

Antioxidační aktivita a obsah polyfenolů v extraktech šalvěje a heřmánku

Ing. Karolína Jurová

Diplomová práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Karolína Jurová
Osobní číslo: T23451
Studijní program: N0711A130011 Biomateriály a kosmetika
Forma studia: Kombinovaná
Téma práce: Antioxidační aktivita a obsah polyfenolů v extraktech šalvěje a heřmánku

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

Charakteristika šalvěje a heřmánku, jejich složení, vlastnosti.

Popis antioxidantů, zástupci, zdroje a působení.

Přehled metod využívaných pro stanovení obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity.

II. Praktická část:

Spektrofotometrické stanovení celkového obsahu polyfenolů extraktů šalvěje a heřmánku s různými podmínkami extrakce.

Stanovení antioxidační aktivity extraktů šalvěje a heřmánku s různými podmínkami extrakce pomocí spektrometrických metod.

Stanovení vybraných fenolických sloučenin v extraktech šalvěje a heřmánku metodou HPLC s UV detekcí.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Poullos, E., Giaginis, C., Vasios, G.K. Current State of the Art on the Antioxidant Activity of Sage (*Salvia* spp.) and Its Bioactive Components. *Planta Med* 2020; 86(04): 224-238. doi: 10.1055/a-1087-8276.
- [2] Walch, S.G., Tinzoh, L.N., Zimmermann, B.F., Stühlinger, W., Lachenmeier, D.W. Antioxidant Capacity and Polyphenolic Composition as Quality Indicators for Aqueous Infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). *Front Pharmacol.* 2011, 2, 79. doi: 10.3389/fphar.2011.00079.
- [3] Velíšek, J., Hajšlová, J. *Chemie potravin II*. Tábor: Osis, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [4] Nóbrega, A. T., Wagemaker, T. A. L., Maia Campos, P. M. B. G. Antioxidant activity of *Matricaria chamomilla* L. extract and clinical efficacy of cosmetic formulations containing this extract and its isolated compounds. *Biomed. Biopharm. Res.* 2013, 10, 2, 249-261.

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

Datum zadání diplomové práce: **10. února 2025**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení diplomové práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou práci – nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá; neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji, že

- jsem na diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Teoretická část této diplomové práce byla věnována popisu šalvěže lékařské (*Salvia officinalis*) a heřmánku pravého (*Matricaria chamomilla*). Popsána byla jejich charakteristika, chemické složení, využití a antioxidační účinky. Dále byly v teoretické části popsány antioxidanty a jednotlivé metody používané pro kvantifikaci celkového obsahu polyfenolů a stanovení antioxidační aktivity. Praktická část práce byla zaměřena na přípravu etanolvých, metanolvých a vodných extraktů ze zkoumaných rostlin. Následně byly tyto extrakty podrobeny analýze s cílem stanovit obsah celkových polyfenolů a antioxidační aktivitu. Celkový obsah polyfenolů byl kvantifikován spektrofotometricky s použitím Folin-Ciocalteuova činidla. Pro detailnější analýzu extraktů byly jednotlivé fenolické látky stanovené pomocí techniky HPLC s DAD detekcí. Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí dvou spektrofotometrických metod, konkrétně s použitím ABTS a DPPH.

Klíčová slova: heřmánek, šalvěj, extrakty, polyfenoly, antioxidační aktivita

ABSTRACT

The theoretical part of this diploma thesis was devoted to the description of sage (*Salvia officinalis*) and chamomile (*Matricaria chamomilla*). Their characteristics, chemical composition, usage and antioxidant effects were described. Furthermore, the theoretical part describes the antioxidants and the different methods used for the quantification of total polyphenol content and determination of antioxidant activity. The practical part was focused on the preparation of ethanolic, methanolic and aqueous extracts of the plants studied. Subsequently, these extracts were subjected to analysis to determine the total polyphenol content and antioxidant activity. The total polyphenol content was quantified spectrophotometrically using Folin-Ciocalteu reagent. For a more detailed analysis of the extracts, individual phenolic substances were determined using HPLC with DAD detection. The antioxidant activity was determined by two spectrophotometric methods, using ABTS and DPPH.

