí DPPH u extraktů ze sušených vzorků máty jsou uvedeny na obr. 10 a 11.



Obr. 10 Výsledky AA stanovené pomocí DPPH u extraktů ze sušených vzorků máty, při 25 °C/24 hodin



Obr. 11 Výsledky AA stanovené pomocí DPPH u extraktů ze sušených vzorků máty, při 50 °C/8 hodin

V rámci vodných extraktů ze sušených vzorků máty byla AA zjištěna v rozmezí od 0,69 mg/g do 14,31 mg/g. U extraktů ze vzorků máty 4 a 5, které byly sušené při 50 °C/8 hodin, byla zjištěna nejnižší AA. Tyto vzorky máty pepné pocházely z tržní sítě a byly původem z ČR a Německa. Nejvyšší AA byla stanovena u extraktů ze vzorků máty pepné 3 a 6, konkrétně u extraktu máty 3, který byl sušen při 25 °C a u extraktů máty 6, které byly sušeny jak při 25 °C, tak i 50 °C. Vzorek máty 3 byl získán z domácího pěstitelství a vzorek máty 6 pocházel ze zahradnictví.



Etanolvé extrakty ze sušených vzorků máty vykazovaly nižší AA o více než 65 % oproti vodným extraktům ze sušených vzorků máty. AA se u etanolvých extraktů ze vzorků sušené máty pohybovala od 0,31 mg/g do 4,98 mg/g. U extraktů ze vzorků máty 6 a 7, sušených při 25 °C a ze vzorků 2; 5 a 7, sušených při 50 °C byla stanovena AA jen kolem 6,2 – 6,8 % maximální hodnoty AA etanolvých extraktů. U extraktů ze vzorků máty 1 a 6, sušených při 50 °C, byl zjištěn nejvyšší obsah AA.

AA metanolvých extraktů ze sušených vzorků máty byla obdobná jako u etanolvých extraktů ze stejných vzorků máty a pohybovala se v rozmezí od 0,58 mg/g do 4,31 mg/g. Nejnižší AA byla zjištěna u extraktů ze vzorku máty peprné 4 a 5, sušených jak při 25 °C, tak i 50 °C. Nejvyšší AA byla stanovena u extraktů ze vzorku máty vonné 1 a máty peprné 3, které byly sušeny při 25 °C i 50 °C.

Rozptýl výsledků AA tohoto stanovení lze přisuzovat nejen druhu a podmínkám, při kterých byly dané vzorky pěstovány, ale i samotným podmínkám sušení. I přesto, že použité teploty sušení nebyly příliš vysoké, mohlo dojít k degradaci některých složek odpovědných za AA.

V rámci tohoto stanovení byl proto porovnáván vliv podmínek sušení (25 °C/24 hodin a 50 °C/8 hodin) na AA stanovenou pomocí DPPH. Z 21 dvojic extraktů byla u více jak poloviny dvojic extraktů (13) stanovena vyšší AA u extraktů ze vzorků máty sušené při 25 °C/24 hodin než u extraktů, které byly sušeny při vyšší teplotě kratší dobu. U zbylých 8 extraktů ze vzorků sušených při 25 °C byla zjištěná AA srovnatelná nebo nižší než u extraktů připravených ze vzorků sušených při 50 °C. Přičemž tyto extrakty však měly AA vyšší maximálně o 4,65 mg/g, což činí asi 32,5 %. Tyto odchylky mohly být způsobeny například navážením částečně znehodnocených listů máty například seschnutím jejich špiček či jinak poškozených, proto u daných extraktů by bylo ještě vhodné zopakovat toto stanovení.

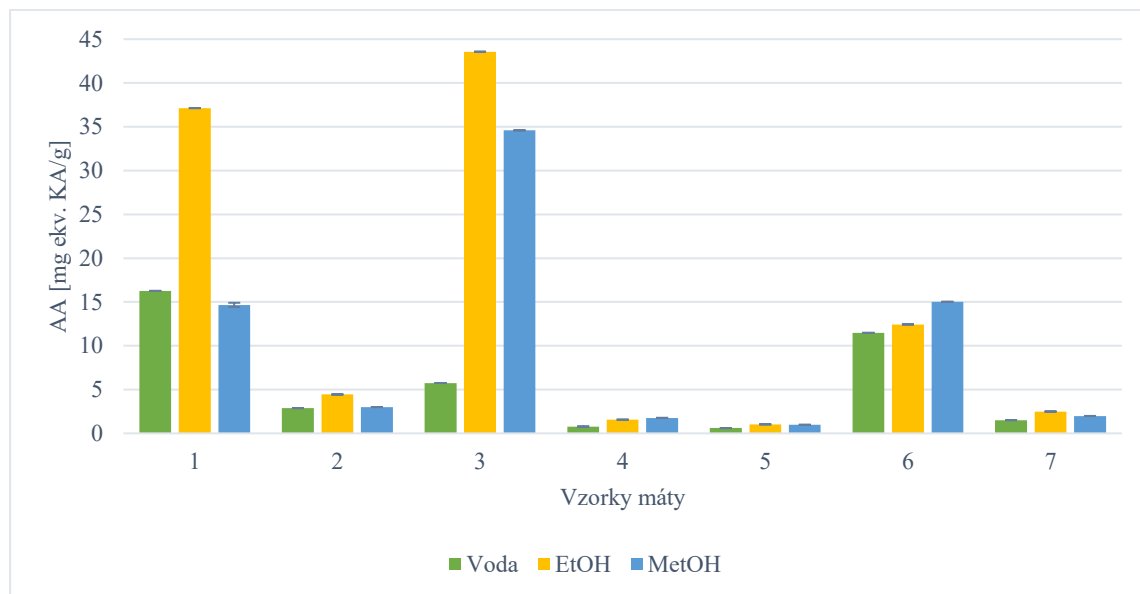
Na obr. 10 jsou uvedeny výsledky stanovení AA pomocí DPPH u extraktů připravovaných ze sušených vzorků máty, které byly sušeny při 25 °C/24 hodin. Zde je možné pozorovat, že alkoholová rozpouštědla nebyla tak účinná pro extrakci antioxidantů ze sušených vzorků máty jako voda. U všech vzorků máty byla stanovena vyšší AA u vodných extraktů s výjimkou vzorku 2, máty vonné z domácího pěstitelství, kde byla zjištěná AA vyšší při použití rozpouštědla metanol a to o 7,2 % oproti vodnému extraktu. Na obr. 11 je možné vidět

výsledky stanovení AA pomocí DPPH u extraktů ze vzorků máty sušených při 50 °C/8 hodin. I u těchto extraktů byla ve většině případů (6) účinnější pro extrakci antioxidantů voda. Pouze u vzorku 4, máty peprné z tržní sítě a původem z ČR, byla stanovená AA vyšší u metanolového extraktu o 0,2 mg/g, což činí 22,5 %. Z výsledků uvedených jak na obr. 10, tak na obr. 11 lze usuzovat, že pro nejvhodnější extrakci antioxidantů ze sušených vzorků máty je nejlepším činidlem z testovaných rozpouštědel voda.

Buřičová a Réblová [36] uvádí AA vodných a etanolových extraktů ze sušených vzorků máty. AA byla zjišťována pomocí metody DPPH a přepočítávána na mg ekvivalentu KA/g vzorku. Stejně jako my, i Buřičová a Réblová [36] zjistily ve své studii, že účinnější pro získání antioxidantů z extraktů ze sušených vzorků je využití horké vody než etanolu při laboratorní teplotě. Konkrétní hodnoty se však mohou lišit. Navíc je nutné brát v potaz, že výsledky stanovení jsou ovlivňovány původem vzorku a podmínkami při sušení a přípravě extraktů.

### **7.2.5 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH u extraktů z mražených vzorků máty a porovnání účinnosti použitých rozpouštědel**

AA byla stanovována i u mražených vzorků máty. Bylo připraveno 21 extraktů pomocí rozpouštědel voda, etanol a metanol, způsobem uvedeným v kap. 6.2. Výsledky stanovení AA extraktů z mražené máty jsou uvedeny na obr. 12, kde lze rovněž vidět srovnání účinnosti 3 použitých druhů rozpouštědel.



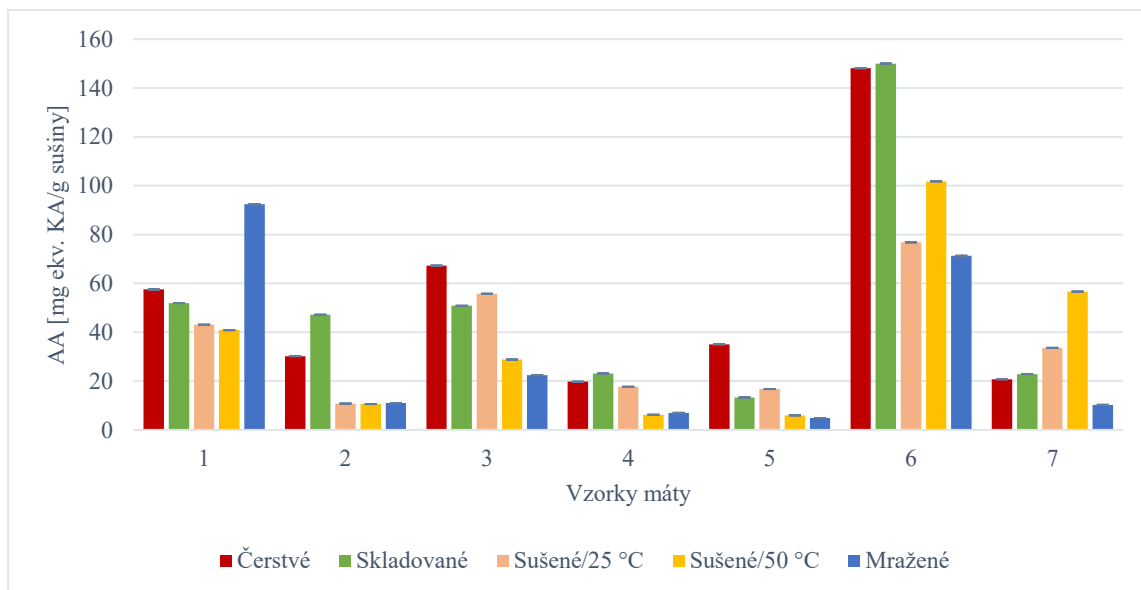
Obr. 12 Výsledky AA pomocí DPPH extraktů z mražených vzorků máty

AA stanovená pomocí DPPH se u extraktů z mražených vzorků pohybovala v rozmezí od 0,60 mg/g do 43,57 mg/g. Nejnižší AA byla zjištěna u vzorků máty 4; 5 a 7, kdy hodnoty AA těchto vzorků máty tvořily 1,4 – 5,7 % maximální hodnoty AA vzorku 3. U vzorků máty 1 a 3 byla stanovena nejvyšší AA.

U extraktů z mražených vzorků bylo provedeno srovnání účinnosti použitých rozpouštědel pro extrakci antioxidantů. Účinnost vody pro extrakci z mražených vzorků máty byla průměrně o 48,8 % nižší než u alkoholových rozpouštědel. U většiny vzorků (5) byl pro extrakci antioxidantních látek účinnější etanol, metanol byl neúčinnější pouze u jednoho vzorku máty pepřné. U vzorku máty pepřné 4, byla AA srovnatelná jak s použitím rozpouštědla etanol, tak i metanol.

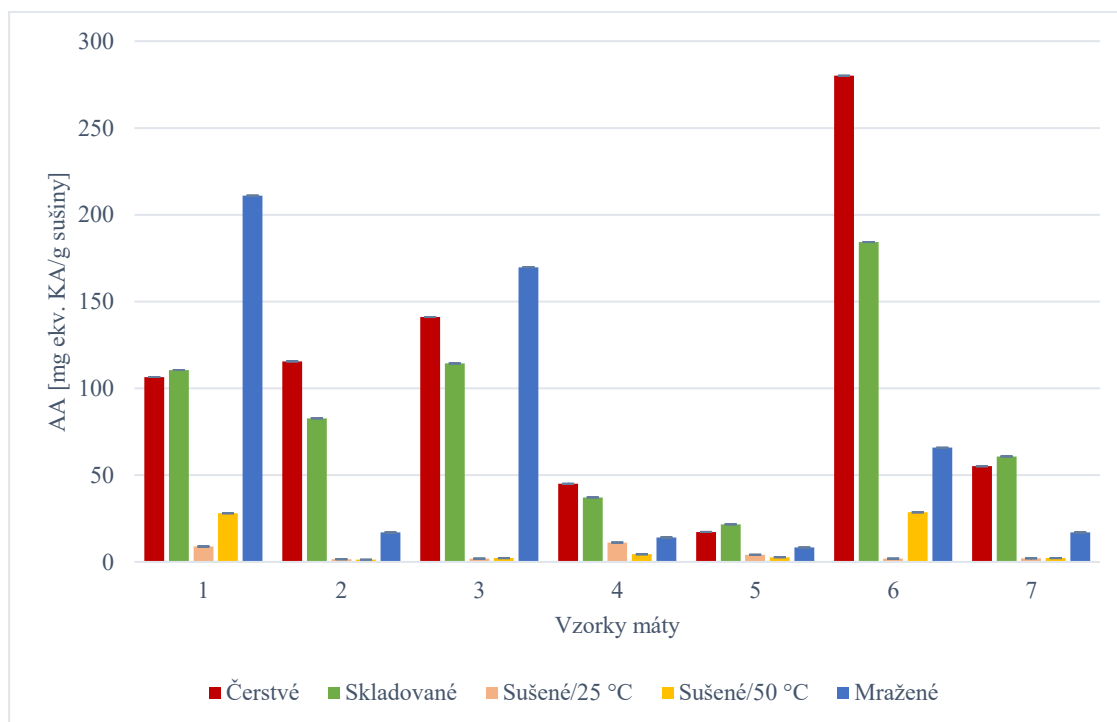
### 7.2.6 Vliv úpravy na antioxidační aktivitu stanovenou pomocí DPPH

U všech extraktů bylo rovněž provedeno i srovnání vlivu úpravy vzorku na antioxidační aktivitu daného extraktu. V rámci tohoto stanovení byly získané výsledky AA stanovené pomocí DPPH pro porovnání přepočítány na mg ekvivalentu KA/g sušiny vzorku.



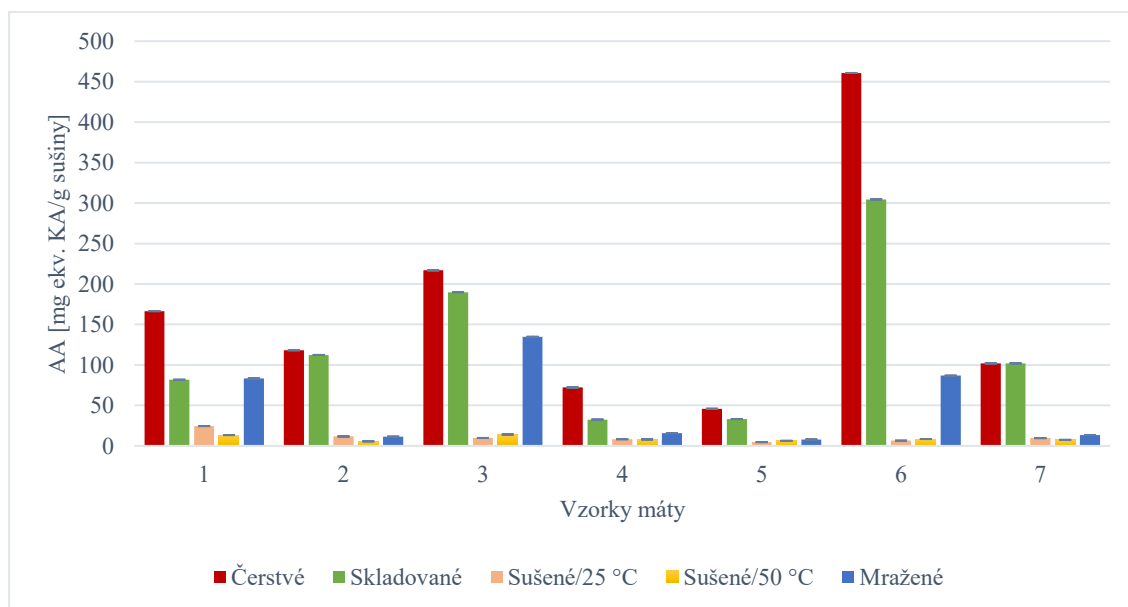
Obr. 13 Vliv úpravy vzorku na AA stanovenou pomocí DPPH u vodných extraktů

Na obr. 13 je možné pozorovat vliv úprav na AA stanovenou metodou DPPH u vodných extraktů. Z testovaných úprav vzorků máty je patrné, že mražení nebylo nejvhodnějším způsobem konzervace, jelikož u většiny vzorků máty (5) bylo průměrně o 60,6 % nižší než sušení. Pouze u dvou vzorků máty bylo mražení lepší úpravou pro uchování antioxidantů oproti sušení. U pěti vzorků byla zjištěná AA nejvyšší v rámci extraktů z čerstvých případně skladovaných vzorků máty. U jednoho vzorku máty bylo vyhodnoceno, že extrakt z mražené máty vykazoval vyšší obsah antioxidantů oproti extraktu z čerstvého vzorku máty a jeden vzorek máty měl vyšší obsah AA u extraktu ze sušeného vzorku máty. Vzhledem k získaným výsledkům lze konstatovat, že na obsah antioxidantů má vliv druh máty a podmínky během pěstování.



Obr. 14 Vliv úpravy vzorku na AA stanovenou pomocí DPPH u etanolových extraktů

Na obr. 14 je možné pozorovat, jaký vliv měly úpravy vzorků na AA etanolových extraktů stanovovanou pomocí DPPH. Oproti vodným extraktům bylo u etanolových extraktů zjištěno, že sušení při obou teplotách vykazovalo velmi nízkou AA oproti mražení, kdy AA těchto extraktů byla o 20,6 – 98,7 % vyšší jak AA extraktů ze sušených vzorků máty. U většiny vzorků (5) však byla nejvyšší AA vyhodnocena u extraktů z čerstvých případně 3 dny skladovaných vzorků máty v chladu. AA v rámci extraktů připravovaných z čerstvých a skladovaných vzorků byla průměrně o 72,9 % vyšší než AA extraktů z mražených vzorků máty. Pouze u dvou vzorků byla AA extraktů z mražených vzorků máty vyšší oproti extraktům z čerstvých a skladovaných vzorků máty. Tyto odchylky lze přisuzovat druhu máty a podmínkám pěstování.



Obr. 15 Vliv úpravy vzorku na AA stanovenou pomocí DPPH u metanolových extraktů

Na obr. 15 je zobrazeno grafické vyhodnocení metanolových extraktů, kdy nejvyšších hodnot AA bylo dosaženo pro vzorky čerstvé máty, a také vzorky skladované máty, jelikož extrakty, které byly připravovány z čerstvých, případně skladovaných vzorků máty vykazovaly u všech analyzovaných vzorků máty nejvyšší AA. Z úprav vzorků bylo mražení nejvhodnějším způsobem konzervace, kde u všech vzorků byla stanovená AA vyšší než u extraktů získaných ze sušených vzorků máty.

Jako nejméně vhodnou úpravou se u metanolových a etanolových extraktů ze vzorků máty tedy jeví sušení ať už při 25 °C či 50 °C. Zatímco u vodných extraktů máty bylo vyhodnoceno sušení lepším druhem konzervace než mražení. Proto lze usuzovat, že kombinace úpravy vzorku před extrakcí a rozpouštědlo použité k extrakci má vliv na množství extrahovaných antioxidantů.

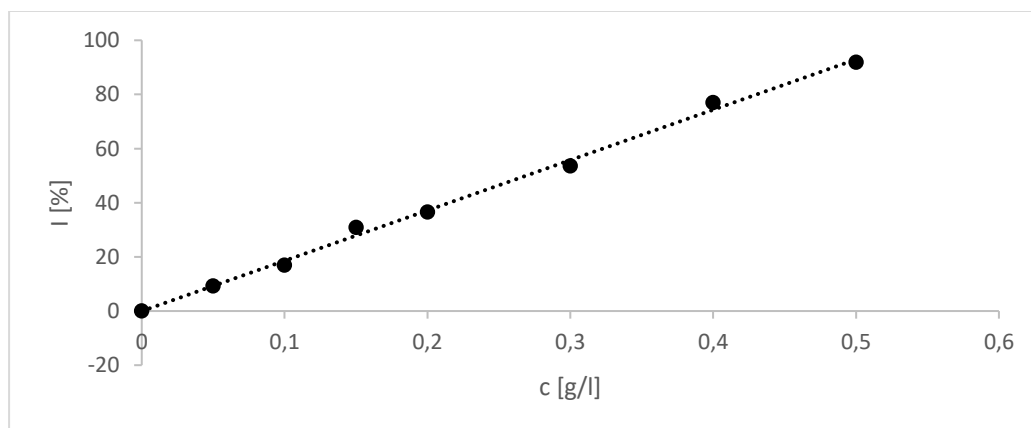
### 7.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Stanovení antioxidační aktivity (AA) metodou ABTS bylo prováděno postupem uvedeným v kap. 6.4.2. AA byla touto metodou stanovována u všech extraktů (119), kdy jednotlivé extrakty byli připravovány ze vzorků máty čerstvé, 3 dny skladované v lednici, námi sušené a námi mražené. Skladování, sušení, mražení a příprava extraktů bylo provedeno po-

stupem, který je popsán v kap. 6.2. AA v extraktu máty byla přepočítána z hodnot inaktivace (úbytků absorbance) na standard troloxu a vyjádřena jako ekvivalent troloxu v miligramech na gram vzorku.

### 7.3.1 Kalibrační křivka troloxu

Sestrojení kalibrační křivky troloxu bylo provedeno dle postupu uvedeného v kap. 6.4.3. Následně byla z vypočtených hodnot úbytku absorbance (I) sestavena kalibrační křivka (obr. 16) jako závislost inaktivace na koncentraci kalibračních roztoků troloxu. Body tohoto grafu byly proloženy přímkou a byla zjištěna rovnice lineární regrese.