Keywords: chamomile, sage, extracts, polyphenols, antioxidant activity

Na tomto místě bych ráda poděkovala paní doc. Ing. Soni Škrovánkové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady a konstruktivní připomínky, které mi poskytla v průběhu vypracování této diplomové práce. Mé poděkování patří také paní laborantce Renatě Zelinové za pomoc v laboratoři a paní Ing. Lence Fojtíkové za odbornou asistenci při vyhodnocování dat z HPLC.

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

OBSAH

ÚVOD.....	13
I TEORETICKÁ ČÁST	14
1 ŠALVĚJ LÉKAŘSKÁ	15
1.1 CHARAKTERISTIKA.....	15
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ.....	16
1.3 VYUŽITÍ	16
1.4 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA	17
1.4.1 Kyselina rozmarýnová	17
1.4.2 Kyselina karnosová a karnosol.....	18
2 HEŘMÁNEK PRAVÝ	20
2.1 CHARAKTERISTIKA.....	20
2.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ.....	21
2.3 VYUŽITÍ	21
2.4 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA	21
2.4.1 Apigenin.....	22
2.4.2 Luteolin	23
2.4.3 Kvercetin	24
2.4.4 Rutin.....	24
2.4.5 Kyselina chlorogenová.....	25
2.4.6 Kyselina kávová	26
3 ANTIOXIDANTY	27
4 STANOVENÍ OBSAHU POLYFENOLŮ.....	28
4.1 STANOVENÍ OBSAHU POLYFENOLŮ METODOU HPLC S UV DETEKCÍ.....	28
4.2 STANOVENÍ OBSAHU POLYFENOLŮ POMOCÍ FOLIN-CIOCALTEUOVA ČINIDLA.....	29
5 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	31
5.1 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POMOCÍ DPPH	32
5.2 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POMOCÍ ABTS	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
6 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	34
7 MATERIÁL, CHEMIKÁLIE, POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	35
7.1 MATERIÁL.....	35
7.2 CHEMIKÁLIE.....	36
7.3 POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	37
8 METODIKA STANOVENÍ.....	38
8.1 PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ	38

8.2	STANOVENÍ OBSAHU POLYFENOLŮ POMOCÍ HPLC/DAD	38
8.2.1	Kalibrační křivky standardů polyfenolických látek	39
8.3	STANOVENÍ OBSAHU POLYFENOLŮ POMOCÍ FOLIN-CIOCALTEUOVA ČINIDLA	41
8.3.1	Kalibrační křivka kyseliny gallové.....	41
8.4	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POMOCÍ DPPH	42
8.4.1	Kalibrační křivka troloxu (DPPH)	43
8.5	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POMOCÍ ABTS	44
8.5.1	Kalibrační křivka troloxu (ABTS)	45
9	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
9.1	STANOVENÍ OBSAHU JEDNOTLIVÝCH POLYFENOLICKÝCH LÁTEK VE VYBRANÝCH EXTRAKTECH Z ŠALVĚJE A HEŘMÁNKU POMOCÍ HPLC/DAD	47
9.2	STANOVENÍ OBSAHU CELKOVÝCH POLYFENOLŮ POMOCÍ FOLIN- CIOCALTEUOVA ČINIDLA	51
9.2.1	Stanovení obsahu celkových polyfenolů v extraktech z čerstvé šalvěje lékařské.....	51
9.2.2	Stanovení obsahu celkových polyfenolů v extraktech ze sušené šalvěje lékařské.....	52
9.2.3	Stanovení obsahu celkových polyfenolů v extraktech ze sušeného heřmáнку pravého	54
9.3	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POMOCÍ DPPH	56
9.3.1	Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH v extraktech z čerstvé šalvěje lékařské.....	56
9.3.2	Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH v extraktech ze sušené šalvěje lékařské.....	57
9.3.3	Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH v extraktech ze sušeného heřmáнку pravého	59
9.4	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POMOCÍ ABTS	60
9.4.1	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS v extraktech z čerstvé šalvěje lékařské.....	61
9.4.2	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS v extraktech ze sušené šalvěje lékařské.....	62
9.4.3	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS v extraktech ze sušeného heřmáнку pravého	63
	ZÁVĚR.....	66
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	76
	SEZNAM OBRÁZKŮ	78
	SEZNAM TABULEK.....	79

ÚVOD

Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*) z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*) a heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*) z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*) jsou léčivé rostliny, které jsou známy již po staletí svými příznivými účinky na lidský organismus. Obě tyto rostliny vykazují protizánětlivé, zklidňující a antibakteriální účinky. Šalvěj pomáhá při trávicích potížích, od revmatických problémů a má vliv na kognitivní funkce. Heřmánek se využívá při žaludečních potížích, podporuje klidný spánek a urychluje hojení ran. Jejich farmakologické účinky jsou dány přítomností celé škály biologicky aktivních látek.

Obě rostliny mají také antioxidační účinky. Antioxidanty jsou látky, které mají schopnost neutralizovat volné radikály, které mohou poškozovat buněčné struktury. Za antioxidační aktivitu šalvěje jsou zodpovědné složky jako jsou fenolické kyseliny, kyselina rozmarýnová a karnosová, dále terpenoidy nebo oligomery kyseliny kávové. U heřmánku je antioxidační aktivita spjata s přítomností flavonoidů včetně kvercetinu, luteolinu, apigeninu a rutinu a také s přítomností hydroxyskořicových kyselin.

K významným antioxidačním složkám těchto rostlin patří polyfenoly. Nejpoužívanější metodou pro kvantifikaci obsahu celkových polyfenolů je stanovení pomocí Folin-Ciocalteuova činidla, kdy dochází k reakci polyfenolů s tímto činidlem za tvorby modrého komplexu, kterého intenzita se měří spektrofotometricky. Pro stanovení jednotlivých fenolických látek, které přispívají k antioxidační aktivitě těchto rostlin, lze využít techniku HPLC/DAD. Jde o pokročilejší techniku pro stanovení polyfenolů, která umožňuje separaci jednotlivých polyfenolických sloučenin na základě jejich odlišné afinity k mobilní a stacionární fázi, s následnou DAD detekcí.

Stanovení antioxidační aktivity lze provést celou řadou metod, což je dáno existencí několika mechanismů, kterými mohou antioxidanty působit. Metody měření antioxidační aktivity lze rozdělit na ty, které hodnotí schopnost látek vychytávat volné radikály (s využitím činidel ABTS a DPPH) se spektrometrickým stanovením a ty, které se zaměřují na redoxní vlastnosti látek (FRAP).

I TEORETICKÁ ČÁST

1 ŠALVĚJ LÉKAŘSKÁ

1.1 Charakteristika

Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*) je aromatická bylina s léčivými účinky, která spadá do čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Jedná se o vytrvalý, celoročně zelený polokeř dorůstající do výšky až 60 cm. Pochází z oblasti Blízkého východu a Středomoří a nyní je rozšířena po celém světě, zejména v Evropě a Severní Americe. Jejími charakteristickými znaky jsou řapíkaté, podlouhlé listy s členitým povrchem a modrofialové květy kvetoucí v letním období. Plody jsou hnědě zbarvené tvrdky kulovitého tvaru. Šalvěji se nejlépe daří v suchém a slunném prostředí. Venkovní výsev se doporučuje provádět nejdříve v květnu. Rostlinu lze později rozmnožovat řízkováním nebo dělením trsů. Období květu šalvěje lékařské se může lišit v závislosti na místních podmínkách, obvykle však vykvétá od března do července. Ideální dobou pro sklizeň je léto, kdy rostlina obsahuje nejvíce esenciálního oleje (0,43 %), což je klíčové pro jeho komerční využití. Pro zachování cenných látek obsažených v biomase je důležité její správné usušení. Toho lze dosáhnout dvěma způsoby: sušením ve stínu nebo sušením mrazem (lyofilizací) [1; 2; 3; 4; 5].



Obr. 1: Šalvěj lékařská [6]

1.2 Chemické složení

Šalvěj obsahuje široké spektrum fytochemikálií, včetně alkaloidů, sacharidů (arabinóza, galaktóza, glukóza), mastných kyselin, glykosidových derivátů (saponiny), fenolických sloučenin (flavonoidy jako apigenin a kvercetin, kumariny), polyacetylenů, steroidů, terpenů (linalool, limonen)/terpenoidů a vosků. Obsah těchto látek se v různých částech rostliny liší. Linalool je nejvíce zastoupen ve stonku, zatímco květy se vyznačují vysokým obsahem α -pinenu a cineolu. Listy jsou bohaté na bornylacetát, kamfen, kafr, humulen, limonen a thujon. Podobně jako u jiných bylin, i chemické složení *S. officinalis* je ovlivněno prostředím, ve kterém roste. Faktory jako klima či dostupnost vody mohou významně ovlivnit koncentraci jednotlivých fytochemikálií v rostlině [3; 7].