Obr. 16 Kalibrační křivka troloxu

Rovnice regrese zjištěná z kalibrační křivky troloxu má tvar:

$$y = 185,92 \cdot x - 0,0277$$

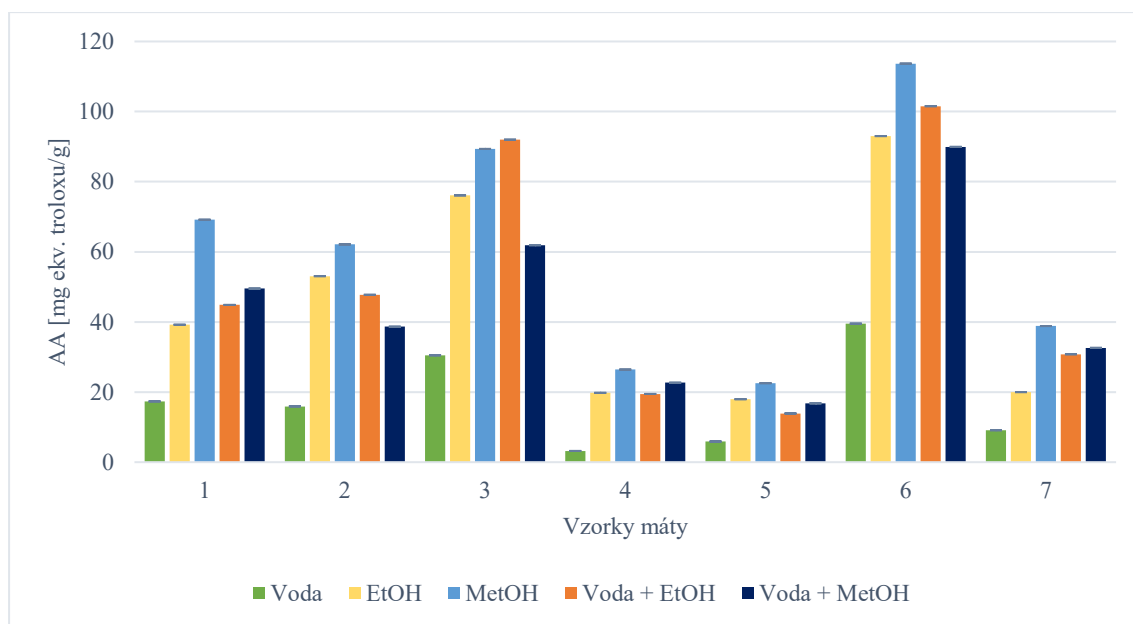
y – hodnota inaktivace I [%]

x – hodnota koncentrace troloxu c [g/l]

Hodnota spolehlivosti  $R^2 = 0,9966$ .

### 7.3.2 Porovnání účinnosti použitých rozpouštědel v rámci metody ABTS u čerstvých vzorků máty

Během stanovení AA metodou ABTS byla rovněž srovnávána i účinnost použitých rozpouštědel (voda, etanol, metanol, směs vody a etanolu (50:50) a směs vody a metanolu (50:50)). Na obr. 17 je možné pozorovat zjištěné výsledky.



Obr. 17 Porovnání účinnosti rozpouštědel v rámci metody ABTS

U všech vzorků byl nejvíce účinným rozpouštědlem pro extrakci antioxidantů stanoven metanol, a to průměrně o 17,4 % více než etanol, případně směs vody s metanolem. S výjimkou vzorku máty peprné 3, kde bylo jako nejlepší rozpouštědlo stanovena směs vody s etanolem (50:50). Vzhledem k tomu, že rozdíl mezi použitím metanolu a směsi vody s etanolem u vzorku máty 3 činil pouze 2,9 % lze usuzovat, že i u tohoto vzorku byl metanol vysoce účinným rozpouštědlem pro extrakci antioxidantů. Proto je možné tvrdit, že pro extrakci antioxidantů byl v rámci testovaných rozpouštědel nejúčinnější metanol.

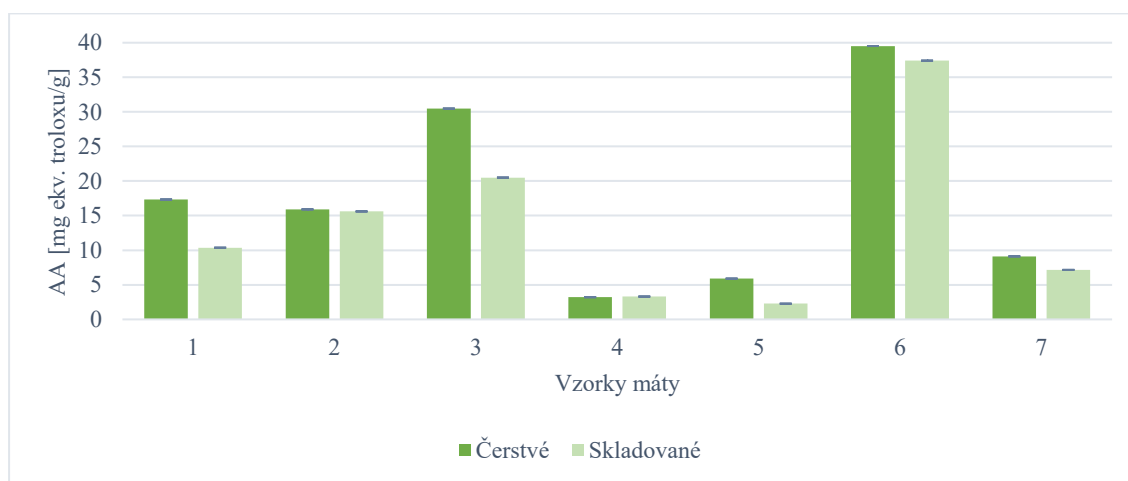
Ve studii Yi a Wetzstein [52] stanovovali hodnoty AA metodou ABTS u extraktů z čerstvých vzorků máty, které byly připravovány pomocí směsi etanol s vodou (80:20) a metanol s vodou (80:20). AA udávali v  $\mu\text{M}$  ekv. Troloxu/g a zjistili, že při použití směsi metanolu s vodou byla stanovena nižší AA než v případě použití směsi etanolu s vodou.



V rámci našeho testování jsme u tří vzorků měli podobné výsledky pro směsi, které byly připravovány v poměru 50:50, i když u čtyř vzorků byla jako účinnější pro extrakci antioxidantů určena směs vody s metanolem (50:50). To může být způsobeno jiným druhem máty a podmínkami při pěstování, i různým složením extrakčního činidla.

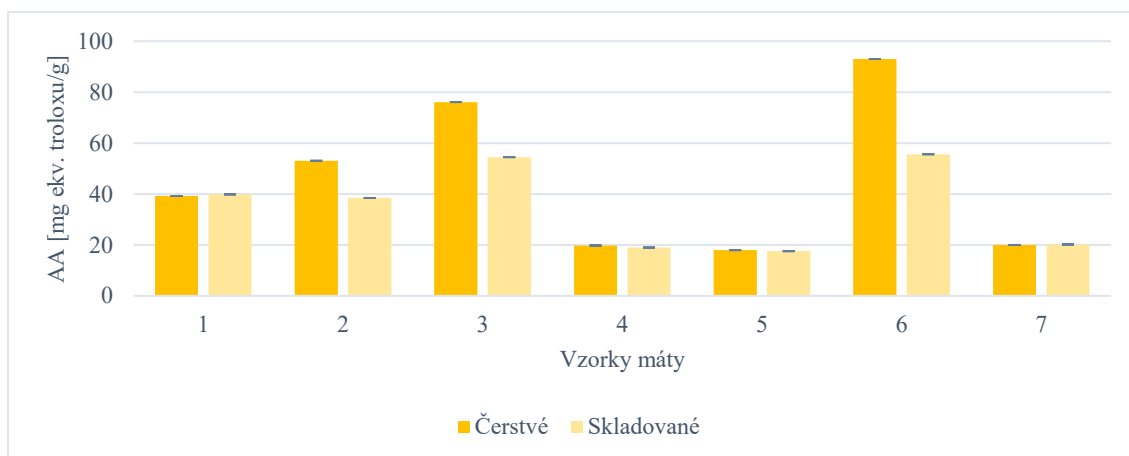
### 7.3.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS extraktů ze vzorků čerstvé a 3 dny skladované máty

V rámci stanovení antioxidační aktivity (AA) metodou ABTS bylo analyzováno 21 dvojic extraktů. Extrakty byly připravovány ze vzorků máty čerstvé a 3 dny skladované v chladu pomocí rozpouštědel voda, etanol a metanol. Postup přípravy extraktů je uveden v kap. 6.2. Výsledky tohoto stanovení jsou uvedeny níže, a to pro každé rozpouštědlo zvlášť (obr. 18, 19 a 20).



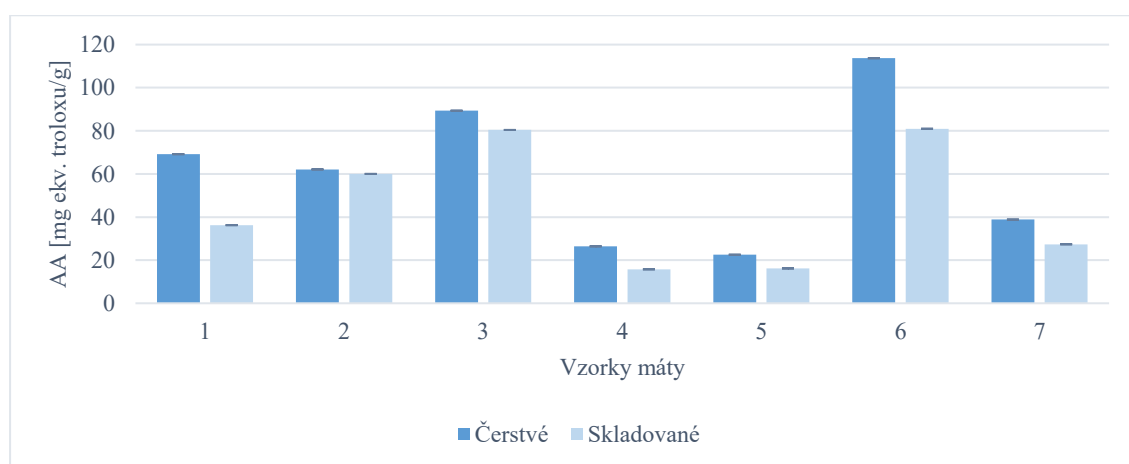
Obr. 18 Výsledky AA stanovené metodou ABTS vodných extraktů z čerstvé a skladované máty

AA vodných extraktů byla stanovena v rozmezí od 2,28 mg/g do 39,52 mg/g. Nejnižší AA měly stejně jako u metody DPPH, extrakty ze vzorků máty pepřné 4, 5 a 7. Nejvyšší AA vykazovaly extrakty připravené ze vzorků máty pepřné 6 a 3, což rovněž odpovídá výsledkům stanovení AA metodou DPPH.



Obr. 19 Výsledky AA stanovované metodou ABTS etanolových extraktů z čerstvé a skladované máty

U etanolových extraktů byla stanovena AA vyšší než u vodných extraktů. Etanolové extrakty vykazovaly AA v rozmezí od 17,55 mg/g do 93,01 mg/g. Na obr. 19 lze vidět, že nejnižší a nejvyšší hodnoty AA vykazovaly stejné vzorky jako u vodných extraktů. Obdobných výsledků bylo dosaženo u etanolových extraktů i v rámci stanovování AA metodou DPPH.



Obr. 20 Výsledky AA stanovované metodou ABTS metanolových extraktů z čerstvé a skladované máty

Stejně jako u stanovení AA metodou DPPH i zde byly hodnoty AA u metanolových extraktů průměrně vyšší o 26,4 % než u etanolových extraktů. AA se tedy u metanolových

extraktů pohybovala v rozmezí od 15,76 mg/g do 113,68 mg/g, kdy stejně jako u AA stanovené metodou DPPH, byla nejnižší AA stanovena u extraktů ze vzorků máty peprné 4 a 5 a nejvyšší AA u extraktů ze vzorků máty peprné 3 a 6.

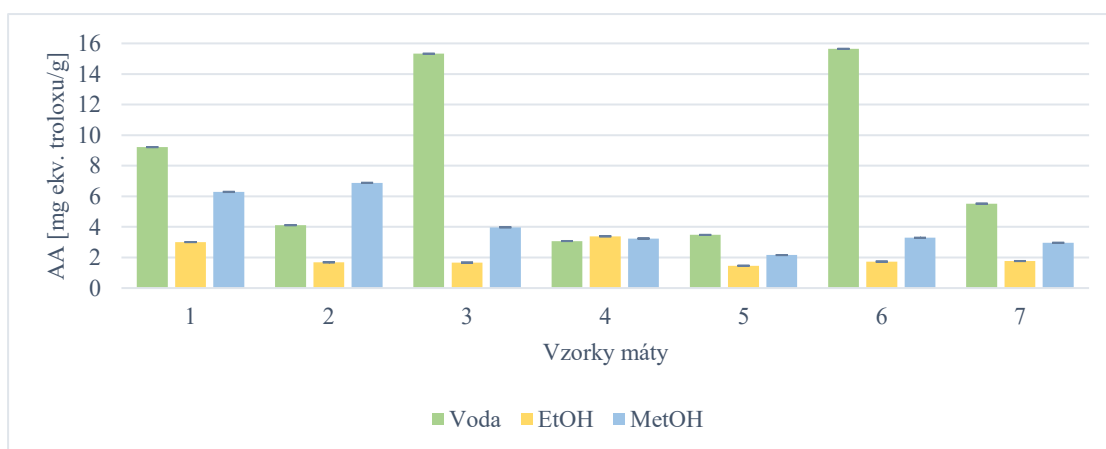
V rámci všech extraktů, vodných, etanolových a metanolových byl zjištěn velký rozsah AA, což mohlo být způsobeno druhem analyzované máty a podmínkami při pěstování [1, 54].

U všech extraktů bylo zjištěno, že skladováním dochází ke snížení AA s výjimkou tří dvojic (čerstvý a skladovaný vzorek máty) extraktů. U těchto dvojic byla stanovená AA u extraktů z čerstvé máty přibližně stejná jako AA u extraktů ze skladovaných vzorků máty.

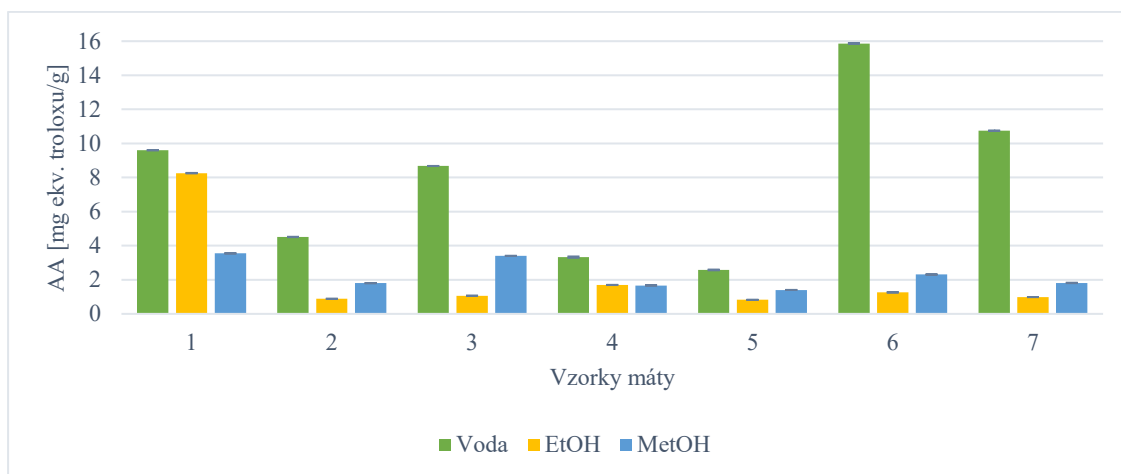
Vzhledem k tomu, že nebyla nalezena studie, kde by bylo provedeno stanovení AA pomocí ABTS u extraktů z čerstvých případně skladovaných vzorků máty, nebylo možné provést srovnání s výsledky jiných autorů.

#### 7.3.4 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS extraktů ze sušených vzorků máty a porovnání účinnosti použitých rozpouštědel

AA metodou ABTS byla stanovována u 42 extraktů ze vzorků, které byly sušeny při 25 °C/24 hodin a 50 °C/8 hodin. Extrakty z těchto vzorků byly připravovány pomocí rozpouštědel voda, etanol a metanol, postupem uvedeným v kap. 6.2. Na obr. 21 a 22 jsou uvedeny získané výsledky tohoto stanovení.



Obr. 21 Výsledky AA stanovené metodou ABTS extraktů ze sušených vzorků máty při 25 °C/24 hodin



Obr. 22 Výsledky AA stanovené metodou ABTS extraktů ze sušených vzorků máty při 50 °C/8 hodin

U vodných extraktů se AA pohybovala v rozmezí od 2,58 mg/g do 15,87 mg/g. Nejnižší AA byla zjištěna opět u vzorků máty pepřné 4 a 5, nejvyšší AA u extraktů ze vzorků máty pepřné 3 a 6. Stejně jako u stanovení AA metodou DPPH byla AA etanolových extraktů ze sušených vzorků máty průměrně o 66,0 % nižší než u vodných extraktů, což jsou podobné výsledky jako u DPPH. U etanolových extraktů byla AA určena v rozmezí od 0,82 mg/g do 8,26 mg/g, kdy nejnižší obsah antioxidantů byl stanoven u vzorků máty vonné 2 a máty pepřné 5. Vzorky máty vonné 1 a máty pepřné 4 vykazovaly nejvyšší AA. V rámci metanolových extraktů ze sušených vzorků máty se AA pohybovala v rozmezí od 1,40 mg/g do 6,88 mg/g. Na obr. 21 a 22 lze pozorovat, že AA metanolových extraktů byla u většiny vzorků (5) vyšší než u etanolových extraktů. Stejně jako u vodných extraktů byla nejnižší AA stanovena u vzorků máty pepřné 4 a 5, kdy hodnoty AA se pohybovaly v rozmezí 20,3 – 26,6 % maximální hodnoty AA pro vzorky máty vonné 1 a 2, u kterých byla zjištěna nejvyšší AA.

Jednotlivé vzorky byly sušeny při dvou různých teplotách a dvou různých dobách (25 °C/24 hodin a 50 °C/8 hodin) a bylo porovnáváno, jaký má tato úprava vliv na obsah antioxidantů v daných extraktech. U většiny dvojic extraktů (15) bylo stanoveno, že extrakty připravované ze vzorků sušených při nižší teplotě delší dobu měly vyšší AA jak extrakty, připravované ze vzorků máty sušených při vyšší teplotě kratší dobu. U čtyř dvojic extraktů bylo zjištěno, že extrakty připravované ze vzorků máty sušené při 25 °C/24 hodin měly přibližně stejný obsah antioxidantů jako extrakty sušené při 50 °C/8 hodin. U dvou

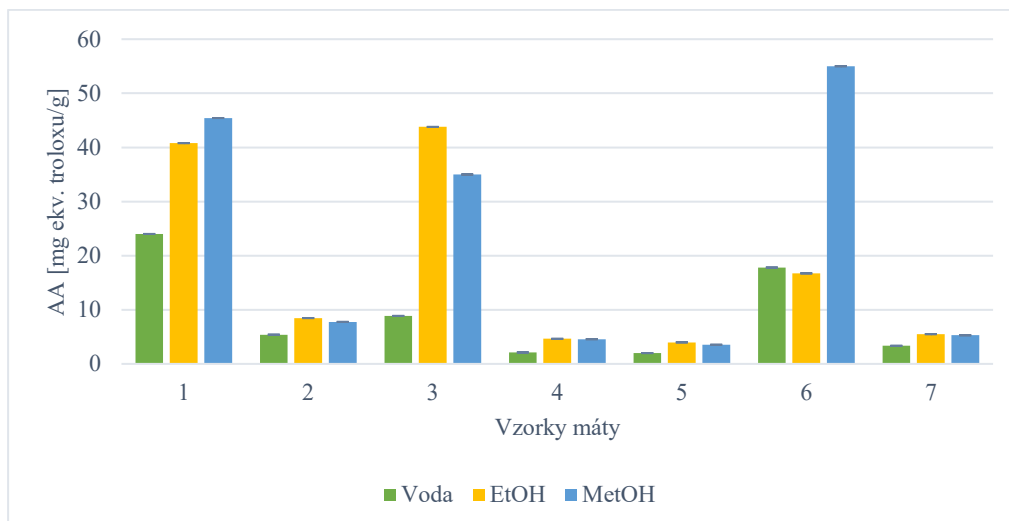
vzorků máty, konkrétně máty vonné (1) a máty peprné odrůdy durinské (7) bylo zjištěno, že extrakty připravované z máty sušené při vyšší teplotě kratší dobu, měly vyšší obsah antioxidantů než extrakty připravované při nižší teplotě delší dobu. U vzorku máty 1 se jednalo o extrakt připravovaný pomocí rozpouštědla etanol, u vzorku máty 7 se jednalo o extrakt, který byl připravován pomocí rozpouštědla voda.

V rámci porovnání použitých rozpouštědel lze z výsledků jak u extraktů připravovaných ze sušených vzorků máty při 25 °C/24 hodin, tak z výsledků u extraktů připravovaných ze sušených vzorků máty při 50 °C/8 hodin usuzovat, že nejúčinnějším rozpouštědlem pro extrakci antioxidantů ze sušených vzorků je voda. Ta byla nejúčinnější u všech extraktů připravovaných ze vzorků sušených při 50 °C/8 hodin a u 71 % vzorků sušených při 25 °C/ 24 hodin. Srovnatelná účinnost použitých rozpouštědel byla zjištěna u extraktů ze vzorku máty peprné 4, a to u těch vzorků, které byly sušené při 25 °C/24 hodin.

Ve studii Yi a Wetzstein [52] testovali vliv sušení a extrakčních podmínek na antioxidační aktivitu stanovenou pomocí metody ABTS a zjistili, že kombinace metody sušení a použitého rozpouštědla má vliv na obsah extrahovatelných antioxidantů, kdy směs vody a metanolu (20:80) byla účinnější pro extrakci antioxidantů v rámci vzorků sušených sluncem a při 40 °C v sušárně s cirkulací vzduchu, zatímco směs vody a etanolu (20:80) byla vhodnější pro extrakci antioxidantů u vzorků sušených při 70 °C v sušárně s cirkulací vzduchu.

### **7.3.5 Stanovení antioxidační aktivity extraktů pomocí ABTS z mražených vzorků máty a porovnání účinnosti použitých rozpouštědel**

AA metodou ABTS byla stanovována i u extraktů, které byly připravovány z mražených vzorků máty. Bylo připraveno 21 extraktů s použitím rozpouštědel – voda, etanol a metanol. Výsledky stanovení těchto extraktů lze pozorovat na obr. 23.



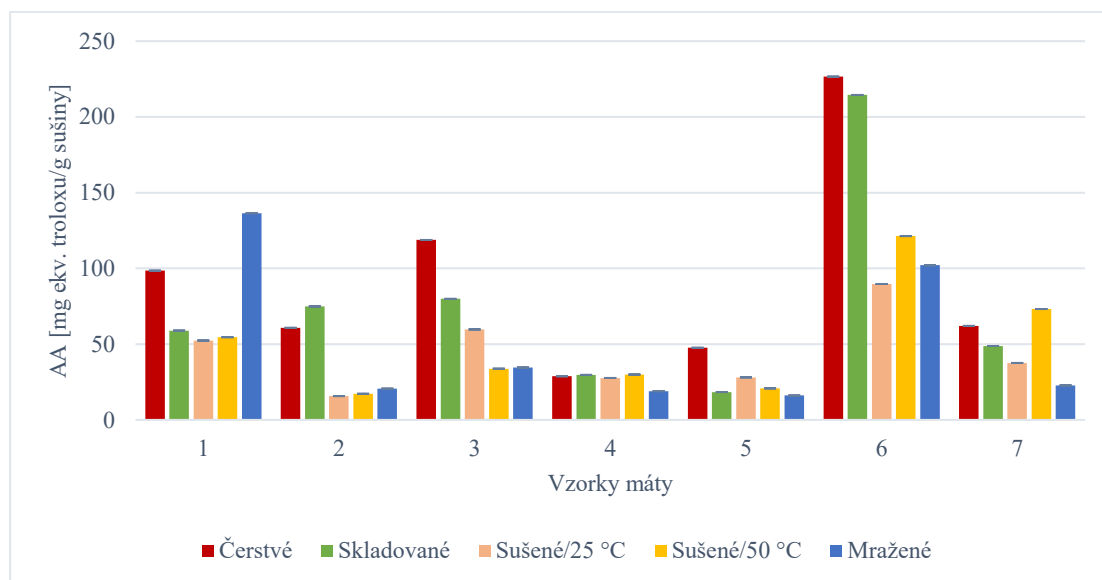
Obr. 23 Výsledky AA stanovované metodou ABTS u extraktů z mražených vzorků máty

Extrakty z mražených vzorků měly AA v rozmezí od 1,99 mg/g do 55,00 mg/g, kdy stejně jako u stanovení AA metodou DPPH, i v rámci tohoto stanovení byla u vzorků máty peprné 4 a 5 zjištěna nejnižší AA. Nejvyšší AA vykazovaly extrakty ze vzorků máty vonné 1 a máty peprné 3 a 6, což také odpovídá stanovení AA pomocí DPPH.

Z analyzovaných rozpouštědel bylo zjištěno, že nejnižší účinnost pro extrakci antioxidantů z mražených vzorků vykazovala voda. Vyšší účinnost pro extrakci antioxidantů byla pozorována u rozpouštědel alkoholových, konkrétně etanolu, který byl u většiny vzorků (5) účinnější než metanol.

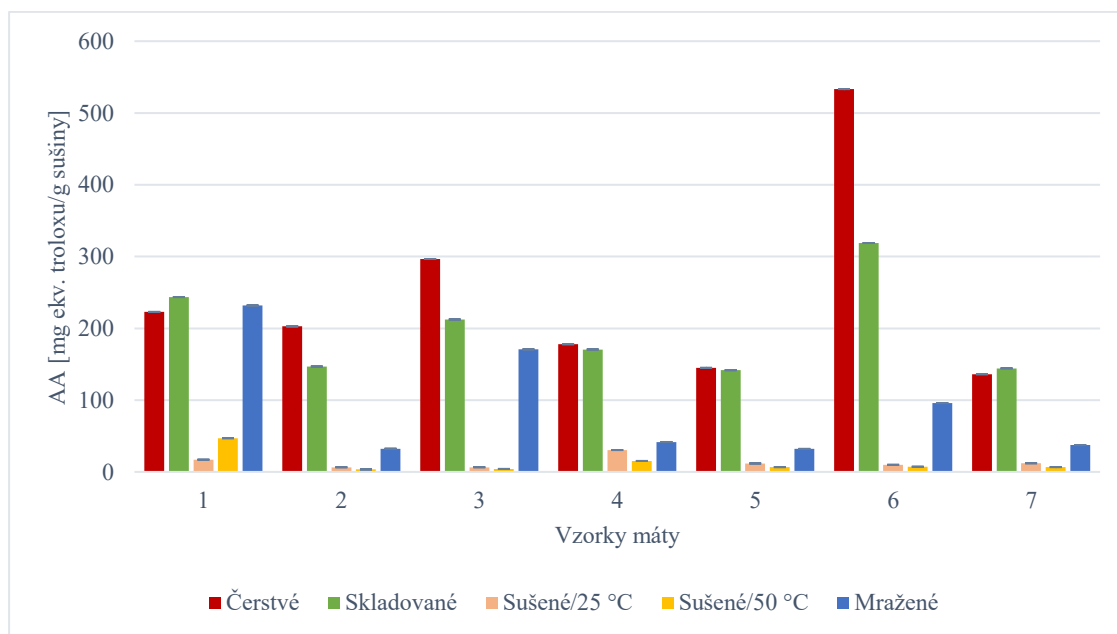
### 7.3.6 Vliv úprav vzorků na antioxidační aktivitu stanovenou pomocí ABTS

U testovaných extraktů byl rovněž posuzován vliv úpravy vzorku na antioxidační aktivitu, kdy zde byly výsledky stanovení AA přepočítávány na mg ekv. troloxu/g sušiny vzorku. Na obr. 24 je uvedeno srovnání testovaných vlivů úpravy u vodných extraktů ze vzorků máty.



Obr. 24 Porovnání vlivu úprav vzorku na AA metodou ABTS u vodných extraktů

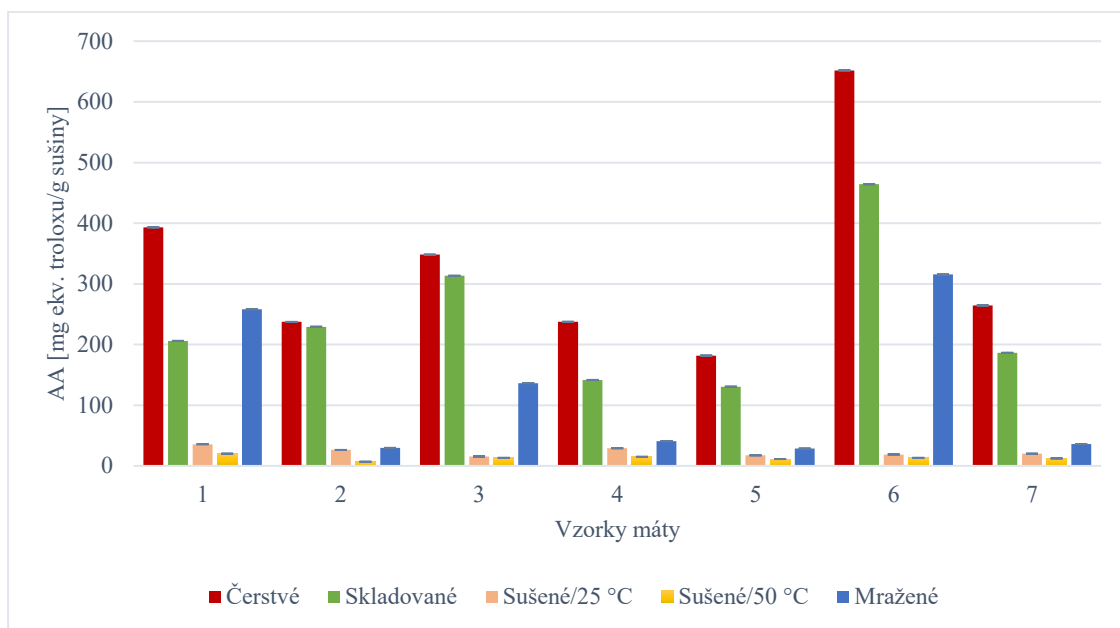
V rámci stanovení vlivu úprav vzorku máty na AA stanovenou pomocí ABTS u vodných extraktů byly zjištěné výsledky obdobné výsledkům získaným pomocí metody DPPH. I zde bylo mražení nejméně vhodnou úpravou u většiny vzorků máty (5), jelikož AA těchto extraktů byla oproti maximu průměrně o 41,2 % nižší než AA extraktů ze vzorků sušené máty. Nejvyšší AA byla vyhodnocena u extraktů připravovaných z čerstvých, případně skladovaných vzorků máty. U jednoho vzorku máty vykazoval extrakt z mraženého vzorku vyšší AA oproti extraktu z čerstvé a skladované máty a u vzorku máty 7 byla vyšší AA stanovena u extraktu ze sušené máty. Tyto odlišnosti byly zjištěny i pomocí metody DPPH, proto lze usuzovat, že k nim došlo z důvodu jiného druhu máty nebo rozdílnými podmínkami pěstování apod.



Obr. 25 Porovnání vlivu úprav vzorku na AA metodou ABTS u etanolových extraktů

Z výsledků je patrné, že u extraktů připravovaných z čerstvých a 3 dny skladovaných vzorků máty v chladu byla stanovena nejvyšší AA. Ze 7 testovaných dvojic extraktů vzorků máty (čerstvé a skladované) je možné pozorovat, že 4 dvojice extraktů ze vzorků máty mají přibližně stejný obsah antioxidantů, tudíž zde skladováním nedošlo k podstatným změnám obsahu antioxidantů. U tří dvojic extraktů, byl zjištěn vyšší obsah antioxidantů u extraktů ze vzorků čerstvé máty než u extraktů ze vzorků skladované máty. U extraktů z mražených vzorků máty byla zjištěna vzhledem k maximu o 63,1 % nižší AA než u extraktů ze vzorků čerstvé a skladované máty, avšak byla o 72,0 % vyšší než u extraktů ze sušených vzorků máty. Proto lze usuzovat, že nejméně vhodnou úpravou u etanolových extraktů je sušení ať už při 25 °C/24 hodin či 50 °C/8hodin.





Obr. 26 Porovnání vlivu úprav vzorku na AA metodou ABTS u metanolových extraktů

Na obr. 26 je patrné, že nejvyšší AA pomocí ABTS u metanolových extraktů byla stanovena u extraktů z čerstvých vzorků máty. Z analyzovaných úprav bylo u všech vzorků pozorováno, že extrakty z mražených vzorků vykazovaly o 56,0 % vyšší AA než extrakty ze sušených vzorků máty.

Výsledná zjištění v rámci vlivu úprav byla obdobná jak pro metodu ABTS, tak i pro metodu DPPH, jelikož i pomocí metody ABTS bylo stanoveno, že mražení je lepším způsobem konzervace než sušení u etanolových a metanolových extraktů ze vzorků máty, ale pro vodné extrakty je lepší úpravou sušení oproti mražení. I zde tedy bylo potvrzeno, že kombinace rozpouštědla využitého k extrakci s úpravou vzorku před extrakcí má vliv na množství antioxidantů v extraktu.

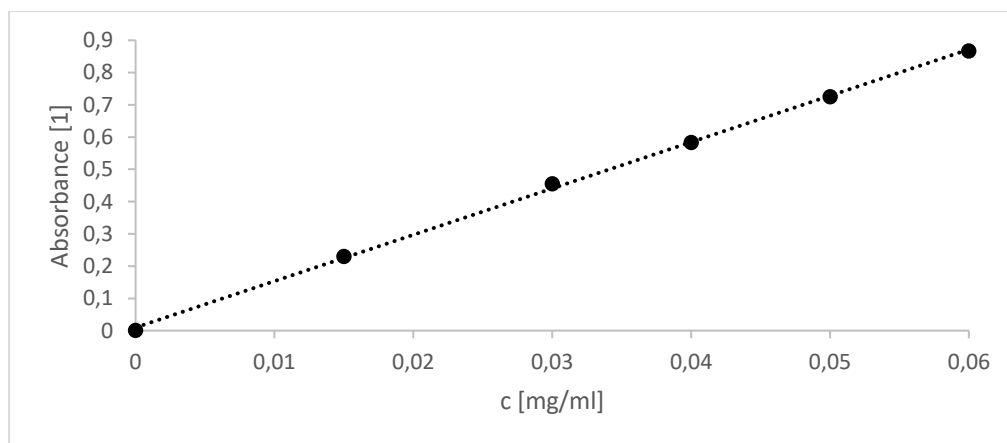
#### 7.4 Stanovení celkového obsahu polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla

Celkový obsah polyfenolů byl stanovován pomocí Folin-Ciocalteuova činidla postupem uvedeným v kap. 6.5.2. Testováno bylo 119 extraktů ze vzorků máty čerstvé, 3 dny skladované v lednici, námi sušené a námi mražené. Skladování, sušení, mražení a následná příprava extraktů byla prováděna postupem, který je uveden v kap. 6.2. Celkový obsah

polyfenolů v extraktu máty pak byl přepočítán na standard kyseliny gallové pomocí kalibrační křivky a vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové v miligramech na gram sušiny vzorku.

#### 7.4.1 Kalibrační křivka kyseliny gallové

Stanovení kalibrační křivky kyseliny gallové (KG) bylo provedeno dle postupu uvedeného v kap. 6.5.3, kdy z naměřených hodnot absorbancí kalibračních roztoků KG byla sestrojena kalibrační křivka (obr. 27) jako závislost absorbance na koncentraci kalibračních roztoků KG. Body grafu byly proloženy přímkou a byla zjištěna rovnice lineární regrese.



Obr. 27 Kalibrační křivka KG pro rozpouštědlo voda

Rovnice regrese zjištěná z kalibrační křivky KG má tvar:

$$y = 14,368 \cdot x + 0,0097$$

y – hodnota absorbance [1]

x – hodnota koncentrace KG c [mg/ml]

Hodnota spolehlivosti  $R^2 = 0,9993$ .

V tab. 5 jsou uvedeny hodnoty rovnic regrese a spolehlivosti pro další použítá rozpouštědla.

Tab. 5 Rovnice regrese kalibračních křivek KG pro  
použitá rozpouštědla

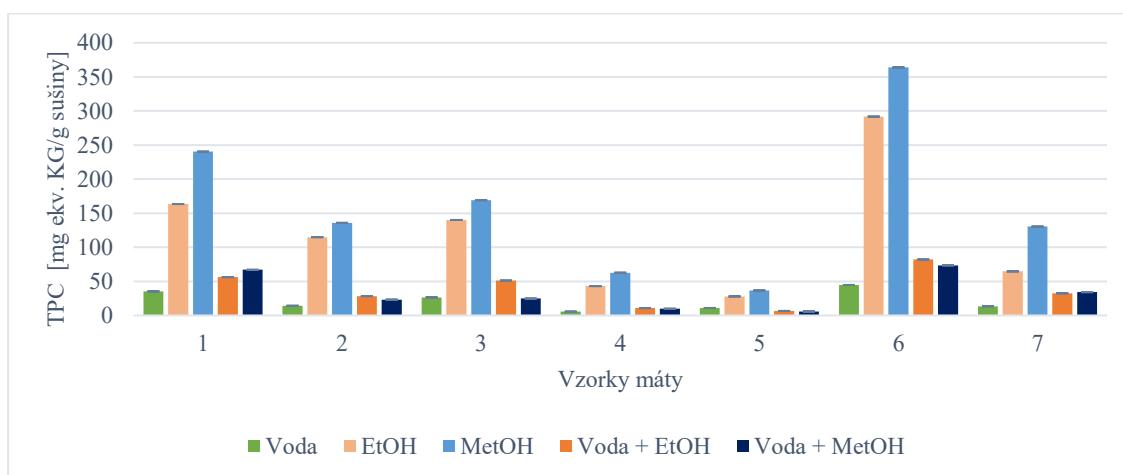
Rozpouštědlo	Rovnice regrese	R <sup>2</sup>
Etanol	$y = 3,9243 \cdot x + 0,0110$	0,9889
Metanol	$y = 3,7696 \cdot x + 0,0069$	0,9920
Voda + etanol	$y = 12,292 \cdot x + 0,0184$	0,9941
Voda + metanol	$y = 11,983 \cdot x + 0,0105$	0,9962

y...hodnota absorbance [1], x...hodnota koncentrace KG

[mg/ml], R<sup>2</sup>...hodnota spolehlivosti

#### 7.4.2 Porovnání účinnosti použitých rozpouštědel v rámci stanovení celkového obsahu polyfenolů u čerstvých vzorků máty

Během testování celkového obsahu polyfenolů (TPC) bylo rovněž provedeno u extraktů z čerstvých vzorků máty stanovení, které rozpouštědlo je vhodnější pro extrakci polyfenolů. Porovnávána byla rozpouštědla voda, etanol, metanol, směs vody a etanolu (50:50) a směs vody a metanolu (50:50). Na obr.28 je uvedeno vyhodnocení tohoto porovnání.



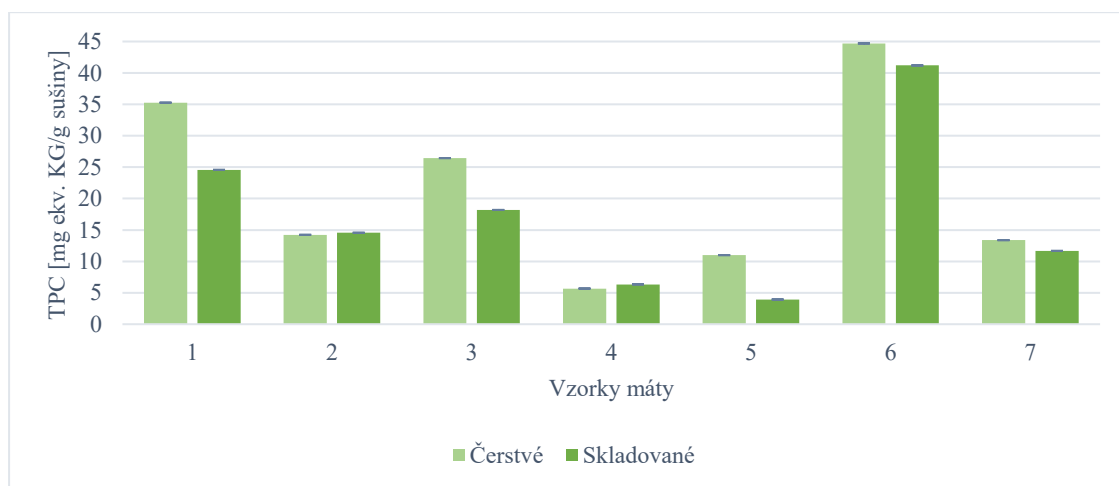
Obr. 28 Porovnání účinnosti testovaných rozpouštědel v rámci stanovení TPC

U všech sedmi testovaných vzorků máty byl nejúčinnějším rozpouštědlem pro extrakci polyfenolických látek metanol. Ten byl průměrně účinnější o 27,1 % oproti etanolu, který byl vyhodnocen jako druhé nejúčinnější rozpouštědlo. Směsi rozpouštědel nebyly tak účinné jako samotná rozpouštědla, avšak u většiny vzorků (6) byly účinnější než voda. Z daných

výsledků lze tedy usuzovat, že pro extrakci polyfenolických látek je metanol nejvhodnějším rozpouštědlem z námi testovaných.

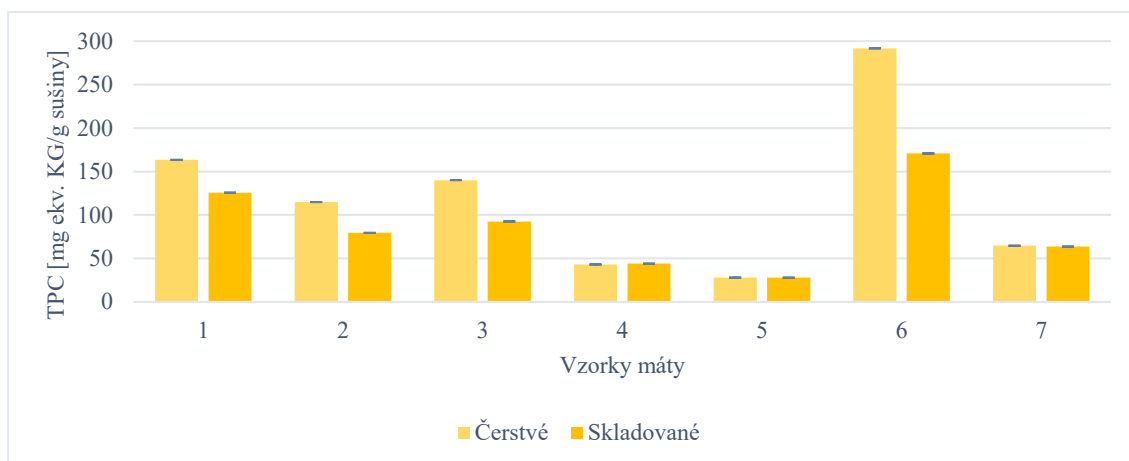
### 7.4.3 Stanovení celkového obsahu polyfenolů u extraktů ze vzorků čerstvé a 3 dny skladované máty

Celkový obsah polyfenolů (TPC) pomocí Folin-Ciocalteuova činidla byl stanovován u extraktů ze vzorků čerstvé a 3 dny skladované máty. Bylo připraveno 42 extraktů pomocí rozpouštědel voda, etanol a metanol, u kterých byly porovnávány změny celkového obsahu polyfenolů mezi extrakty z čerstvých a skladovaných vzorků máty. Na obr. 29, 30 a 31 jsou uvedeny grafy výsledků tohoto stanovení.