Ilić a kol. [8] provedli analýzu chemického složení esenciálních olejů šalvěje, jejímž cílem bylo porovnat obsah chemických látek mezi planě rostoucí a pěstovanou šalvějí. Výsledky ukázaly rozdíly v zastoupení jednotlivých složek. U planě rostoucí šalvěje dominoval cis-thujon (43,2 %), následovaný kafrem (17,6 %), 1,8-cineolem (13,8 %), veridiflorolem (3,8 %) a borneolem (3,4 %). U pěstované šalvěje se pořadí hlavních složek změnilo, přičemž nejvyšší zastoupení měl kafr, následovaný cis-thujonem a 1,8-cineolem [8].

1.3 Využití

Šalvěj je celosvětově uznávána pro své léčivé účinky, což odráží i její latinský název „*Salvia*“, který znamená „léčivý“. Nadzemní části této rostliny se tradičně využívají k úlevě od revmatických projevů či dny. Dále pomáhá při trávicích potížích, jako jsou žaludeční vředy, pálení žáhy a obtíží s dýchacími cestami, včetně bolesti v krku. Šalvěj je spojována s pozitivním vlivem na kognitivní funkce, které se s věkem často zhoršují. Pro svou vůni je oblíbenou složkou parfémů a kosmetických produktů. Díky svému výraznému aroma a schopnosti dochutit pokrmy se hojně využívá i v gastronomii. Nové studie odhalily, že *S. officinalis* má mnohem širší spektrum farmakologických účinků včetně protizánětlivých, antinociceptivních, antioxidačních, antimutagenních, antimikrobiálních, hypolipidemických a hypoglykemických [3; 5; 9].

1.4 Antioxidační aktivita

Šalvěj lékařská je známá svými silnými antioxidačními účinky, které ji řadí mezi účinné léčivé rostliny. Původně byly za hlavní nositele těchto vlastností považovány kyselina rozmarýnová a karnosová. Nicméně, novější výzkumy odhalily, že šalvěj obsahuje mnohem širší škálu látek vykazující antioxidační aktivitu. Patří mezi ně terpenoidy, flavonoidy a různé fenolové kyseliny, například oligomery kyseliny kávové, včetně kyselin salvianolových a yunanových. Antioxidační síla flavonoidů v šalvěji se liší. Nejvyšší antioxidační aktivitu (AA) mají 6-hydroxyluteolin 7-glykosidy, následované luteolin-7-glykosidy, luteolin-30-glykosidy a apigeninovými glykosidy [10; 11].

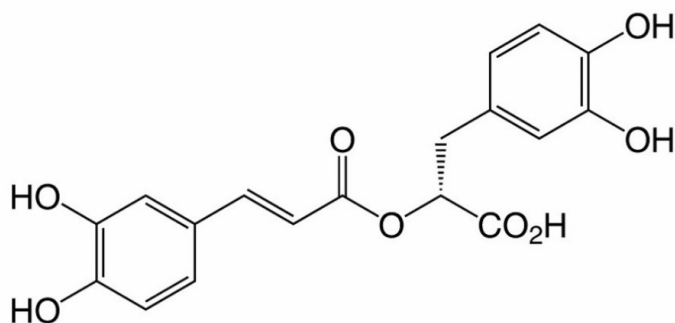
Jasicka-Misiak a kol. [12] se zaměřili na izolaci extraktů z rostliny *S. officinalis*. Extrakty byly připraveny ultrazvukovou extrakcí a jako extrakční rozpouštědlo byl zvolen metanol. V metanolových extraktech byla stanovena antioxidační aktivita (AA) spektrofotometricky pomocí DPPH u dvou různých vzorků šalvěje lékařské. Výsledky ukázaly, že AA dosáhla vysokých hodnot, u prvního vzorku 60,9 % a u druhého vzorku 41,5 % [12].

1.4.1 Kyselina rozmarýnová

Kyselina rozmarýnová (RA) je přírodní fenolická sloučenina, která vykazuje řadu biologických účinků (antioxidační, protizánětlivé, antimikrobiální a neuroprotektivní). Chemická struktura RA obsahuje dva fenolové kruhy s dvěma hydroxylovými skupinami v ortho-poloze. Poprvé byla izolována v 20. století z rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*). Kromě rozmarýnu se nachází v mnoha dalších rostlinách, jako je šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*), dobromysl obecná (*Origanum vulgare*), tymián obecný (*Thymus vulgaris*), máta klasnatá (*Mentha spicata*) či perila křovinová (*Perilla frutescens*). Dle studie Elufioye a Habtemariam [13], je koncentrace kyseliny rozmarýnové proměnlivá a liší se v závislosti na konkrétním rostlinném druhu ze kterého je izolován. Rozmarýn lékařský obsahuje přibližně 1,5 % hmotnosti RA, zatímco perila křovitá obsahuje až 20,0 % hmotnosti RA [13].