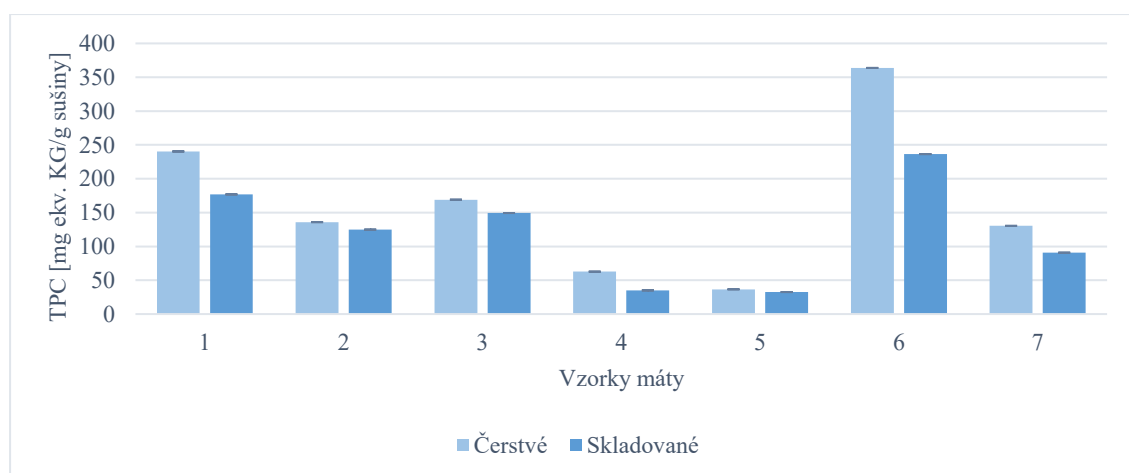
Obr. 29 Výsledky TPC u vodných extraktů z čerstvé a skladované máty

TPC se u vodných extraktů pohyboval v rozmezí od 3,93 mg/g do 44,69 mg/g sušiny vzorku. Stejně jako u stanovení AA pomocí DPPH a ABTS i zde byly nejnižší hodnoty zjištěny u vzorků máty pepřné 4 a 5 z tržní sítě původem z ČR a Německa. Na obr. 29 je možné pozorovat, že nejvyšší hodnoty TPC byly stanoveny u vzorků máty vonné z domácího pěstitelství a dvou vzorků máty pepřné z domácího pěstitelství a ze zahradnictví.



Obr. 30 Výsledky TPC u etanolových extraktů z čerstvé a skladované máty

U etanolových extraktů byl TPC stanoven v rozmezí od 27,84 mg/g do 291,74 mg/g sušiny vzorku. TPC etanolových extraktů byl tedy průměrně o 79,6 % vyšší než u extraktů, které byly připravovány pomocí vody. Nejnižší TPC byl stanoven u stejných vzorků máty pepné jako u vodných extraktů a rovněž i nejvyšší TPC etanolových extraktů odpovídal stejným vzorkům máty vonné a máty pepné jako u vodných extraktů.



Obr. 31 Výsledky TPC u metanolových extraktů z čerstvé a skladované máty

Metanolové extrakty vykazovaly ještě vyšší TPC než etanolové extrakty, a to průměrně o 26,9 %, kdy se zjištěný TPC pohyboval v rozmezí od 32,52 mg/g do 363,77 mg/g sušiny vzorku. Stejně jako u etanolových a vodných extraktů i zde byl nejnižší TPC stanoven

u vzorků máty peprné 4 a 5 a nejvyšší TPC byl určen u vzorků máty vonné 1 a máty peprné 3 a 6.

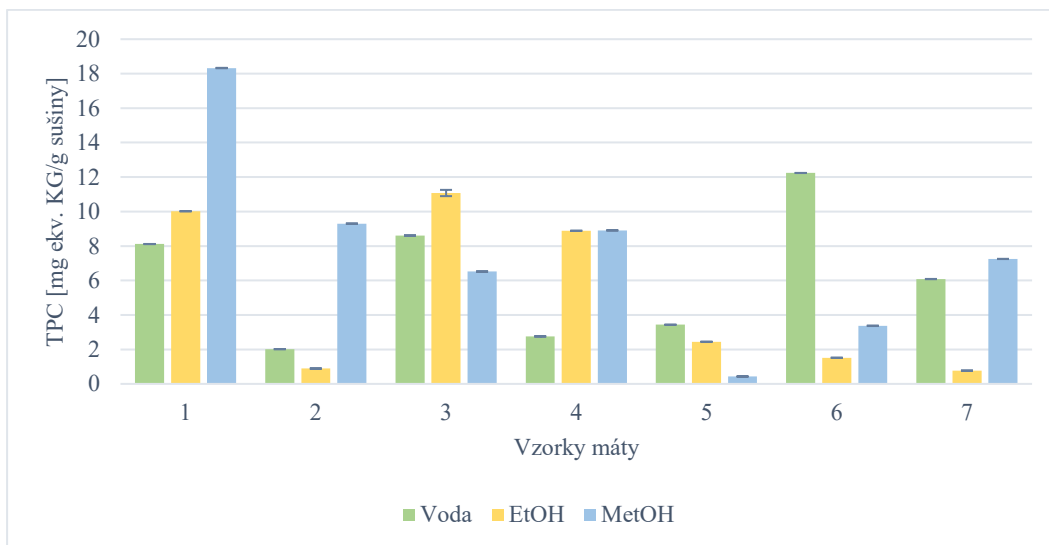
I zde je možné usuzovat, že tak velký rozptyl hodnot TPC u extraktů z čerstvých a skladovaných vzorků máty lze přisuzovat hlavně druhu a podmínkám při pěstování daných bylin [1, 54]. Vliv na TPC v extraktech máty má také použité rozpouštědlo (viz kap. 7.4.2).

U většiny dvojic extraktů (85,7 %) bylo zjištěno, že extrakty, které byly připravovány ze skladované máty, měly nižší TPC než extrakty, které byly připravovány z čerstvé máty. U zbylých 3 dvojic extraktů bylo pozorováno, že hodnoty TPC v rámci extraktů připravovaných z čerstvé a skladované máty byly srovnatelné. Lze tedy usuzovat, že skladováním dochází k částečnému snížení TPC u vzorků máty.

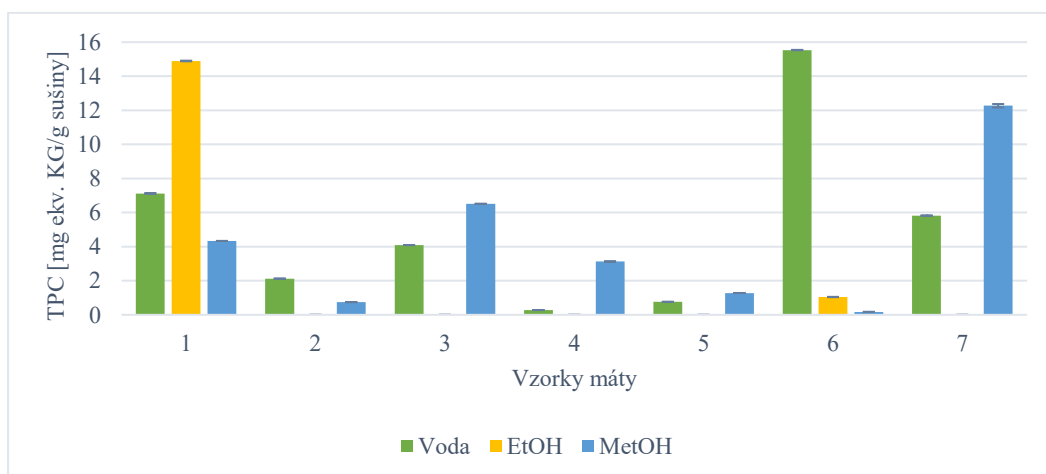
Capecka E. a kol. [55] prováděli stanovení TPC u metanolových extraktů máty pomocí Folin-Ciocalteuova činidla, kdy jako standard využili KG. V rámci extraktů z čerstvých vzorků máty stanovili celkový obsah polyfenolů na 19,54 mg/g sušiny vzorku. Tento obsah polyfenolů je oproti našemu stanovení v metanolových vzorcích nižší, což však mohlo být způsobeno rozdílnými druhy máty, podmínky pěstování a přípravou samotných extraktů. Ve studii není uvedeno, jak dlouhá byla extrakční doba při přípravě extraktů, což má taky vliv na celkový obsah polyfenolů.

#### **7.4.4 Stanovení celkového obsahu polyfenolů extraktů ze vzorků sušené máty a porovnání účinnosti použitých rozpouštědel**

U 42 extraktů ze sušených vzorků máty bylo rovněž provedeno stanovení celkového obsahu polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Vzorky máty byly sušeny postupem uvedeným v kap. 6.2 při dvou různých teplotách a dobách: 25 °C/24 hodin a 50 °C/8 hodin. Extrakty byly připravovány pomocí rozpouštědel voda, etanol a metanol dle postupu uvedeného v kap. 6.2.



Obr. 32 Výsledky TPC u extraktů ze sušených vzorků máty při 25 °C/24 hodin



Obr. 33 Výsledky TPC u extraktů ze sušených vzorků máty při 50 °C/8 hodin

V rámci vodných extraktů se TPC pohyboval v rozmezí od 0,28 mg/g do 15,54 mg/g sušiny vzorku. Extraktů ze vzorků máty vonné (2) a máty peprné (4 a 5) sušených při obou teplotách vykazovaly nejnižší TPC. Oproti tomu nejvyšší TPC byl stanoven u extraktů ze vzorku máty vonné (1) a máty peprné (6), kdy se jednalo o extraktů ze vzorků, které byly sušeny při obou teplotách a vzorek máty peprné (3), konkrétně extrakt ze vzorku máty sušeného při 25 °C. Extraktů připravované pomocí etanolu vykazovaly obdobný rozsah TPC jako v případě vodných extraktů, a to od 0,77 mg/g do 14,90 mg/g sušiny vzorku. Nejnižší TPC byl stanoven u vzorku máty 2, stejně jako u vodných extraktů a vzorku máty 7. Nejvyšší TPC byl zjištěn u vzorků máty 1, 3 a 4, a to u extraktů ze vzorků máty 1, které byly sušeny

jak při 25 °C, tak i 50 °C a u extraktů ze vzorků máty 3 a 4, sušených při 25 °C. Ve většině případů (5) nebyly u extraktů ze vzorků sušených při 50 °C/8 hodin detekovány touto metodou žádné polyfenoly. Lze proto usuzovat, že použití etanolu při přípravě extraktů z takto sušených vzorků (50 °C/8 hodin) není vhodné pro extrakci polyfenolů.

Ve studii Stanisavljevice a kol. [25] bylo také zjištěno, že obsah fenolických sloučenin v etanolových extraktech klesá s rostoucí teplotou sušení.

TPC metanolových extraktů byl určen v rozmezí od 0,17 mg/g do 18,33 mg/g sušiny vzorku. Stejně jako u vodných a etanolových extraktů i zde byl nejnižší TPC stanoven u extraktu ze vzorku máty vonné 2 avšak pouze sušeného při 50 °C. Dále byl nejnižší TPC určen u extraktu ze vzorku máty peprné 6, sušeného rovněž při 50 °C a extraktu ze vzorku máty peprné 5, který byl sušen při 25 °C. Nejvyšší TPC byl zjištěn, stejně jako v předchozích dvou rozpouštědlech, u extraktu ze vzorků máty vonné (1), který byl sušen při nižší teplotě a extraktu ze vzorku 7, sušeného při vyšší teplotě.

V závislosti na teplotě a době sušení vzorků bylo zjištěno, že u většiny dvojic extraktů (81 %) měly vyšší TPC extrakty, které byly připravovány ze vzorků sušených při nižší teplotě a delší dobu a u zbylých 4 dvojic extraktů bylo zjištěno, že extrakty připravované při vyšší teplotě kratší dobu měly průměrně o 40,3 % vyšší obsah polyfenolů než extrakty sušené při nižší teplotě delší dobu. Jednalo se o vodné extrakty vzorku máty 6, etanolové extrakty vzorku máty 1 a metanolové extrakty vzorků máty 5 a 7.

Ve studii Yi a Wetzstein [52] byl testován vliv sušení a extrakčních podmínek na celkový obsah polyfenolů a bylo zjištěno, že metanol vykazoval vyšší účinnost pro extrakci polyfenolů ze vzorků máty sušených při 40 °C, proto mohl být i u metanolových extraktů ze vzorků máty 5 a 7 stanoven vyšší TPC. Avšak je nutné brát v potaz i druh máty, podmínky pěstování a přípravu extraktů.

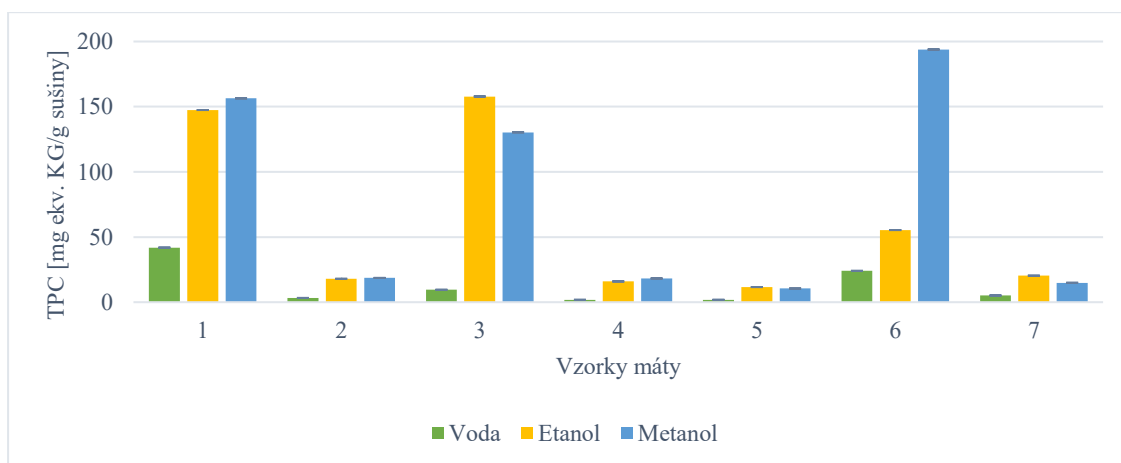
Capecka E. a kol. [55] prováděli stanovení celkového obsahu polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla u extraktů z čerstvé a sušené máty připravovaných pomocí směsi metanolu a vody (80:20). Jako standard byla využita KG. U extraktů ze sušené máty byl stanoven vyšší TPC oproti nám, což mohlo být ovlivněno druhem máty, jinými podmínkami během sušení, kdy v dané studii prováděli sušení ve stinné, dobře větratelné místnosti v rozmezí teplot 25 – 32 °C po dobu 10 dnů a za použití jiného rozpouštědla -směsi metanolu a vody (80:20).



Ve studii Stanisavljevice a kol. [25] bylo také zjištěno, že na obsah fenolických látek má vliv i způsob sušení, kdy při sušení v laboratoři při 45 °C/2 dny a sušení v kondenzační sušárně při nižší teplotě (35 °C/2 dny) bylo získáno méně celkových polyfenolů a flavonoidů než při sušení na vzdušném stinném místě po dobu 15 dnů.

#### 7.4.5 Stanovení celkového obsahu polyfenolů extraktů z mražených vzorků máty a porovnání účinnosti použitých rozpouštědel

TPC byl stanovován i u 21 extraktů, které byly připraveny z mražených vzorků máty, a to pomocí rozpouštědel voda, etanol a metanol, postupem uvedeným v kap. 6.2. Na obr. 34 lze vidět výsledky tohoto stanovení.



Obr. 34 Výsledky TPC extraktů z mražené máty

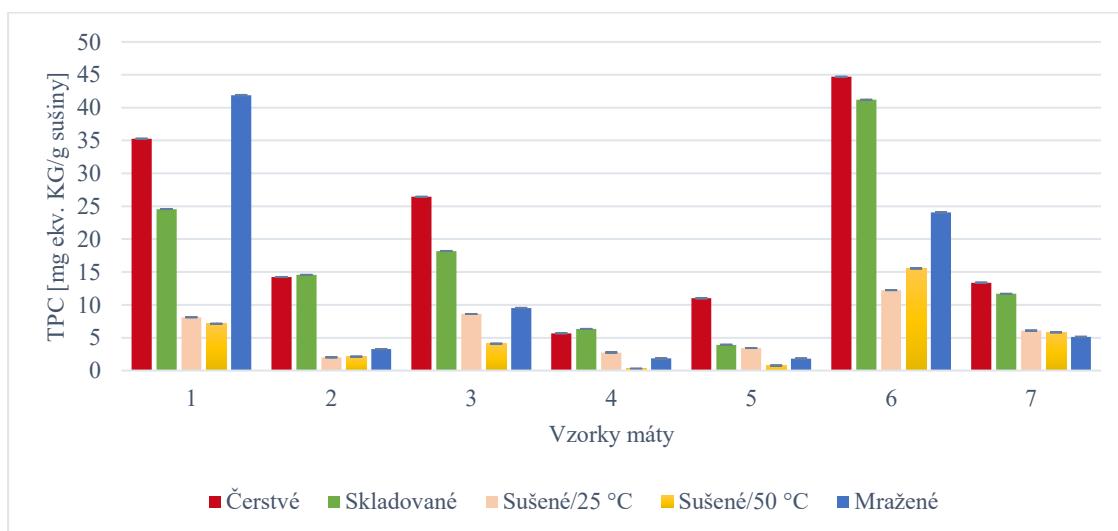
TPC u extraktů z mražených vzorků máty se pohyboval v rozmezí od 1,83 mg/g do 193,87 mg ekv. KG/g sušiny vzorku. Nejnižších hodnot TPC bylo stanoveno u stejných vzorků máty (4 a 5), jako při stanovení AA metodami DPPH a ABTS. Rovněž i nejvyšší hodnoty TPC v rámci extraktů z mražených vzorků máty se shodovaly s nejvyššími hodnotami AA stanovených pomocí DPPH a ABTS u extraktů z mražených vzorků máty, a to vzorků máty 1, 3 a 6.

Jak lze pozorovat na obr. 34 nižší obsah polyfenolů vykazovaly extrakty, které byly připravovány pomocí vody. Vyšší účinnost pro extrakci polyfenolů z mražených vzorků máty byla zjištěna u alkoholových rozpouštědel. Etanol byl účinnější průměrně o 17,9 % oproti

metanolu u tří vzorků máty (3, 5 a 7) a metanol byl účinnější průměrně o 23,3 % než etanol u vzorků 1, 2, 4 a 6. Z daných výsledků lze usuzovat, že voda není nejvhodnějším rozpouštědlem pro získání polyfenolů z mražených vzorků máty.

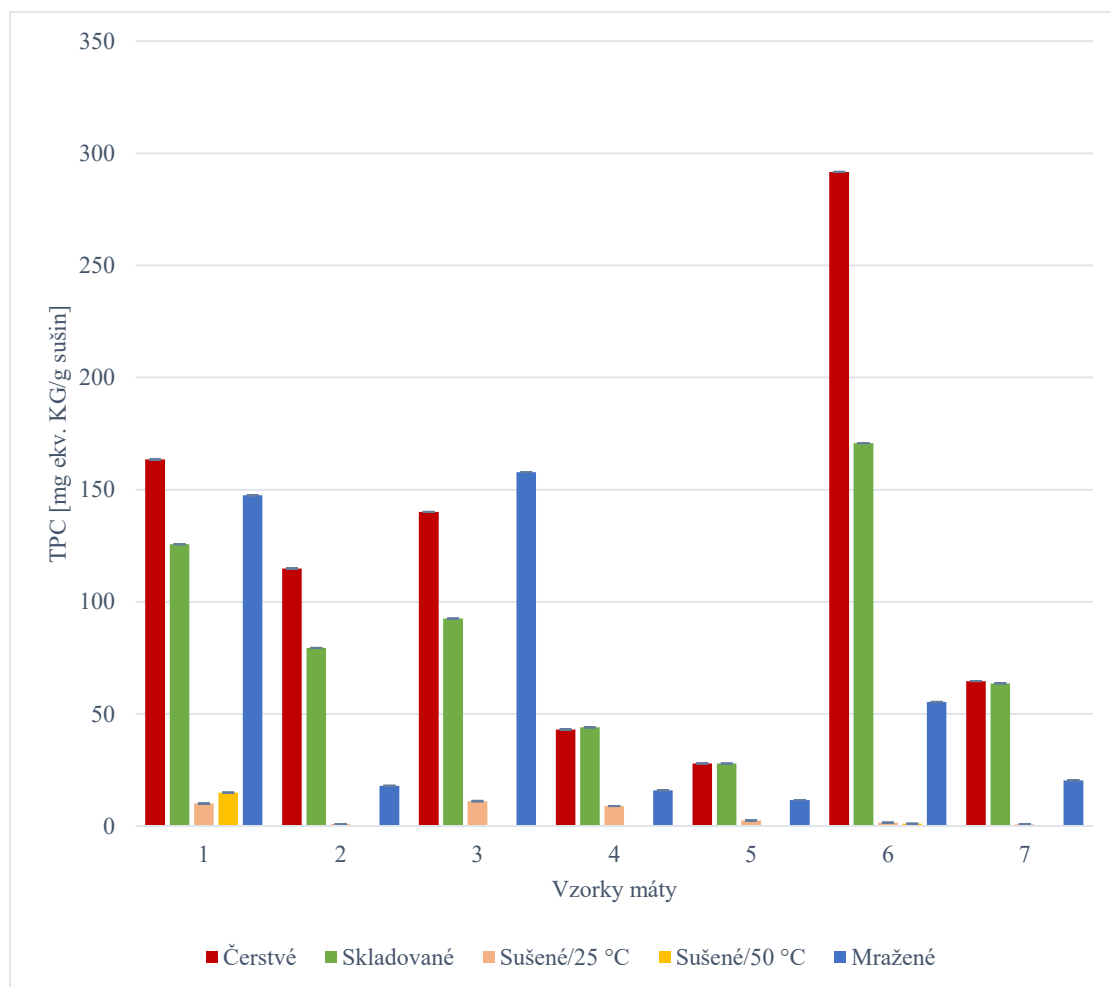
#### 7.4.6 Vliv úpravy na celkový obsah polyfenolů

U všech analyzovaných vzorků máty bylo provedeno srovnání vlivu úprav vzorku na celkový obsah polyfenolů (obr. 35, 36 a 37).