Bakota a kol. [14] provedli extrakci z listů šalvěje lékařské. Extrakty byly izolovány dvoufázovým procesem, nejprve extrakcí oxidem uhličitým v superkritickém stavu a následně extrakcí horkou vodou. Množství RA bylo stanoveno jak ve výchozím materiálu (listech šalvěje), tak ve výsledném extraktu. Výsledky ukázaly, že extrakt obsahoval 28,4 mg RA na gram extraktu, což představuje více než trojnásobné množství ve srovnání s výchozím

materiálem, který obsahoval 9,452 mg RA na gram vzorku. Kromě RA byly v extraktu kvantifikovány i celkové fenolické látky, jejichž koncentrace dosáhla 87,2 mg ekvivalentu kyseliny gallové (GAE) na gram extraktu. To naznačuje, že i když extrakt obsahoval širší spektrum fenolických sloučenin, kyselina rozmarýnová tvořila významnou část těchto látek. Antioxidační aktivita extraktu byla hodnocena pomocí metody ABTS, přičemž byla zjištěna hodnota TEAC 1,04 mmol/g [14].

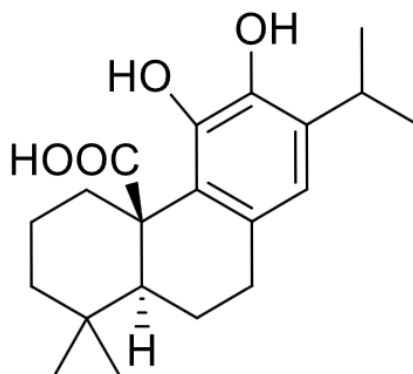


Obr. 2: Vzorec kyseliny rozmarýnové [15]

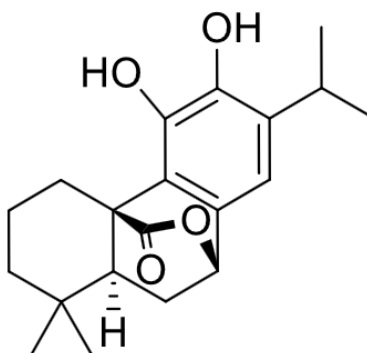
1.4.2 Kyselina karnosová a karnosol

Kyselina karnosová (CA) a karnosol (CN) jsou dvě významné sloučeniny, které se nacházejí v rostlinách z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*), kam patří i šalvěj. Kyselina karnosová je přírodní sloučenina, konkrétně fenolický diterpen, který obsahuje dvě fenolické hydroxylové skupiny a karboxylovou skupinu. Patří mezi sekundární metabolity rostlin a vyskytuje se především v jejich nadzemních částech. Karnosol je chemická sloučenina, která vzniká z kyseliny karnosové. Tato přeměna nastává při vystavení CA kyslíku, například při sušení listů rostliny. Karnosol, který rovněž patří mezi diterpeny, má specifickou chemickou strukturu označovanou jako ortho-difenolická, a kromě fenolických hydroxylů obsahuje také laktonovou část. Obsah kyseliny karnosové a karnosolu v sušených listech šalvěje se může značně lišit (0,1 až 7 %) v závislosti na mnoha faktorech, jako jsou druh rostliny, podmínky růstu, způsob zpracování či použitá metoda extrakce. Wang a kol. [16] prokázali, že kyselina karnosová má silnější antioxidační schopnosti než vitamin E, zvláště při ochraně rybího oleje před oxidací. Aruoma a kol. [17] identifikovali CA a CN jako hlavní antioxidydy přítomné v rozmarýnu [16; 17; 18; 19].

Šalvějové extrakty připravované ve studii Ebru K a kol. [20] byly analyzovány pomocí HPLC s UV detektorem. Nejvyšší koncentrace kyseliny karnosové a karnosolu (3,45 mg/g extraktu) byla zjištěna při maceraci 70% etanolem. Bylo také pozorováno, že tyto látky rychle degradují při delší extrakci (nad 3-6 hodin) a vyšší teplotě (nad 50 °C) [20].



Obr. 3: Vzorec kyseliny karnosové [18]



Obr. 4: Vzorec karnosolu [18]

2 HEŘMÁNEK PRAVÝ

2.1 Charakteristika

Heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*), známý také jako heřmánek lékařský je jednoletá léčivá bylina z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*). Dorůstá do výšky až 80 cm a vyznačuje se žlutým lůžkem, které je obklopeno bílými okvětními lístky. Listy jsou dlouhé, úzké a zpeřené. Po odkvětu se tvoří žlutohnědé nažky. Původem pochází z jižní a východní Evropy a západní a severní Asie, ale rozšířil se do mnoha dalších zemí, včetně Británie a Austrálie. Je nenáročný na pěstování, roste na všech typech půd a je odolný vůči chladu. Na obsah účinných látek, jako jsou esenciální olej a azulen, má větší vliv teplota a sluneční svit než samotný typ půdy. Množí se semeny, která jsou velmi malá a lze je pěstovat přímým výsevem nebo z předpěstovaných sazenic. Optimální teplota pro klíčení semen je mezi 10 °C a 20 °C. Kvete od května do června a květy se sbírají v době plného rozkvětu. Úspěch komerčního pěstování závisí na efektivní sklizni květů v optimální fázi [21; 22; 23].



Obr. 5: Heřmánek pravý [24]

2.2 Chemické složení

V heřmánku pravém se nachází široká škála látek. Bylo v něm identifikováno celkem 26 kyselin, z nichž čtyři mastné kyseliny, konkrétně kyselina palmitová, linolová, olejová a stearová jsou primárními metabolity. Dalšíh 22 kyselin, jako je skořicová, kávová, ferulová a vanilová, patří mezi sekundární metabolity. Mezi další významné složky heřmánku patří flavonoidy, kterých bylo identifikováno kolem 50, včetně kvercetinu, apigeninu, luteolinu a rutinu. Kromě flavonoidů obsahuje heřmánek i kumariny (kumarin, 3,4-dihydrokumarin), těkavé oleje, monoterpeny (geraniol, mentol), seskviterpeny (chamazulen) a další fytochemikálie, jako jsou steroly a polysacharidy. Heřmánek obsahuje 1,29–3,25 % polysacharidů, které se hydrolyzují na kyselinu D-galakturonovou (45 %), D-xylózu (20,8 %), D-galaktózu (12,2 %), L-arabinózu (10,2 %), L-ramnózu (5,3 %) a D-glukózu (2,3 %) [25; 26].

Analýza heřmánkové silice, kterou provedli Hajjaj a kol. [27] s využitím plynové chromatografie s hmotnostním detektorem (GC-MS) odhalila přítomnost 25 různých sloučenin. Nejvíce zastoupenými složkami byly chamazulen (25,21 %), cis-beta-farnesen (12,51 %), eukalyptol (9,19 %), kumarin (7,72 %), galaxolid (6,28 %) a kafr (4,3 %) [27].

2.3 Využití

Heřmánek je všestranná bylina s širokým spektrem využití v tradičním léčení i kosmetickém průmyslu. Sušené květy heřmánku se používají k přípravě čaje, který pomáhá při střevních a žaludečních potížích, podporuje klidný spánek, omezuje nadměrné pocení a působí preventivně proti nachlazení. Obklady a koupele z heřmánku urychlují hojení kožních problémů. Lokální aplikace heřmánkové esence se využívá k odpuzování komárů, hojení ran, hemoroidů a zánětů očí. Heřmánková silice je ceněnou složkou parfémů, krémů, vlasových přípravků, pleťových vod, zubních past a masážních olejů. V aromaterapii se využívá pro své zklidňující účinky [22; 23; 25].