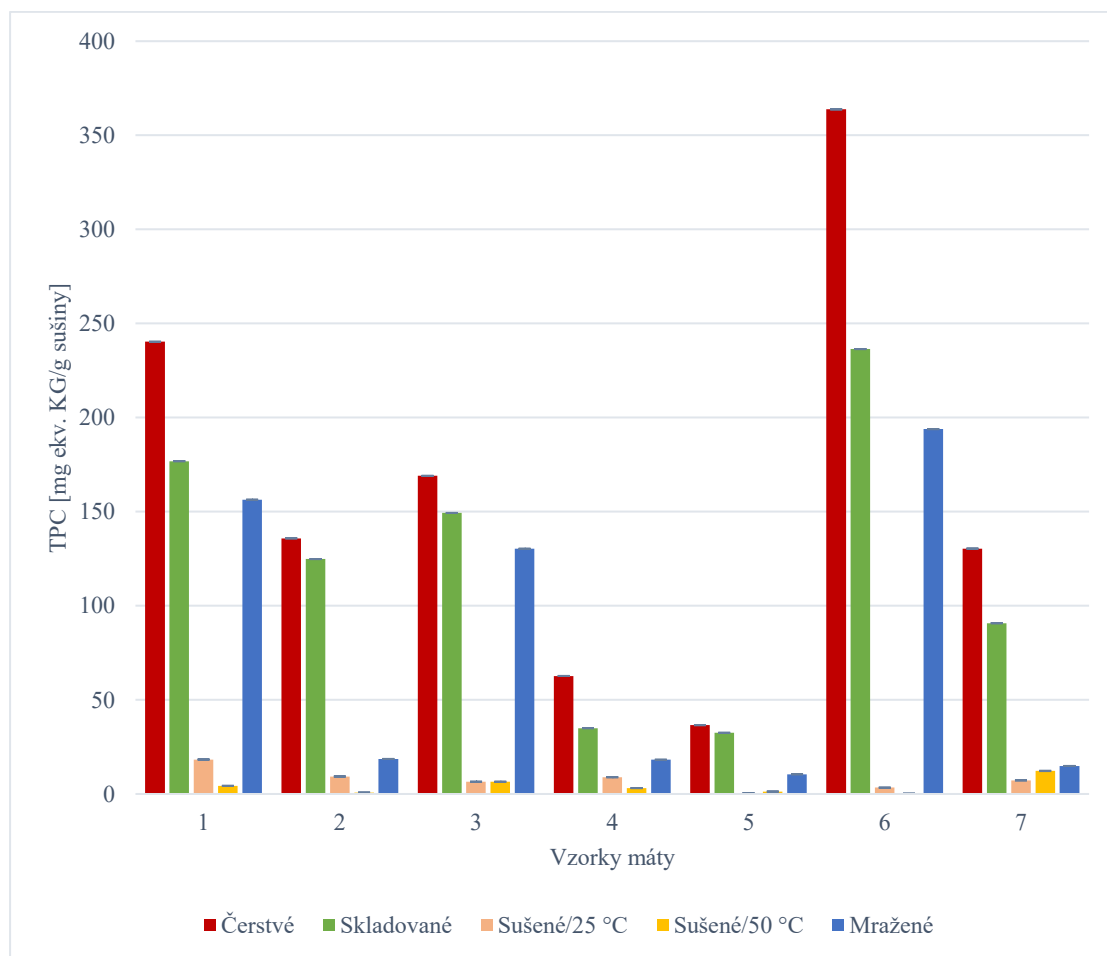
Obr. 35 Porovnání vlivu úprav vzorku máty na TPC u vodných extraktů

U většiny vzorků máty (86 %) je vidět, že extrakty z čerstvých a 3 dny skladovaných vzorků máty vykazovaly nejvyšší TPC s výjimkou vzorku máty vonné (1), kde byl TPC vyšší u extraktu z mražené máty o 15,8 % oproti extraktu z čerstvé máty. Z analyzovaných úprav vzorků máty bylo u 4 vzorků máty stanoveno mražení vhodnější úpravou pro získání polyfenolů průměrně o 44,5 % než sušení při 25 °C. Sušení při 25 °C/24 hodin bylo vhodnějším způsobem konzervace (průměrně o 31,7 %) oproti mražení u 3 vzorků máty. Ze všech druhů uchování bylo vyhodnoceno sušení při 50 °C po dobu 8 hodin jako nejméně vhodné.



Obr. 36 Porovnání vlivu úprav vzorku máty na TPC u etanolových extraktů

Na obr. 36 lze vidět vliv úprav vzorků máty na TPC u etanolových extraktů kdy u všech vzorků máty byl nejvyšší TPC stanoven u extraktů z čerstvých vzorků máty s výjimkou vzorku máty pepřné 3, kde extrakt z mraženého vzorku měl o 11,2 % TPC vyšší oproti extraktu z čerstvého vzorku máty. Při stanovení TPC byl u etanolových extraktů pozorován stejný vliv úpravy jako při stanovení AA metodami DPPH a ABTS, kdy i zde bylo mražení vyhodnoceno jako nejvhodnější způsob konzervace vzorků máty. Extrakty z mražených vzorků máty totiž vykazovaly TPC průměrně o 84,9 % vyšší než extrakty připravované ze sušených vzorků máty.



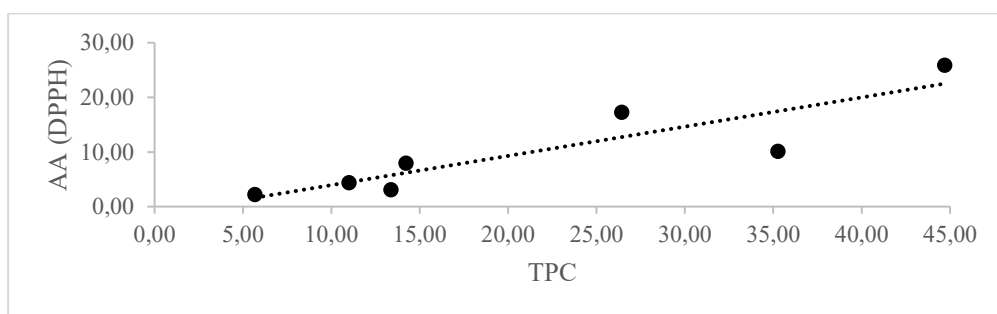
Obr. 37 Porovnání vlivu úprav vzorku máty na TPC u metanolových extraktů

U metanolových extraktů byl nejvyšší TPC pozorován u extraktů připravovaných z čerstvé a skladované máty. Stejně jako u etanolových extraktů i zde bylo vyhodnoceno mražení jako vhodnější způsob konzervace oproti sušení, kdy byl TPC stanoven průměrně o 69,8 % nižší u extraktů ze sušených vzorků máty než z mražených vzorků máty.

Stejně jako v předchozích dvou stanoveních (AA metodami DPPH a ABTS) i v rámci stanovení TPC bylo u etanolových a metanolových extraktů vyhodnoceno mražení vzorku máty jako lepší způsob konzervace než sušení. U vodných extraktů bylo u TPC vyhodnoceno mražení máty mírně lepším způsobem uchování než sušení. Vzhledem k tomu, že při stanovení AA u obou metod bylo sušení vyhodnoceno jako lepší úprava vzorku, by bylo vhodné u vodných extraktů z mražených a sušených vzorků máty zjistit, jaká kombinace (jakožto rozpouštědla pro extrakci polyfenolů), a úpravy je vhodnější.

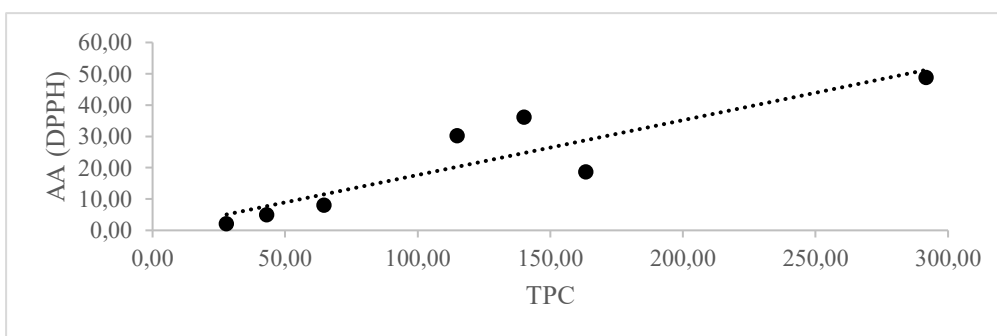
#### 7.4.7 Korelace celkového obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity

V rámci stanovených výsledků byl zjišťován vliv přítomných polyfenolů jako celkový obsah polyfenolů (TPC) na antioxidační aktivitu (AA) stanovenou prostřednictvím DPPH nebo ABTS metody pomocí hodnot korelačních faktorů. Korelace byly sestaveny podle úpravy vzorku máty a použitého rozpouštědla. Na obr. 38 – 43 jsou znázorněny grafy závislosti AA (DPPH) na TPC pro vodné, etanolové a metanolové extrakty z čerstvých vzorků máty, sušených vzorků máty a mražených vzorků máty. V tab. 7 jsou uvedeny hodnoty korelačních faktorů pro závislosti AA (ABTS) na TPC pro vodné, etanolové, metanolové a směsné (voda + etanol a voda + metanol) extrakty z čerstvých vzorků máty, vodné extrakty ze sušených vzorků máty a vodné, etanolové a metanolové extrakty z mražené máty.

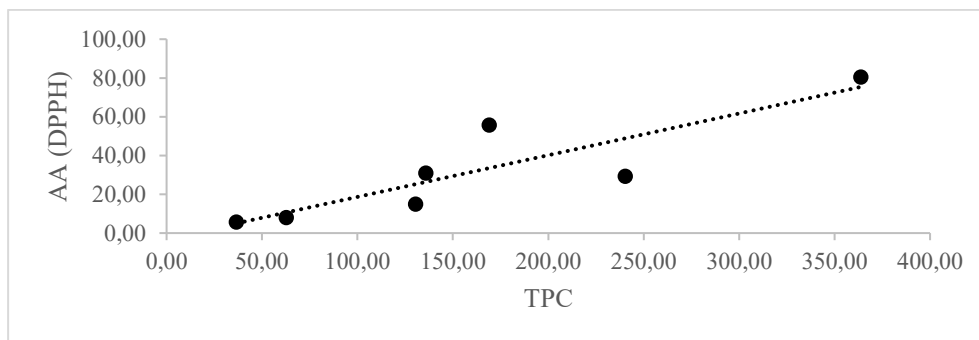


Obr. 38 Závislost AA na TPC pro vodné extrakty z čerstvých vzorků máty

U všech extraktů z čerstvých vzorků máty byly zjištěny vyšší hodnoty korelačních faktorů. Pro vodné extrakty byly korelační faktor 0,7860, pro etanolové extrakty korelační faktor 0,8050, a pro metanolové extrakty 0,7692.

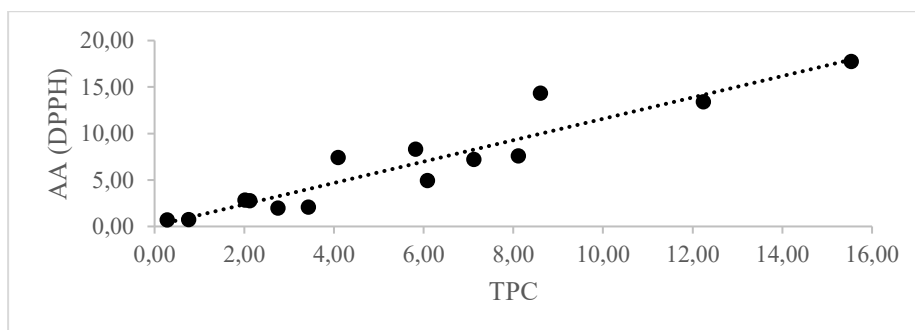


Obr. 39 Závislost AA na TPC pro etanolové extrakty z čerstvých vzorků máty



Obr. 40 Závislost AA na TPC pro metanolvé extrakty z čerstvých vzorků máty

Pro směsné extrakty (voda + etanol) byl zjištěn korelační faktor 0,6734 a pro směsné extrakty (voda + metanol) korelační faktor 0,6014. Nejvyšší korelační faktor byl vyhodnocen u etanolových extraktů. Nejnižší u extraktů, připravovaných pomocí směsi rozpouštědel vody s metanolem. Na základě zjištěných korelačních faktorů lze usuzovat, že AA je podmíněna i přítomností polyfenolů.

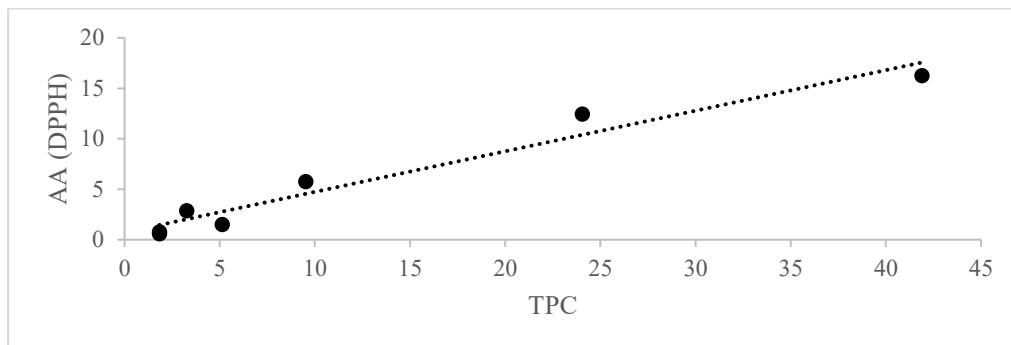


Obr. 41 Závislost AA na TPC pro vodné extrakty ze sušených vzorků máty

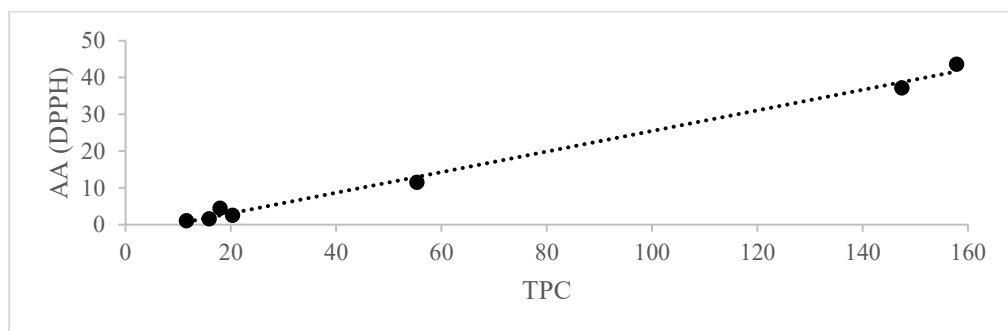
V rámci extraktů ze sušených vzorků máty byl stanoven vyšší korelační koeficient pouze u vodných extraktů, kdy korelační faktor byl 0,8848, zatímco u etanolových a metanolových extraktů byla stanovena nízká hodnota korelačního faktoru. Hodnoty korelačních faktorů pro tyto extrakty jsou v tab. 6.

U mražených extraktů byla korelace zjištěna u vodných extraktů s korelačním faktorem 0,9534 a u etanolových extraktů, kde byl korelační faktor roven 0,9934. U metanolových

extraktů byla vyhodnocena nízká hodnota korelačního faktoru. Korelační faktor metanolových extraktů lze vidět v tab. 6.



Obr. 42 Závislost AA na TPC pro vodné extrakty z mražených vzorků máty



Obr. 43 Závislost AA na TPC pro etanolové extrakty z mražených vzorků máty

Tab. 6 Hodnoty korelačních faktorů pro etanolové a metanolové extrakty ze sušených vzorků máty a metanolových extraktů z mražených vzorků máty

Rozpouštědlo	Vzorky	Korelační faktor
Etanol	sušené	0,0264
Metanol	sušené	0,3762
Metanol	mražené	0,5229

*Tab. 7 Hodnoty korelačních faktorů pro extrakty z čerstvých, sušených a mražených vzorků máty*

Rozpouštědlo	Vzorky	Korelační faktor
Voda	čerstvé	0,7629
Etanol	čerstvé	0,7838
Metanol	čerstvé	0,8241
Voda + etanol	čerstvé	0,7671
Voda + metanol	čerstvé	0,6231
Voda	sušené	0,8854
Voda	mražené	0,9627
Etanol	mražené	0,9953
Metanol	mražené	0,9964

U všech extraktů z čerstvých vzorků máty byla vyhodnocena korelace mezi AA stanovenou pomocí metody ABTS a TPC. Nejvyšší korelační faktor u extraktu z čerstvých vzorků byl zjištěn u metanolových extraktů a nejnižší u extraktů připravených pomocí směsi voda s metanolem. V závislosti na stanovených korelačních faktorech bylo usouzeno, že AA extraktů z čerstvých vzorků máty je závislá na přítomnosti polyfenolů.

U extraktů ze sušených vzorků máty byla určena korelace pouze u vodných extraktů, zatímco u etanolových a metanolových extraktů byla zjištěna velmi nízká hodnota korelačního faktoru, tyto hodnoty je možné vidět v tab. 8.

U extraktů z mražených vzorků máty byla stanovena korelace u všech extraktů, avšak nejvyšší hodnotu korelačního faktoru vykazovaly metanolové extrakty a nejnižší vodné extrakty. I zde bylo na základě stanovených korelačních faktorů usouzeno, že AA extraktů z mražených vzorků máty je závislá na přítomnosti polyfenolů.

*Tab. 8 Hodnoty korelačních faktorů pro extrakty z etanolových a metanolových extraktů ze sušených vzorků máty*

Rozpouštědlo	Vzorky	Korelační faktor
Etanol	sušené	0,1685
Metanol	sušené	0,4292

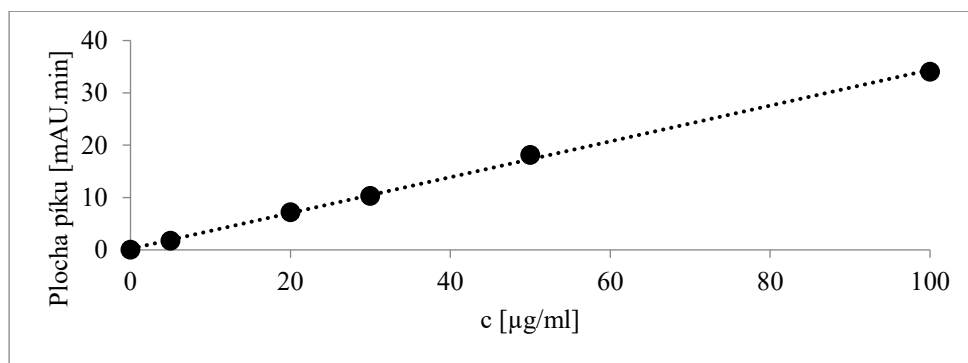


## 7.5 Stanovení vybraných polyfenolů pomocí HPLC/DAD

Stanovení 22 vybraných polyfenolů bylo provedeno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí v extraktech (35) ze vzorků čerstvé máty. Tyto extrakty byly připravovány stejným postupem, který je uveden v kap. 6.2. Toto stanovení bylo provedeno za podmínek uvedených v kap. 6.6.2.

### 7.5.1 Kalibrační křivky standardů

Pro stanovení kalibračních křivek všech standardů (22) byl využit postup uvedený v kap. 6.6.3. Pro každý standard byla na základě zjištěných hodnot sestavena kalibrační křivka jako závislost plochy píku na koncentraci kalibračních roztoků standardu. Následně byly body grafu proloženy přímkou a byla zjištěna rovnice lineární regrese. Na obr. 44 je uvedena kalibrační křivka kyseliny gallové, jako jedné z hlavních polyfenolických látek. Pro zbývající polyfenolické látky jsou uvedeny rovnice regrese a hodnoty spolehlivosti v tab. 9.



Obr. 44 Kalibrační křivka kyseliny gallové

Rovnice regrese zjištěná z kalibrační křivky kyseliny gallové má tvar:

$$y = 0,342 \cdot x + 0,2116$$

y – hodnota plochy píku [ $\text{mAU}\cdot\text{min}$ ]

x – hodnota koncentrace KG c [ $\mu\text{g/ml}$ ]

Hodnota spolehlivosti  $R^2 = 0,9988$ .

Tab. 9 Rovnice regrese kalibračních křivek stanovených fenolických sloučenin

	Rovnice regrese	R <sup>2</sup>
Kyselina protokatechová	$y = 0,2357.x + 0,0111$	0,9995
Kyselina neochlorogenová	$y = 0,1553.x + 0,0397$	0,9994
Kyselina 4-hydroxybenzoová	$y = 0,5091.x + 0,1581$	0,9996
Epigallokatechin	$y = 0,0225.x - 0,0272$	0,9991
Katechin	$y = 0,0990.x - 0,0176$	0,9992
Kyselina chlorogenová	$y = 0,2089.x + 0,2429$	0,9991
Kyselina vanilová	$y = 0,2564.x + 0,5094$	0,9936
Kyselina kávová	$y = 0,5451.x + 0,1806$	0,9995
Kyselina syringová	$y = 0,3702.x + 0,0965$	0,9993
Epikatechin	$y = 0,1389.x - 0,0916$	0,9987
Kyselina trans-p-kumarová	$y = 1,1956.x + 0,5853$	0,9979
Kyselina ferulová	$y = 0,4559.x - 0,3865$	0,9992
Kyselina sinapová	$y = 0,1757.x + 0,0656$	0,9994
Kyselina elagová	$y = 0,2049.x - 0,2959$	0,9991
Rutin	$y = 0,1264.x - 0,0492$	0,9998
Kyselina trans-hydroxyskořicová	$y = 1,2630.x + 0,6818$	0,9989
Etylester kyseliny protokatechové	$y = 0,3106.x - 0,0751$	0,9998
Resveratrol	$y = 0,3657.x - 0,2952$	0,9998
Kyselina trans-skořicová	$y = 1,4846.x + 0,2387$	0,9995
Kempferol	$y = 0,2282.x - 0,2736$	0,9997
Kvercetin	$y = 0,3347.x - 0,6343$	0,9953

y...hodnota plochy píku [mAU.min], x...hodnota koncentrace standardu

[μg/ml], R<sup>2</sup>...hodnota spolehlivosti

### 7.5.2 Stanovení vybraných polyfenolů v extraktech máty pomocí HPLC-DAD

V extraktech z čerstvých vzorků máty byly stanovovány vybrané fenolické látky (22). Jednalo se o polyfenoly, které jsou uvedeny v tab. 9 a kyselinu gallovou, jejíž kalibrační křivka je pro ukázkou uvedena na obr. 44.

V tab. 10 jsou uvedeny podrobné výsledky stanovení daných polyfenolů ve vodných extraktech. Výsledky etanolových, metanolových, směsných (voda s etanolem (50:50) a voda s metanolem (50:50)) extraktů jsou uvedeny v tabulkách 11, 12, 13 a 14 v příloze I, II, III a IV této diplomové práce. V příloze V je pro ukázkou zobrazen na obr. 47 chromatogram stanovení fenolických látek metodou HPLC-DAD metanolového extraktu čerstvého vzorku máty 7.

Celkově bylo ve vodných extraktech zjištěno nejméně kyseliny trans-p-kumarové a kyseliny gallové. Oproti tomu bylo ve vodných extraktech stanoveno nejvíce epigallokatechinu a katechinu, kdy epigallokatechinu bylo průměrně o 99,8 % více než kyseliny trans-p-kumarové. U vodných extraktů byly detekovány všechny stanovované polyfenolické látky s výjimkou kyseliny vanilové.

V extraktu ze vzorku 1, máty vonné, získané z domácího pěstitelství, bylo stanoveno nejmenší množství kyseliny gallové, kyseliny trans-p-kumarové a kyseliny trans-hydroxyskořicové. Oproti tomu bylo v tomto extraktu zjištěno nejvyšší množství epigallokatechinu.

V rámci druhého vzorku máty vonné z domácího pěstitelství, bylo stanoveno nejmenší množství kyseliny gallové, kyseliny ferulové a kyseliny elagové. Stejně jako u vzorku máty 1 i zde bylo zjištěno nejvyšší množství epigallokatechinu, dále rutinu a kyseliny trans-hydroxyskořicové.

U extraktu ze vzorku 3, máty peprné, která pocházela stejně jako předchozí dva vzorky z domácího pěstitelství, bylo zjištěno nejméně kyseliny trans-p-kumarové a kyseliny protokatechové. Zatímco kyseliny sinapové, kyseliny syringové a epigallokatechinu bylo stanoveno nejvyšší množství.

V extraktech ze vzorků máty peprné 4 a 5, které byly získané z tržní sítě, původem z ČR a Německa, byly z celkového počtu 22 polyfenolů stanoveny pouze dvě (4), případně tři látky (5). V extraktu ze vzorku máty 4 byla stanovena kyselina trans-skořicová a kyselina trans-p-kumarová. V extraktu ze vzorku máty 5 byl kromě kyseliny trans-p-kumarové stanoven katechin a resveratrol, kdy katechin a resveratrol se vyskytovaly téměř ve stejném množství.

V extraktu ze vzorku máty peprné 6, získaného ze zahradnictví bylo stanoveno nejnižší množství kyseliny gallové, kyseliny trans-p-kumarové a kvercetinu. Nejvyšší obsah ze stanovených polyfenolů byl tvořen katechinem a epikatechinem.

Ve vodném extraktu vzorku máty peprné odrůdy durinské 7, byl zjištěn nejnižší obsah kyseliny protokatechové, kyseliny syringové, kyseliny trans-p-kumarové a etylesteru kyseliny protokatechové. V tomto extraktu bylo nejvíce zjištěno katechinu a rutinu.

Vzorek	1		2		3		4		5		6		7	
	Obsah [µg/g]	s	Obsah [µg/g]	s	Obsah [µg/g]	s	Obsah [µg/g]	s	Obsah [µg/g]	s	Obsah [µg/g]	s	Obsah [µg/g]	s
PP														
Kyselina gallová	0,54	0,37	1,15	0,05	N.D.		N.D.		N.D.		1,32	0,13	N.D.	
Kyselina protokatechová	N.D.		3,76	0,02	0,98	0,03	N.D.		N.D.		11,12	0,09	1,45	0,07
Kyselina neochlorogenová	3,02	0,90	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		4,32	0,03	N.D.	
Kyselina 4-hydroxybenzoová	2,89	0,16	4,80	0,21	3,65	0,05	N.D.		N.D.		2,52	0,16	N.D.	
Epigallocatechin	6575,47	6,04	116,66	0,30	65,61	0,64	N.D.		N.D.		5,33	1,26	8,62	0,04
Katechin	18,13	1,5	20,98	1,13	38,99	0,92	N.D.		N.D.		15,54	0,53	22,07	0,50
Kyselina chlorogenová	29,67	0,81	25,09	0,06	4,84	0,03	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Kyselina kávová	15,06	0,37	4,23	0,38	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Kyselina syringová	11,71	0,02	7,69	0,79	67,57	0,64	N.D.		N.D.		N.D.		1,51	0,10
Epikatechin	N.D.		11,88	1,93	12,13	0,50	N.D.		N.D.		40,49	0,64	N.D.	
Kyselina trans-p-kumarová	0,54	0,03	11,05	0,20	0,28	0,01	0,92	0,07	0,31	0,01	1,48	0,02	1,39	0,06
Kyselina ferulová	2,76	0,18	1,45	0,16	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Kyselina sinapová	6,79	0,16	2,50	1,31	110,14	1,22	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Kyselina elagová	N.D.		1,60	1,02	N.D.		N.D.		N.D.		7,82	0,11	N.D.	
Rutin	12,82	0,61	76,96	4,33	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		18,07	0,90
Kyselina trans-hydroxykoičová	1,44	0,07	40,62	3,85	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		33,95	0,18
Eylester kyseliny protokatechové	15,92	0,87	4,80	0,06	N.D.		N.D.		N.D.		10,83	0,07	1,42	0,12
Resveratrol	3,72	0,23	N.D.		4,41	0,22	N.D.		15,46	0,41	6,89	0,39	2,48	0,04
Kyselina trans-skořicová	2,20	0,01	N.D.		N.D.		0,58	0,05	N.D.		4,17	0,23	N.D.	
Kempferol	N.D.		3,49	0,25	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Kvercetin	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		1,18	0,16	N.D.	

Výsledky stanovení polyfenolických látek v čaji (číslo vzorků 1-10)

N.D. – nedetekováno

s – směrná odchylka [µg/g]

V rámci etanolových extraktů bylo celkově stanoveno nejméně kyseliny trans-p-kumarové, jako u vodných extraktů, a kyseliny ferulové. Nejvíce pak bylo zjištěno kyseliny sinapové, rutinu a kyseliny trans-hydroxyskořicové, kdy kyseliny sinapové bylo zjištěno o 99,97 % více než kyseliny trans-p-kumarové. Pouze u jednoho extraktu byla stanovena kyselina 4-hydroxybenzoová a kyselina trans-skořicová. Kyselina gallová, kyselina protokatechová, kyselina neochlorogenová, epigallokatechin, kyselina kávová, kyselina syringová a kyselina elagová nebyly v etanolových extraktech detekovány.

U etanolových extraktů obou vzorků máty vonné (1 a 2) bylo stanoveno nejvyšší množství kyseliny sinapové a rutinu a u extraktu ze vzorku máty 1 bylo zjištěno nejmenší množství katechinu a etylesteru kyseliny protokatechové. U extraktu ze vzorku máty 2 a 3 bylo vyhodnoceno nejmenší množství kyseliny trans-p-kumarové a kyseliny ferulové. Nejvyšší množství u extraktu ze vzorku máty 3 bylo stanoveno opět u kyseliny sinapové a rutinu. V extraktu ze vzorku máty 4 byly detekovány pouze rutin, kyselina trans-hydroxyskořicová a resveratrol a v extraktu ze vzorku máty 5 byla mimo těchto tří polyfenolických látek detekována navíc kyselina chlorogenová. V extraktu ze vzorku máty 6 bylo obsaženo nejvyšší množství rutinu a kyseliny trans-hydroxyskořicové a nejmenší množství kyseliny trans-p-kumarové a etylesteru kyseliny protokatechové. U extraktu ze vzorku máty 7 bylo vyhodnoceno nejvíce kyseliny sinapové a rutinu a nejméně kyseliny trans-p-kumarové a kyseliny ferulové, stejně jako u extraktů ze vzorků máty 2 a 3.

Stejně jako u etanolových extraktů i v metanolových extraktech bylo nejvíce stanoveno kyseliny sinapové a rutinu a nejméně kyseliny trans-p-kumarové a kyseliny ferulové. Kyseliny sinapové bylo zjištěno o 99,96 % více než kyseliny trans-p-kumarové. Kyselina neochlorogenová a kempferol byly detekovány pouze u jednoho extraktu. U žádného extraktu nebyly detekovány kyselina gallová, kyselina protokatechová, epigallokatechin, kyselina kávová, kyselina syringová, kyselina elagová a kyselina trans-skořicová.

U metanolových extraktů vzorků máty 1; 2; 3 a 7 bylo zjištěno nejvyšší množství kyseliny sinapové a rutinu. V extraktu ze vzorku máty vonné 1 bylo obsaženo nejméně kvercetin, ze vzorku máty vonné 2 bylo nejméně kyseliny 4-hydroxybenzoové a kyseliny trans-p-kumarové, této kyseliny bylo nejmenší množství stanoveno i v extraktu ze vzorku máty peprné 3. Kyseliny trans-p-kumarové a etylesteru kyseliny protokatechové bylo vyhodnoceno nejmenší množství v extraktu vzorku máty peprné 7. V metanolových extraktech vzorku máty peprné 4 a 5 bylo stanoveno více polyfenolických látek oproti etanolovým a vodným extraktům, kdy nejvyšší množství v extraktu ze vzorku máty 4 bylo zastoupeno

rutinem a v extraktu ze vzorku máty 5 kyselinou chlorogenovou. Oproti tomu byl v extraktu vzorku máty 4 stanoven nejnižší obsah kyseliny ferulové a kyseliny neochlorogenové a v extraktu vzorku máty 5 kvercetin. Extrakt ze vzorku máty peprné 6 vykazoval nejvyšší obsah rutinu a kyseliny trans-hydroxyskořicové, stejně jako etanolový extrakt tohoto vzorku a nejnižší obsah byl zjištěn kyseliny trans-p-kumarové a kyseliny ferulové.

Jako v předchozích dvou případech, etanolových a metanolových extraktů, i u extraktů připravovaných pomocí směsi rozpouštědel voda s etanolem (50:50) bylo nejvíce detekováno kyseliny sinapové a rutinu a nejméně kyseliny trans-p-kumarové a kyseliny ferulové, kdy kyseliny trans-p-kumarové bylo o 99,95 % méně oproti kyselině sinapové. Kyselina trans-skořicová byla detekována pouze u dvou extraktů ze vzorků máty a kyselina kávová jen u jednoho extraktu. Kyselina gallová, kyselina protokatechová, kyselina 4-hydroxybenzová a kyselina elagová nebyly detekovány u žádného extraktu.

U směsného (voda s etanolem) extraktu ze vzorku máty vonné 1 bylo zjištěno nejvíce epigallokatechinu, rutinu a kyseliny sinapové. Nejmenší množství pak bylo u tohoto extraktu vyhodnoceno u katechinu a etylesteru kyseliny protokatechové. V extraktech vzorků máty 2, 3 a 7 bylo nejvyšší množství detekováno u kyseliny sinapové a rutinu, naopak nejméně bylo stanoveno, v rámci těchto extraktů, u vzorku máty vonné 2 kyseliny syringové a kyseliny ferulové, u vzorku máty peprné 3 kyseliny kávové a kyseliny trans-p-kumarové a u vzorku 7 rovněž kyseliny trans-p-kumarové a kempferolu. U extraktu vzorku máty peprné 4 bylo zjištěno nejvíce kyseliny chlorogenové a kyseliny neochlorogenové zatímco u extraktu ze vzorku máty peprné 5 bylo nejvyšší množství tvořeno kyselinou vanilovou, kyselinou chlorogenovou a rutinem. Nejmenší množství bylo u obou vzorků těchto extraktů vyhodnoceno u kyseliny trans-p-kumarové, u vzorku máty 4 kyseliny trans-skořicové a u vzorku máty 5 kyseliny ferulové. V extraktu ze vzorku máty peprné 6 bylo nejvíce stanoveno rutinu a kyseliny trans-hydroxyskořicové. Stejně jako u extraktu ze vzorku máty 5, bylo nejméně detekováno kyseliny trans-p-kumarové a kyseliny ferulové.

I v rámci extraktů připravovaných pomocí směsi voda s metanolem (50:50) bylo stejně jako u etanolových, metanolových a směsných (voda s etanolem) extraktů zjištěno nejvíce kyseliny sinapové a rutinu a nejméně kyseliny trans-p-kumarové, případně kvercetin. Kyseliny sinapové bylo vyhodnoceno o 99,98 % více jak kyseliny trans-p-kumarové. Pouze dvou extraktů ze vzorku máty byla detekována kyselina kávová a jen u jednoho extraktu byla detekována kyselina trans-skořicová a kempferol. V žádném extraktu nebyla zjištěna přítomnost kyseliny gallové, kyseliny protokatechové a kyseliny elagové.

Nejvyšší množství v směsném extraktu ze vzorku máty vonné 1 bylo, stejně jako u extraktu téhož vzorku připravovaného pomocí směsi voda s etanolem, stanoveno u epigallogatechinu, kyseliny sinapové a rutinu. Nejméně pak bylo vyhodnoceno kyseliny syringové a kvercetin. U extraktů ze vzorku máty vonné 2 a máty peprné 3 a 7 bylo nejvíce zjištěno kyseliny sinapové a rutinu. Nejmenší množství bylo detekováno, u všech těchto vzorků, kyseliny trans-p-kumarové, u vzorku máty vonné 2 bylo nejméně určeno také kyseliny ferulové, u vzorku máty peprné 3 kyseliny syringové a u vzorku máty peprné 7 kvercetin. V extraktu ze vzorku máty peprné 4 bylo nejvyšší množství vyhodnoceno u kyseliny neochlorogenové a kyseliny chlorogenové, stejně jako u extraktu stejného vzorku připravovaného směsí vody s etanolem. Kyseliny 4-hydroxybenzoové a kyseliny trans-p-kumarové bylo zjištěno nejmenší množství. U extraktu připravovaného ze vzorku máty peprné 5 bylo nejvyšší množství tvořeno kyselinou chlorogenovou a vanilovou, stejně jako u extraktu téhož vzorku, kde bylo jako extrakční činidlo využita směs vody s etanolem. Nejméně pak bylo stanoveno, u tohoto extraktu, kyseliny trans-p-kumarové. Stejně jako u extraktů vzorku máty peprné 6 připravovaných pomocí etanolu, metanolu, směsi vody s etanolem i v rámci směsi vody s metanolem bylo nejvyšší množství, v extraktu tohoto vzorku máty, detekováno rutinu a kyseliny trans-hydroxyskořicové. Oproti tomu bylo nejmenší množství určeno u kyseliny trans-p-kumarové a kyseliny kávové.

V rámci všech analyzovaných extraktů máty bylo vyhodnoceno, že se v nejvyšším množství vyskytovala kyseliny sinapové a rutinu. U většiny extraktů bylo nejmenší množství pozorováno u kyseliny trans-p-kumarové a kyseliny ferulové. U etanolových, metanolových a obou směsných extraktů nebyla detekována kyselina gallová, kyselina protokatechová a kyselina elagová. U extraktů připravovaných pomocí etanolu a metanolu nebyla zjištěna přítomnost epigallokatechinu, kyseliny kávové a kyseliny syringové. Kyselina vanilová nebyla detekována u vodných extraktů, kyselina neochlorogenová u etanolových extraktů, kyselina trans skořicová u metanolových extraktů a kyselina 4-hydroxybenzoová u extraktu připraveného pomocí směsi vody s etanolem. Z těchto výsledků lze usoudit, že kyselina vanilová není, jako jediná z analyzovaných fenolických sloučenin (22) rozpustná ve vodě. Také lze usuzovat, že kyselina neochlorogenová je nerozpustná v etanolu, kyselina trans-skořicová v metanolu a epigallokatechin, kyselina kávová a syringová nejsou rozpustné v obou testovaných samotných alkoholových rozpouštědlech, ale pokud byla v rozpouštědлу přítomna voda, v našem případě alespoň z 50 %, tyto látky pak extrahovatelné

již byly. Avšak v rámci kyseliny gallové, kyseliny protokatechové a kyseliny elagové bylo vyhodnoceno, že se jedná o polyfenoly extrahovatelné pouze ve vodě.

Ve studii Fatiha a kol. [23] byly analyzovány tři druhy máty pomocí HPLC-DAD a bylo zjištěno, že hlavní sloučeninou detekovanou ve všech extraktech byla z fenolických kyselin kyselina rozmarýnová a kyselina chlorogenová, která se nacházela ve vysoké koncentraci v extraktu *Mentha pulegium* (polej obecná). V rámci flavonoidů byl jako hlavní sloučenina extraktů z máty identifikován luteolin a diosmin. Z dalších fenolických sloučenin pak byly v extraktech máty přítomny kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina kávová, kyselina p-kumarová, rutin, naringin, naringenin, apigenin, kempferol a diosmetin. Vzhledem k tomu, že se jednalo o etanolové extrakty, připravované z jiných druhů mát za jiných extrakčních podmínek a že výsledky byly v dané studii uváděny v hmotnostních procentech, nebylo možné porovnat množství fenolických sloučenin detekovaných ve studii s našimi hodnotami.

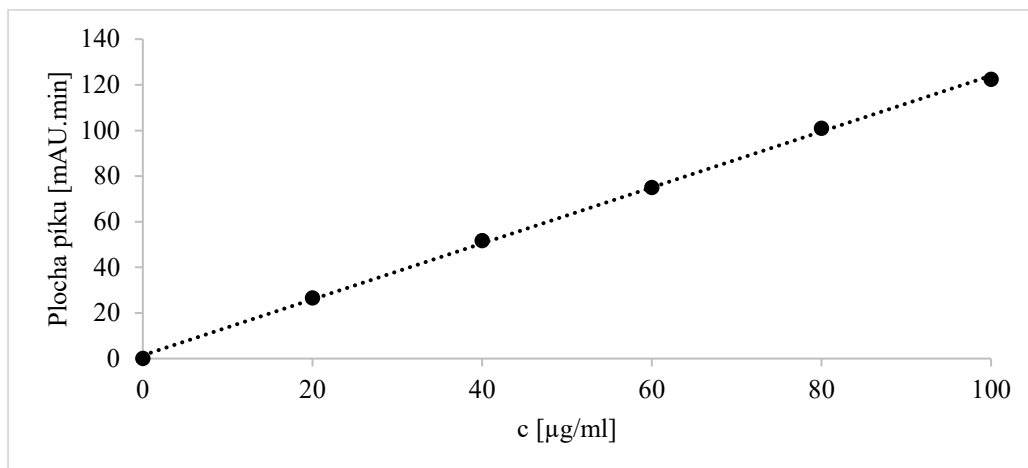
## **7.6 Stanovení obsahu kyseliny askorbové (vitaminu C) pomocí HPLC/DAD**

Kyselina askorbová (KA) byla stanovována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí v extraktech ze vzorků čerstvé máty. Extrakty pro toto stanovení byly připravovány postupem uvedeným v kap. 6.7.1 a samotné stanovení pak probíhalo za podmínek uvedených v kap. 6.7.2.

### **7.6.1 Kalibrační křivka kyseliny askorbové stanovená pomocí HPLC/DAD**

Pro sestavení kalibrační křivky kyseliny askorbové byl použit postup uvedený v kap. 6.7.3. Ze získaných hodnot byla sestavena kalibrační křivka (obr. 45) závislosti plochy píků na koncentraci kalibračních roztoků kyseliny askorbové a byla zjištěna rovnice lineární regrese.





Obr. 45 Kalibrační křivka kyseliny askorbové

Rovnice regrese zjištěná z kalibrační křivky kyseliny askorbové má tvar:

$$y = 1,2261 \cdot x + 1,4322$$

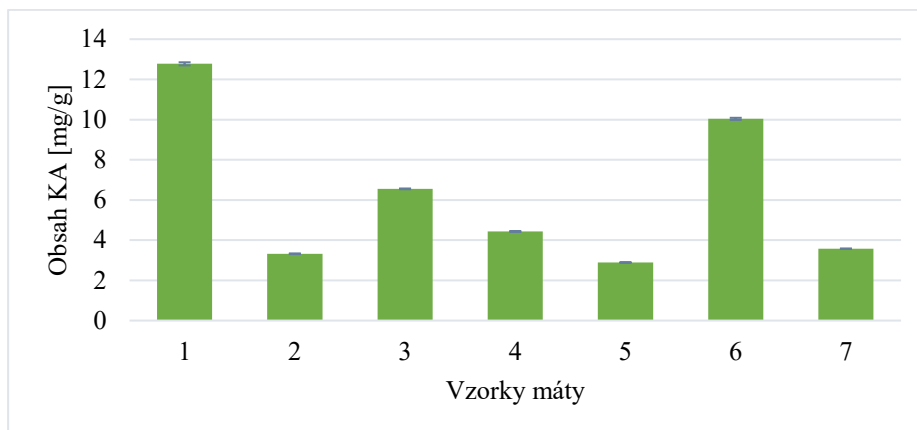
y – hodnota plochy píku [mAU.min]

x – hodnota koncentrace KA  $c$  [ $\mu\text{g/ml}$ ]

Hodnota spolehlivosti  $R^2 = 0,9992$ .

### 7.6.2 Stanovení KA (vitaminu C) v extraktech z čerstvých vzorků máty

Na obr. 40 jsou uvedeny výsledky stanovení obsahu KA v extraktech z čerstvých vzorků. V příloze VI je pro ukázkou zobrazen na obr. 48 chromatogram stanovení KA (vitaminu C) metodou HPLC-DAD u extraktu čerstvého vzorku máty 6.



Obr. 46 Obsah KA ve vzorcích čerstvé máty

Jak lze pozorovat na obr. 46 nejvyšší obsah KA (vitaminu C) byl stanoven ve vzorku máty vonné (12,77 mg/g), z domácího pěstitelství. Druhý vzorek, který obsahoval nejvyšší množství KA, byl vzorek máty peprné (10,04 mg/g), získané ze zahradnictví. Nejnižší obsah vitaminu C byl stanoven u vzorku máty peprné 5 (2,89 mg/g) z tržní sítě a máty vonné (3,31 mg/g) z domácího pěstitelství. U těchto vzorků byl obsah KA průměrně o 71,0 % nižší oproti vzorkům máty, které obsahovaly nejvyšší množství KA.

Ve studii Capecka [55] byl obsah KA stanovován v čerstvých vzorcích máty pomocí Tillmanovy jodometrické metody, kde zjistili pouze 0,526 mg/g. Uribe [20] stanovil obsah vitaminu C v čerstvých vzorcích pomocí HPLC na 1,266 mg/g. V našich vzorcích byl stanoven obsah vitaminu C vyšší, než je uvedeno v těchto studiích, avšak to mohlo být způsobeno druhem máty, podmínkami při pěstování, modifikovaným postupem stanovení atd.

## ZÁVĚR

Máta je důležitou rostlinou ať už v potravinářském, kosmetickém či farmaceutickém průmyslu, kde jsou uplatňovány hlavně její antioxidační a antimikrobiální vlastnosti. Tyto vlastnosti jsou důležité pro prodloužení údržnosti potravin a kosmetických prostředků. Pomocí antioxidantů dochází k redukci volných radikálů způsobujících poškození tkáně a ochraně před onemocněními, jako cévní onemocnění srdce nebo rakovina. Máta vykazuje antioxidační účinky díky zastoupení jednotlivých fenolických sloučenin.

Cílem této práce bylo zjišťování změn polyfenolických látek a antioxidační aktivity (AA) v extraktech ze vzorků máty pomocí stanovení AA metodami DPPH a ABTS a celkového obsahu polyfenolických látek (TPC). Rovněž bylo cílem práce stanovení vybraných fenolických sloučenin (22) a kyseliny askorbové (KA) pomocí HPLC-DAD. Bylo připraveno 119 extraktů ze vzorků máty čerstvé, 3 dny skladované v chladu, sušené při dvou různých teplotách a mražené. Extrakty byly, pro porovnání účinnosti, připravovány pomocí rozpouštědel voda, etanol a metanol a extrakty z čerstvých vzorků máty byly připravovány i působením směsí voda s etanolem (50:50) a voda s metanolem (50:50).

Bylo zjištěno, že extrakty z čerstvých a skladovaných vzorků máty vykazovaly nejvyšší AA určenou jak pomocí DPPH, tak i metodou ABTS. Z analyzovaných úprav (sušení a mražení) bylo mražení vyhodnoceno u většiny vzorků jako vhodnější způsob konzervace než sušení při teplotách 25 °C a 50 °C. Avšak je nutné brát v potaz druh máty, podmínky pěstování a podmínky přípravy extraktů.

V rámci porovnání účinnosti testovaných rozpouštědel u extraktů z čerstvých vzorků máty byl metanol vyhodnocen jako nejúčinnější rozpouštědlo pro extrakci antioxidantů. Jako nejméně vhodné rozpouštědlo byla stanovena voda, jelikož u vodných extraktů byla zjištěna nejnižší AA, a to jak v rámci metody DPPH, tak i ABTS. Z rozpouštědel testovaných u extraktů ze sušených vzorků máty byla ve většině případů naopak zjištěna nejvyšší AA u vodných extraktů. U extraktů z mražených vzorků máty byla nejvyšší účinnost vyhodnocena u extraktů připravovaných pomocí alkoholových rozpouštědel, přičemž u většiny vzorků byl účinnějším pro extrakci antioxidantů etanol. Shodné výsledky byly určeny pomocí metod DPPH i ABTS.

Vliv úprav byl pozorován i u stanovení celkového obsahu polyfenolů (TPC) a výsledky v podstatě odpovídaly stanovení AA oběma metodami, kdy u extraktů z čerstvých a skladovaných vzorků máty byl určen TPC nejvyšší a u extraktů ze sušených vzorků máty byl TPC nejnižší. Mražení bylo vyhodnoceno jako vhodnější způsob konzervace než sušení při teplotách 25 °C a 50 °C. I zde je nutné brát na zřetel vliv různých faktorů.

U stanovení TPC byla rovněž vyhodnocována i účinnost použitých rozpouštědel, a i zde se výsledky ve většině shodovali se stanovením AA. V extraktech z čerstvých a skladovaných vzorků máty byl vyhodnocen metanol jako nejvhodnější rozpouštědlo pro získání fenolických látek. Oproti tomu byla voda stanovena jako nejméně účinná. Pro extrakci fenolických látek ze sušených vzorků byla nejvhodnějším rozpouštědlem voda. Vzhledem k tomu, že ve většině etanolových extraktů ze sušených vzorků máty při 50 °C nebyly detekovány žádné fenolické látky, bylo usouzeno, že etanol není vhodný pro extrakci polyfenolů ze sušených vzorků máty. U extraktů z mražených vzorků, připravovaných pomocí alkoholových rozpouštědel byl stanoven vyšší TPC než u vodných extraktů, proto byla alkoholová rozpouštědla vyhodnocena jako vhodnější extrakční činidla.

V rámci všech analyzovaných extraktů máty pomocí HPLC-DAD bylo vyhodnoceno, že se v nejvyšším množství vyskytovala kyseliny sinapová a rutin. U většiny extraktů bylo zjištěno nejmenší množství kyseliny trans-p-kumarové a kyseliny ferulové. U etanolových, metanolových a obou směsných extraktů nebyla detekována kyselina gallová, kyselina protocatechová a kyselina elagová.

V extraktech z čerstvé máty byl stanovován i obsah KA (kyselina askorbová) pomocí HPLC-DAD, kdy nejvyšší množství KA bylo zjištěno u vzorku máty vonné z domácího pěstitelství a máty pepřné pocházející ze zahradnictví.

V rámci všech analyzovaných vzorků máty, je nutné brát v úvahu druh máty a podmínky pěstování, jelikož bylo potvrzeno, že tyto faktory mají vliv na obsah antioxidantů v dané rostlině. Vzorky máty získané z tržní sítě vykazovaly většinou nejnižší výsledky, jak u AA, testované oběma metodami, tak i u TPC. Také při stanovení fenolických látek pomocí HPLC bylo u těchto vzorků detekováno nejméně složek. Oproti tomu vzorky máty získané ať už z domácího pěstitelství či ze zahradnictví vykazovaly většinou mnohem vyšší obsahy fenolických látek. Celkově byla máta vyhodnocena jako dobrý zdroj antioxidačních látek a mohla by být využívána ke zvýšení biologické hodnoty v rámci různých potravin i nápojů.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KOZŁOWSKA, M., A.E. LAUDY, J. PRZYBYŁ, M. ZIARNO a E. MAJEWSKA. Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from Lamiaceae family. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 2015, **72**(4), 757-767. ISSN 0001-6837.
- [2] STAGOS, D., N. PORTESIS, Ch. SPANOU, et al. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2012, **50**(11), 4115-4124 [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1016/j.fct.2012.08.033. ISSN 0278-6915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691512006138>.
- [3] PETER, K.V. *Handbook of herbs and spices: volume 3*. Boca Raton: CRC Press, 2006, 537 s. Woodhead publishing in food science and technology. ISBN 978-1-84569-017-5.
- [4] SINGH, R., M.A.M. SHUSHNI a A. BELKHEIR. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2015, **8**(3), 322-328 [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1016/j.arabjc.2011.01.019. ISSN 1878-5352. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535211000232>
- [5] SITZMANN, J., R. HABEGGER, W.H. SCHNITZLER a J. GRASSMANN. Comparative Analysis of Antioxidant Activities of Fourteen *Mentha* Essential Oils and Their Components. *Chemistry & Biodiversity* [online]. 2014, **11**(12), 1978-1989 [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1002/cbdv.201400100. ISSN 1612-1872. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbdv.201400100>
- [6] SUTOUR, S., P. BRADESI, D. DE ROCCA-SERRA, J. CASANOVA a F. TOMI. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from *Mentha suaveolens* ssp *insularis* (Req.) Greuter. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. 2008, **23**(2), 107-114 [cit. 2017-04-18]. DOI: 10.1002/ffj.1863. ISSN 0882-5734. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ffj.1863/full>
- [7] VERMEULEN, Nico. Encyklopedie bylin a koření. Čestlice: Rebo Productions, 1999. 319 s. ISBN 8072340670.

- [8] SUTOUR, S., P. BRADESI, J. CASANOVA a F. TOMI. Composition and Chemical Variability of *Mentha suaveolens* ssp *suaveolens* and *M. suaveolens* ssp *insularis* from Corsica. *Chemistry & Biodiversity* [online]. 2010, 7(4), 1002-1008 [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20397217>
- [9] Obrázek: <https://s-media-cache-ak0.pinimg.com/originals/7a/e5/6a/7ae56a8394b972bbb104a56aeaa68c2f.jpg>
- [10] CLEVELY, A. M. a Katherine RICHMOND. *Velká kniha bylinek*. České vyd. 1. Praha: Svojtka & Co., 1998. 255 s. ISBN 8072371320.
- [11] MCVICAR, Jekka. *Byliny: Velká kniha bylinek*. B.v. Praha: Volvox Globator, 1997. 256 s. ISBN 8072070517.
- [12] Obrázek: [https://apps.rhs.org.uk/plantselectorimages/detail/WSY0035816\\_4135.jpg](https://apps.rhs.org.uk/plantselectorimages/detail/WSY0035816_4135.jpg)
- [13] PŘÍHODA, Antonín. *Léčivé rostliny*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1973. ISBN 07-016-73-04/38.
- [14] Obrázek: [http://www.meemelink.com/prints\\_images/21967.Mentha.jpg](http://www.meemelink.com/prints_images/21967.Mentha.jpg)
- [15] Obrázek: [http://gernot-katzers-spice-pages.com/pictures/ment\\_16.jpg](http://gernot-katzers-spice-pages.com/pictures/ment_16.jpg)
- [16] JIRÁSEK, Václav a František STARÝ. *Kapesní atlas léčivých rostlin*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. ISBN 14-573-85.
- [17] Obrázek: [https://www.ct-botanical-society.org/img/pics\\_m/menthaarve.jpg](https://www.ct-botanical-society.org/img/pics_m/menthaarve.jpg)
- [18] RECHTOVÁ, Christine. *Kuchyňské bylinky pěstované biologicky*. Praha: Svojtka a Vašut, 1996. ISBN 80-7180-050-3.
- [19] ELMASTAŞ, M., İ. TELCI, H. AKŞIT a R. ERENLER. Comparison of total phenolic contents and antioxidant capacities in mint genotypes used as spices / Baharat olarak kullanılan nane genotiplerinin toplam fenolik içerikleri ve antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması. *Turkish Journal of Biochemistry* [online]. 2015-01-1, 40(6), - [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1515/tjb-2015-0034. ISSN 1303-829x. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/284136629>
- [20] URIBE, E., D. MARÍN, A. VEGA-GÁLVEZ, I. QUISPE-FUENTES a A. RODRÍGUEZ. Assessment of vacuum-dried peppermint (*Mentha piperita* L.) as a source of natural antioxidants. *Food Chemistry* [online]. 2016, 190, 559-565 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.05.108. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26213010>

- [21] JANČA, Jiří. *Herbář léčivých rostlin*. 3. díl. 1. vyd. Praha: Eminent, 1996. 287 s. ISBN 8085876140.
- [22] ATANNASOVA, M., S. GEORGIEVA, K. IVANCHEVA. Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. 2011, 46 (1), 81-88. ISSN 1314-7471.
- [23] FATIHA, B., H. DIDIER, G. NAIMA, et al. Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products* [online]. 2015, 74, 722-730 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.04.038. ISSN 0926-6690. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015300467>
- [24] BUFALO, J., V.D. ZHELJAZKOV, Ch.L. CANTRELL, T. ASTATKIE, L. CIAMPA a E. JELIAZKOVA. Diurnal effects on spearmint oil yields and composition. *Scientia Horticulturae* [online]. 2015, 182, 73-76 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1016/j.scienta.2014.11.018. ISSN 0304-4238.
- [25] STANISAVLJEVIC, D., S. STOJICEVIC, S. DJORDJEVIC, B. ZLATKOVIC, D. VELICKOVIC, I. KARABEGOVIĆ a M. LAZIC. Antioxidant activity, the content of total phenols and flavonoids in the ethanol extracts of *Mentha longifolia* (L.) Hudson dried by the use of different techniques. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* [online]. 2012, 18(3), 411-420 [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.2298/CICEQ110919017S. ISSN 1451-9372. Dostupné z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=1451-93721200017S>
- [26] YADEGARINIA, D., L. GACHKAR, M.B. REZAEI, M. TAGHIZADEH, S.A. ASTANEH a I. RASOOLI. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry* [online]. 2006, 67(12), 1249-1255 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.04.025. ISSN 0031-9422. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942206002305>
- [27] RAI, Mahendra a Michael CHIKINDAS. *Natural antimicrobials in food safety and quality*. Wallingford: CABI, c2011, xiii, 368 s. ISBN 978-1-84593-769-0.

- [28] JANČA, Jiří. *Herbář léčivých rostlin*. 1. díl. 1. vyd. Praha: Eminent, 1994. ISBN 8085876027.
- [29] *1000 bylin*. České vyd. 1. Praha: Svojtka & Co., 2007. 336 s. ISBN 9788073526672.
- [30] ANTAL, T., A. FIGIEL, B. KERÉKES a L. SIKOLYA. Effect of Drying Methods on the Quality of the Essential Oil of Spearmint Leaves ( *Mentha spicata* L.). *Drying Technology* [online]. 2011, **29**(15), 1836-1844 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1080/07373937.2011.606519. ISSN 0737-3937. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373937.2011.606519>
- [31] BLAŽEK, Z., J. HUBÍK a M. KUČERA. *Léčivé rostliny ve sběru a kultuře*. 2. přeprac. a rozš. vyd. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1956, 454 s., 131 s. příl.
- [32] MAYER, Joachim. *Bylinky do kuchyně: více než 99 rad pro rychlé řešení problémů*. [Líbeznice]: Víkend, 2013. 124 s. Rychlý rádce. ISBN 9788074330704.
- [33] WEBB, Marcus A. *Bylinky: ilustrovaný průvodce*. 1. vyd. Praha: Fortuna Print, c2002. 192 s. ISBN 8073210096.
- [34] KREUTER, Marie-Luise. *Bylinky: nejlepší druhy a odrůdy: pěstování v souladu s přírodou, sklizeň, použití*. 1. vyd. Praha: Rebo, 2003. 95 s. Zahrada plus. ISBN 8072342770.
- [35] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. Vyd. 2. uprav. Tábor: OSSIS, 2002, 343 s. ISBN 808665902X.
- [36] BUŘIČOVÁ, L. a Z. RÉBLOVÁ. Czech Medicinal Plants as Possible Sources of Antioxidants. *Czech Journal of Food Sciences*. 2008, **26**(2), 132-138.
- [37] AGUIRRE, A. a R. BORNEO. Antioxidant Capacity of Medicinal Plants. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease* [online]. Elsevier, 2013, s. 527 [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1016/B978-0-12-397154-8.00011-7. ISBN 9780123971548. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123971548000117>
- [38] <https://www.merriam-webster.com/dictionary/antioxidant>
- [39] GRUNE, Tilman. *Oxidants and antioxidant defense systems*. Berlin: Springer, c2005, xii, 239 s. The handbook of environmental chemistry. Volume 2, Part 0, Reactions, processes. ISBN 3-540-22423-8.



- [40] DECKER, E., R.J. ELIAS a D. J. MCCLEMENTS. *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*. Oxford: Woodhead Publishing, 2010, 2 sv. (xxiv, 408 s.; xxi, 528 s.). Woodhead Publishing series in food science, technology and nutrition. ISBN 978-1-84569-648-1.
- [41] VELÍŠEK, Jan a Karel CEJPEK. *Biosynthesis of food components*. Tábor: OSSIS, 2008, xii, 497 s. ISBN 978-80-86659-12-1.
- [42] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. Vyd. 2. uprav. Tábor: OSSIS, 2002, 304 s. ISBN 8086659011.
- [43] CHRPOVÁ, D., L. KOUŘIMSKÁ, M.H. GORDON, V. HEŘMANOVÁ, I. ROUBÍČKOVÁ a J. PÁNEK. Antioxidant Activity of Selected Phenols and Herbs Used in Diets for Medical Conditions. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2010, **28**(4), 317-325 [cit. 2017-04-18]. ISSN 1212-1800. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/web/cjfs/>
- [44] PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ, H., TÁBORSKÁ, E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chem. Listy*. 2004, roč. 98, s. 174-179. ISSN 1213-7103.
- [45] FIDLER, M. a L. KOLÁŘOVÁ. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chem. Listy*. 2009, roč. 103, s. 232-235. ISSN 1213-7103.
- [46] DVOŘÁKOVÁ, M., P. DOSTÁLEK, P. HULÍN. Analytické stanovení polyfenolů ve sladínách, mladínách a pivech. *Kvasný Průmysl*. 2006, roč. 52, č. 4, s. 111-114. ISSN 0023-5830.
- [47] WROLSTAD, Ronald E. *Handbook of food analytical chemistry*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2005, 2 sv. ISBN 9780471709084.
- [48] STEVANATO, R., S. FABRIS a F. MOMO. New Enzymatic Method for the Determination of Total Phenolic Content in Tea and Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2004, **52**(20), 6287-6293 [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1021/jf049898s. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15453702>
- [49] NIELSEN, S. Suzanne. *Food analysis*. 3rd ed. New York: Springer, c2003, xiii, 557 s. Food science texts series. ISBN 0-306-47495-6.
- [50] ŠKROVÁNKOVÁ, S., J. MLČEK, J. SOCHOR, M. BAROŇ, J. KYNICKÝ a T. JURÍKOVÁ. Determination of Ascorbic Acid by Electrochemical Techniques and

- other Methods. *International Journal of Electrochemical Science* [online]. 2015, **10**(3), 2421-2431. ISSN 1452-3981. Dostupné z: <http://www.electrochemsci.org/>
- [51] KHALED-KHODJA, N., L. BOULEKBACHEM-MAKHLOUF, K. MADANI. Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*. 2014, **61**(11), 41-48.
- [52] YI, W., H.Y. WETZSTEIN. Effects of Drying and Extraction Conditions on the Biochemical Activity of Selected Herbs. *HortScience*. 2011, **46**(1), 70-73. ISSN 0018-5345
- [53] DYAB, A.S., A.M. ALY a H. I. MATUK. Enhancement and Evaluation of Peppermint (*Mentha Piperita* L.) Beverage. *International Journal of Life Sciences Research* [online]. 2015, **3**(1), 175-185 [cit. 2017-04-18]. ISSN 2348-3148. Dostupné z: [www.researchpublish.com](http://www.researchpublish.com)
- [54] TELCI, I., I. DEMIRTAS, E. BAYRAM, O. ARABACI a O. KACAR. Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products* [online]. 2010, **32**(3), 588-592 [cit. 2017-04-18]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2010.07.009. ISSN 09266690. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669010001871>
- [55] CAPECKA, E., A. MARECZEK a M. LEJA. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chemistry* [online]. 2005, **93**(2), 223-226 [cit. 2017-04-18]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.09.020. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460400737X>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

DPPH	Difenylpikrylhydrazyl
ABTS	2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	Ultraviolet-visible
$O_2^{\cdot -}$	Superoxidový radikál.
$\cdot OH$	Hydroxylový radikál.
$ROO\cdot$	Peroxylový radikál.
BHA	Butylhydroxyanisol.
BHT	Butylhydroxytoluen.
ArOH	Fenolové sloučeniny
$RO\cdot$	Alkoxylový radikál
$ArO\cdot$	Fenoxylový radikál
ROOH	Hydroperoxid
ROH	Alkohol
TBHQ	Tercbutylhydrochinon
$^1O_2$	Singletový kyslík
$ABTS^{\cdot +}$	Kation radikál 2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
$H_2O_2$	Peroxid vodíku
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
DPPH-H	Difenylpikrylhydrazin
DAD	Detektor s diodovým polem
MS	Hmotnostní detektor
CGC	Kapilární plynová chromatografie

---

PC	Papírová chromatografie
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
DTT	Dithiotreitol
KA	Kyselina askorbová
KG	Kyselina gallová
AA	Antioxidační aktivita
EtOH	Etanol
MetOH	Metanol
TPC	Total phenol content
N.D.	Nedetkováno

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1 Máta vonná [9] .....	13
Obr. 2 Máta klasnatá [12] .....	14
Obr. 3 Máta peprná [14, 15] .....	15
Obr. 4 Máta rolní [17] .....	15
Obr. 5 Kalibrační křivka KA pro rozpouštědlo voda .....	50
Obr. 6 Porovnání účinnosti použitých rozpouštědel v rámci metody DPPH .....	51
Obr. 7 Výsledky AA stanovené metodou DPPH vodných extraktů z čerstvé a skladované máty .....	52
Obr. 8 Výsledky AA stanovené metodou DPPH etanolových extraktů z čerstvé .....	53
Obr. 9 Výsledky AA stanovené metodou DPPH metanolových extraktů z čerstvé .....	53
Obr. 10 Výsledky AA stanovené pomocí DPPH u extraktů ze sušených vzorků máty, při .....	55
Obr. 11 Výsledky AA stanovené pomocí DPPH u extraktů ze sušených vzorků máty, při .....	55
Obr. 12 Výsledky AA pomocí DPPH extraktů z mražených vzorků máty .....	58
Obr. 13 Vliv úpravy vzorku na AA stanovenou pomocí DPPH u vodných extraktů .....	59
Obr. 14 Vliv úpravy vzorku na AA stanovenou pomocí DPPH u etanolových extraktů .....	60
Obr. 15 Vliv úpravy vzorku na AA stanovenou pomocí DPPH u metanolových extraktů .....	61
Obr. 16 Kalibrační křivka troloxu .....	62
Obr. 17 Porovnání účinnosti rozpouštědel v rámci metody ABTS .....	63
Obr. 18 Výsledky AA stanovené metodou ABTS vodných extraktů z čerstvé a sklad- .....	64
Obr. 19 Výsledky AA stanovené metodou ABTS etanolových extraktů z čerstvé a sklad- .....	65
Obr. 20 Výsledky AA stanovené metodou ABTS metanolových extraktů z čerstvé a skla- .....	65
Obr. 21 Výsledky AA stanovené metodou ABTS extraktů ze sušených vzorků máty .....	66

Obr. 22 Výsledky AA stanovené metodou ABTS extraktů ze sušených vzorků máty .....	67
Obr. 23 Výsledky AA stanovované metodou ABTS u extraktů z mražených .....	69
Obr. 24 Porovnání vlivu úprav vzorku na AA metodou ABTS u vodných extraktů .....	70
Obr. 25 Porovnání vlivu úprav vzorku na AA metodou ABTS u etanolových extraktů .....	71
Obr. 26 Porovnání vlivu úprav vzorku na AA metodou ABTS u metanolových extraktů.....	72
Obr. 27 Kalibrační křivka KG pro rozpouštědlo voda .....	73
Obr. 28 Porovnání účinnosti testovaných rozpouštědel v rámci stanovení TPC .....	74
Obr. 29 Výsledky TPC u vodných extraktů z čerstvé a skladované máty .....	75
Obr. 30 Výsledky TPC u etanolových extraktů z čerstvé a skladované máty.....	76
Obr. 31 Výsledky TPC u metanolových extraktů z čerstvé a skladované máty.....	76
Obr. 32 Výsledky TPC u extraktů ze sušených vzorků máty při 25 °C/24 hodin....	78
Obr. 33 Výsledky TPC u extraktů ze sušených vzorků máty při 50 °C/8 hodin.....	78
Obr. 34 Výsledky TPC extraktů z mražené máty.....	80
Obr. 35 Porovnání vlivu úprav vzorku máty na TPC u vodných extraktů .....	81
Obr. 36 Porovnání vlivu úprav vzorku máty na TPC u etanolových extraktů .....	82
Obr. 37 Porovnání vlivu úprav vzorku máty na TPC u metanolových extraktů .....	83
Obr. 38 Závislost AA na TPC pro vodné extrakty z čerstvých vzorků máty.....	84
Obr. 39 Závislost AA na TPC pro etanolové extrakty z čerstvých vzorků máty .....	84
Obr. 40 Závislost AA na TPC pro metanolové extrakty z čerstvých vzorků.....	85
Obr. 41 Závislost AA na TPC pro vodné extrakty ze sušených vzorků.....	85
Obr. 42 Závislost AA na TPC pro vodné extrakty z mražených vzorků máty.....	86
Obr. 43 Závislost AA na TPC pro etanolové extrakty z mražených vzorků máty...86	
Obr. 44 Kalibrační křivka kyseliny gallové .....	88
Obr. 45 Kalibrační křivka kyseliny askorbové.....	96
Obr. 46 Obsah KA ve vzorcích čerstvé máty .....	97
Obr. 47 Chromatogram stanovení fenolických sloučenin pomocí HPLC-DAD u metanolového extraktu z čerstvé máty vzorku 7.....	116
Obr. 48 Chromatogram stanovení KA (vitaminu C) pomocí HPLC-DAD u extraktu z čerstvé máty vzorku 6 .....	117

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1 Testované vzorky .....	37
Tab. 2 Složení mobilních fází během gradientové eluce.....	47
Tab. 3 Vlhkost a sušina vzorků máty .....	49
Tab. 4 Rovnice regrese kalibračních křivek KA pro .....	51
Tab. 5 Rovnice regrese kalibračních křivek KG pro .....	74
Tab. 6 Hodnoty korelačních faktorů pro .....	86
Tab. 7 Hodnoty korelačních faktorů pro .....	87
Tab. 7 Hodnoty korelačních faktorů pro .....	87
Tab. 9 Rovnice regrese kalibračních křivek stanovovaných fenolických sloučenin	89
Tab. 10 Výsledky stanovení polyfenolických látek vodných extraktů máty.....	91
Tab. 11 Výsledky stanovení polyfenolických látek v etanolových extraktech máty pomocí HPLC-DAD .....	112
Tab. 12 Výsledky stanovení polyfenolických látek v metanolových extraktech máty pomocí HPLC-DAD .....	113
Tab. 13 Výsledky stanovení polyfenolických látek ve směsných (voda + etanol) extraktech máty pomocí HPLC-DAD.....	114
Tab. 14 Výsledky stanovení polyfenolických látek ve směsných (voda + metanol) extraktech máty pomocí HPLC-DAD.....	115

**SEZNAM PŘÍLOH**

- P I: Výsledky stanovení vybraných polyfenolů u etanolových extraktů máty
- P II: Výsledky stanovení vybraných polyfenolů u metanolových extraktů máty
- P III: Výsledky stanovení vybraných polyfenolů u směsných (voda + etanol) extraktů máty
- P IV: Výsledky stanovení vybraných polyfenolů u směsných (voda + metanol) extraktů máty
- P V: Vzorový chromatogram stanovení fenolických sloučenin pomocí HPLC-DAD u vzorku máty peprné 7
- P VI: Vzorový chromatogram stanovení kyseliny askorbové (vitaminu C) vzorku máty peprné 6



# PŘÍLOHA P I: VÝSLEDKY STANOVENÍ VYBRANÝCH POLYFENOLŮ U ETANOLOVÝCH EXTRAKTŮ MÁTY

Vzorek	1		2		3		4		5		6		7	
	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s
PP	N.D.		2,32		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Kyselina 4-hydroxybenzoová	8,62	1,41	N.D.		34,38	1,04	N.D.		N.D.		56,07	5,95	14,58	0,18
Katechin	N.D.		N.D.		5,89	0,05	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Kyselina chlorogenová	51,88	0,05	14,63		7,21	1,13	N.D.		11,00	0,16	N.D.		N.D.	
Kyselina vanilová	N.D.		39,15		32,54	3,38	N.D.		N.D.		N.D.		9,88	0,03
Epikatechin	N.D.		2,42		0,88	0,04	N.D.		N.D.		0,78	0,01	0,68	0,06
Kyselina trans-p-kumarová	N.D.		1,04		5,21	0,31	N.D.		N.D.		N.D.		3,18	0,29
Kyselina ferulová	2062,54	100,81	4449,09		15618,90	230,87	N.D.		N.D.		60,36	0,31	582,14	10,31
Rutin	1705,62	94,65	4306,88		2486,79	53,84	14,14	3,56	33,82	0,50	2158,98	9,05	919,67	2,79
Kyselina trans-hydroxyskořicová	62,91	0,76	1020,74		219,43	17,92	16,42	1,97	15,32	0,29	679,21	0,25	297,14	14,82
Eylester kyseliny protokatechové	25,26	0,56	177,79		49,58	0,64	N.D.		N.D.		5,56	0,47	3,98	0,01
Resveratrol	45,46	7,49	12,06		61,89	3,51	8,70	0,50	15,80	0,66	74,97	0,79	10,11	0,07
Kyselina trans-skořicová	N.D.		3,83		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Kempferol	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		16,63	1,14	N.D.	
Kvercetin	N.D.		42,96		48,97	1,45	N.D.		N.D.		N.D.		177,89	0,54

Výsledky stanovení polyfenolických látek v etanolových extraktech máty

N.D. – nedetekováno  
s – směrodatná odchylka [ug/g]

## PŘÍLOHA P II: VÝSLEDKY STANOVENÍ VYBRANÝCH POLYFENOLŮ U METANOLOVÝCH EXTRAKTŮ MÁTY

Vzorek	1		2		3		4		5		6		7	
	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s
PP	N.D.		N.D.		N.D.		5,10	0,62	N.D.		N.D.		N.D.	
Kyselina neochlorogenová	N.D.		1,88	0,42	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Kyselina 4-hydroxybenzoová	N.D.		N.D.		60,59	2,591	N.D.		N.D.		158,21	0,34	N.D.	
Katechin	N.D.		N.D.		6,06	0,278	10,86	1,05	30,27	0,62	N.D.		N.D.	
Kyselina chlorogenová	N.D.		14,05	0,02	7,27	0,333	N.D.		N.D.		32,95	2,28	N.D.	0,98
Kyselina vanilová	N.D.		57,11	1,92	37,50	0,716	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Epikatechin	N.D.		0,77	0,02	1,41	0,023	N.D.		N.D.		2,02	0,13	4,84	0,00
Kyselina trans-p-kumarová	N.D.		2,33	0,01	25,42	1,055	2,09	0,06	14,55	0,04	1,80	0,08	73,93	0,87
Kyselina ferulová	613,18	82,22	4376,60	18,11	9768,83	61,960	N.D.		N.D.		105,14	2,95	2017,79	6,46
Kyselina sinapová	735,23	21,01	5690,36	40,49	2631,00	11,466	40,63	1,05	21,36	1,12	2604,79	13,62	1683,26	17,47
Rutin	31,55	4,75	1581,26	11,61	391,53	12,709	24,01	1,41	11,27	0,18	1235,51	10,36	610,57	8,47
Kyselina trans-hydroxykoičová	202,21	4,86	15,81	0,99	78,93	1,287	N.D.		N.D.		13,23	0,17	5,07	0,83
Eylester kyseliny protokatechové	N.D.		42,68	2,71	31,04	3,882	11,74	1,95	10,46	0,82	196,94	1,75	147,83	5,50
Resveratrol	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		18,55	0,04	N.D.	
Kempferol	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Kvercetin	12,39	0,05	22,87	1,00	119,89	5,828	7,49	0,09	1,52	0,02	N.D.		224,81	3,60

Výsledky stanovení polyfenolických látek v metanolových extraktech máty pomocí HPLC-DAD

N.D. – nedetekováno

s – směrodatná odchylka [μg/g]

**PŘÍLOHA P III: VÝSLEDKY STANOVENÍ VYBRANÝCH  
POLYFENOLŮ U SMĚSNÝCH (VODA + ETANOL) EXTRAKTŮ  
MÁTY**

stanovení polyfenolických látek ve směsných (voda + etanol) extraktech máty pomocí HPLC-

Vzorek	1		2		3		4		5		6		7	
	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s
PP	266,69	18,88	106,48	2,02	N.D.		33,09	0,42	12,23	0,94	13,64	1,51	36,84	1,51
Kyselina neochlorogenová	1635,61	22,29	69,55	0,09	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		15,09	0,18
Epigallocatechin	6,78	6,38	N.D.		84,15	0,97	8,43	1,64	N.D.		170,76	6,00	46,25	6,26
Katechin	N.D.		N.D.		18,96	2,31	64,09	4,79	30,41	0,06	N.D.		13,91	0,39
Kyselina chlorogenová	61,50	10,98	53,22	1,84	55,11	1,20	N.D.		59,42	0,47	88,63	1,03	73,39	1,46
Kyselina vanilová	N.D.		N.D.		0,61	0,09	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Kyselina kávová	N.D.		2,82	0,25	4,24	0,12	N.D.		N.D.		2,93	0,15	2,09	0,15
Kyselina syringová	N.D.		52,37	3,43	40,24	1,49	4,30	0,37	16,61	2,97	140,47	2,18	34,21	0,91
Epikatechin	N.D.		8,13	0,32	1,60	0,06	0,99	0,22	0,82	0,13	3,34	0,10	1,41	0,05
Kyselina trans-p-kumarová	15,21	0,06	1,74	0,20	24,77	0,08	N.D.		3,36	0,14	1,92	0,04	166,27	1,36
Kyselina ferulová	642,98	21,79	4046,74	5,61	17888,02	41,54	N.D.		N.D.		54,91	0,51	3778,40	28,35
Kyselina sinapová	724,58	24,23	5240,70	33,84	2730,75	1,45	20,24	0,38	29,00	0,05	1755,31	8,58	1676,50	17,35
Rutin	59,66	7,43	2045,96	21,72	492,32	31,65	19,41	0,15	9,50	0,30	1019,24	2,99	614,61	20,52
Kyselina trans-hydroxyskorčivá	9,40	0,03	27,87	0,61	69,88	2,19	N.D.		N.D.		10,14	0,22	49,74	3,83
Etylfester kyseliny protokatechové	56,65	1,94	309,89	10,51	18,00	0,34	15,37	0,47	24,21	1,63	132,11	2,54	36,43	1,78
Resveratrol	N.D.		5,16	0,03	N.D.		1,93	0,10	N.D.		N.D.		N.D.	
Kyselina trans-skorčivá	N.D.		10,89	0,63	N.D.		N.D.		N.D.		10,39	0,09	3,59	0,05
Kempferol	21,13	1,14	N.D.		269,71	3,41	5,25	0,25	N.D.		6,16	0,50	45,86	1,86
Kvercetin														

N.D. – nedetekováno

s – směrodatná odchylka [ug/g]

**PŘÍLOHA P IV: VÝSLEDKY STANOVENÍ VYBRANÝCH  
POLYFENOLŮ U SMĚSNÝCH (VODA + METANOL) EXTRAKTŮ  
MÁTY**

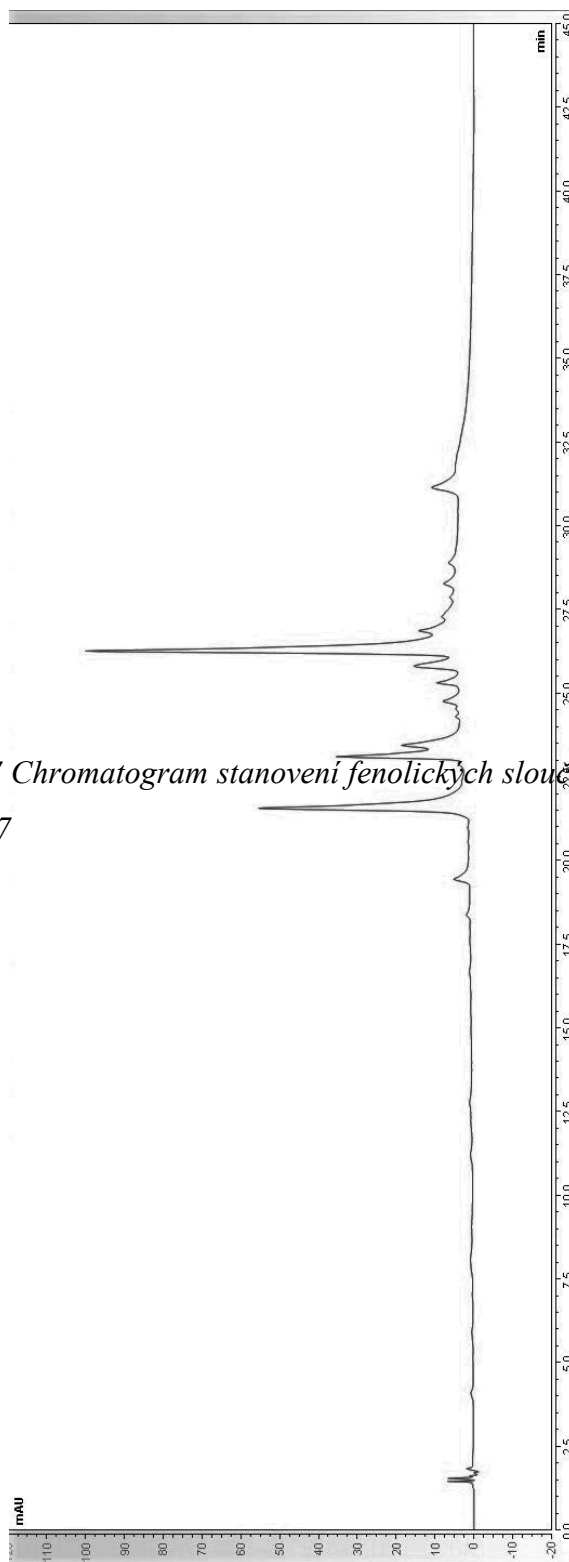
Vzorek	1		2		3		4		5		6		7	
	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s	Obsah [ug/g]	s
PP														
Kyselina neochlorogenová	562,50	8,64	98,40	0,28	65,28	2,17	63,32	0,14	15,20	0,32	20,89	0,43	39,67	0,18
Kyselina 4-hydroxybenzoová	N.D.		8,17	0,98	10,77	0,03	0,73	0,01	N.D.		4,81	0,21	N.D.	
Epigallocatechin	1779,29	16,60	17,67	2,51	N.D.		N.D.		N.D.		18,62	0,03	11,39	0,44
Katechin	16,09	0,74	N.D.		N.D.		4,51	1,42	N.D.		237,13	0,85	43,52	2,53
Kyselina chlorogenová	28,35	4,58	N.D.		10,46	0,45	101,12	9,86	20,50	1,03	N.D.		N.D.	
Kyselina vanilová	282,57	0,86	63,82	4,46	121,69	1,23	N.D.		29,27	0,98	590,86	1,41	109,13	4,17
Kyselina kávová	N.D.		N.D.		1,21	0,05	N.D.		N.D.		2,36	0,06	N.D.	
Kyselina syringová	3,10	0,06	5,38	0,31	9,10	0,25	3,68	0,03	N.D.		125,56	0,93	9,01	0,47
Epikatechin	N.D.		44,12	0,95	39,64	0,01	3,05	0,01	N.D.		320,17	0,83	20,70	2,55
Kyselina trans-p-kumarová	N.D.		0,82	0,04	1,03	0,03	0,80	0,07	0,96	0,01	1,93	0,06	0,95	0,02
Kyselina ferulová	56,81	2,24	2,53	0,15	29,58	0,22	N.D.		13,22	1,36	19,02	0,18	105,18	0,03
Kyselina sinapová	990,25	9,07	3822,52	11,92	11930,78	58,58	N.D.		N.D.		131,04	1,00	6078,45	33,63
Rutin	686,46	2,68	4070,14	6,31	1730,68	0,71	9,98	0,20	6,21	0,39	1804,77	11,26	1668,05	11,12
Kyselina trans-hydroxykoičová	60,32	0,48	1517,12	2,59	407,15	17,51	11,25	0,50	6,82	0,25	1097,96	1,33	458,97	14,21
Eylester kyseliny protocatechové	42,60	1,33	59,15	0,33	78,91	0,70	N.D.		N.D.		44,71	1,53	190,49	3,44
Resveratrol	41,49	0,63	4,81	0,24	275,52	2,43	10,85	0,55	18,01	1,18	192,96	1,29	7,22	0,18
Kyselina trans-skořicová	N.D.		7,80	0,26	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Kempferol	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		9,77	0,99	N.D.	
Kvercetin	6,01	0,48	N.D.		N.D.		2,63	0,22	N.D.		7,18	0,28	3,24	0,20

Stanovení polyfenolických látek ve směsných (voda + metanol) extraktech máty pomocí HPLC-

N.D. – nedetekováno

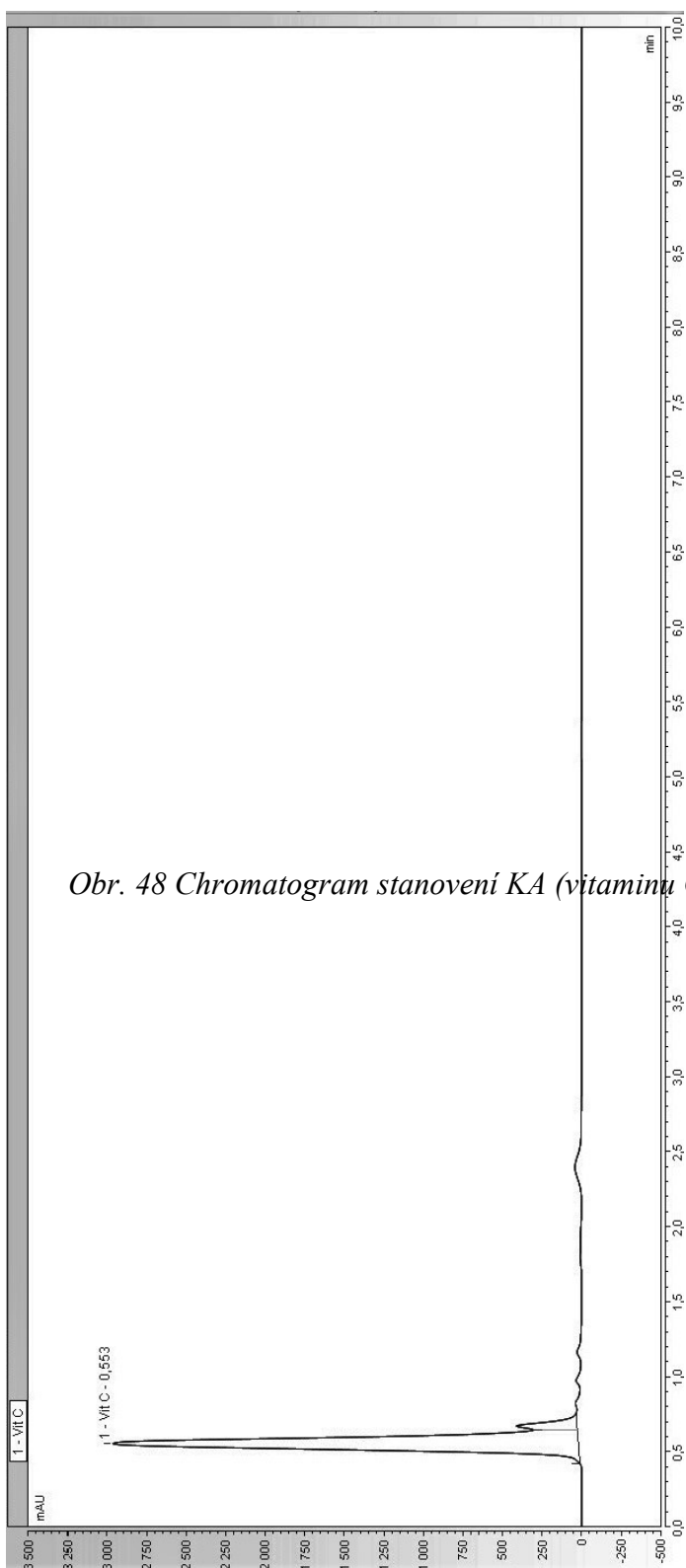
s – směrodatná odchylka [μg/g]

**PŘÍLOHA P V: VZOROVÝ CHROMATOGRAM STANOVENÍ  
FENOLICKÝCH SLOUČENIN POMOCÍ HPLC-DAD U VZORKU  
MÁTY PEPRNÉ 7**



*Obr. 47 Chromatogram stanovení fenolických sloučenin pomocí HPLC-DAD u met vzorku 7*

**PŘÍLOHA P VI: VZOROVÝ CHROMATOGRAM ZE STANOVENÍ  
Kyseliny askorbové (vitaminu C) vzorku máty  
peprné 6**



*Obr. 48 Chromatogram stanovení KA (vitaminu C) pomocí HPLC-DAD u*