2.4 Antioxidační aktivita

Hlavními složkami heřmánku pravého, které mu propůjčují antioxidační schopnosti, jsou flavonoidy a hydroxyskořicové kyseliny. Flavonoidy jsou rozsáhlá skupina fenolických látek, které se hojně vyskytují v rostlinách. Z heřmánku bylo izolováno hned několik

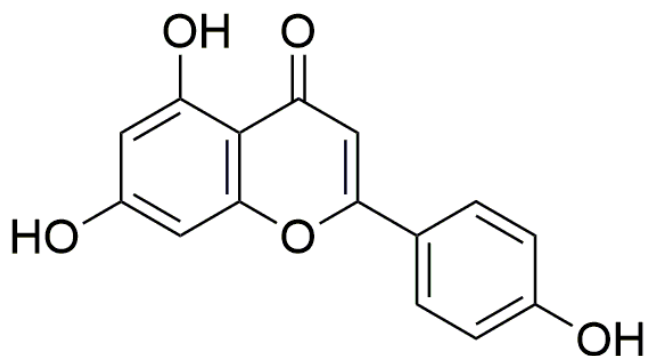
flavonoidů vykazujících antioxidační účinky jako kvercetin, luteolin, apigenin a rutin. Kromě flavonoidů heřmánku obsahuje i hydroxyskořicové kyseliny, přičemž k nejběžnějším patří kyselina chlorogenová a kávová [25; 28].

Karaaslan Ayhan [29] stanovoval antioxidační aktivitu extraktů z heřmánku bílého a žlutého, které byly připraveny pomocí 3 různých rozpouštědel (acetonitril, metanol, voda). AA byla měřena spektrofotometricky pomocí ABTS a DPPH. U obou heřmánků byla nejvyšší AA zaznamenána u vodných extraktů připravených sonikací. U heřmánku bílého byla AA 10,886 mg TEAC/g (měřeno metodou DPPH) a 8,702 mg TEAC/g (měřeno metodou ABTS). U heřmánku žlutého byly naměřeny hodnoty 11,709 mg TEAC/g (DPPH) a 11,139 mg TEAC/g (ABTS) [29].

Studie Al-Dabbagh a kol. [30] zkoumala AA etanolového extraktu z heřmánku pomocí metody DPPH. Výsledky ukázaly, že extrakt vykazuje významnou antioxidační aktivitu, která se zvyšuje s rostoucí koncentrací. Při koncentraci 0,15 mg/ml extrakt inaktivoval 84,2 % volných radikálů DPPH, zatímco při desetinásobně vyšší koncentraci 1,50 mg/ml dosáhla hodnota inaktivace 94,8 % [30].

2.4.1 Apigenin

Apigenin je žlutý krystalický flavonoid ze strukturní třídy flavonů, který se hojně vyskytuje v rostlinách. Najdeme ho v petrželi, pomerančích, celeru, heřmánku nebo pšeničných klíčcích. Tato klíčová složka heřmánku je ceněna pro své protizánětlivé, protikřečové a antibakteriální účinky. Dle studie McKay a Blumberg [31] je 16,8 % apigeninu obsaženo v květním úboru heřmánku. Mučenka, další jeho významný zdroj, se tradičně využívá k léčbě astmatu, nespavosti a nervových poruch. Apigenin však může být prospěšný i při léčbě jiných zdravotních problémů, včetně kožních onemocnění, ischemické choroby srdeční a hypertenzi [31; 32; 33].

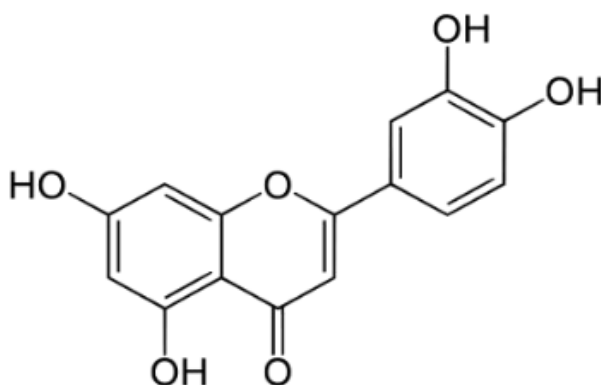


Obr. 6: Vzorec apigeninu [34]

2.4.2 Luteolin

Luteolin je přírodní flavonoid, konkrétně flavon, který se nachází v řadě běžně konzumovaných druhů zeleniny a ovoce, jako jsou celer, sladká paprika, mrkev a brokolice. Tento žlutý krystalický pigment, izolovaný z rostliny *Reseda luteola*, se využívá jako přírodní barvivo. Je známý svými rozmanitými farmakologickými účinky, mezi které patří protizánětlivé, antimikrobiální a protialergické vlastnosti. Na biochemické úrovni působí jak jako antioxidant, tak jako prooxidant. Rostliny bohaté na luteolin se v tradiční medicíně využívají k léčbě různých onemocnění, včetně hypertenze či zánětlivých stavů [35; 36].

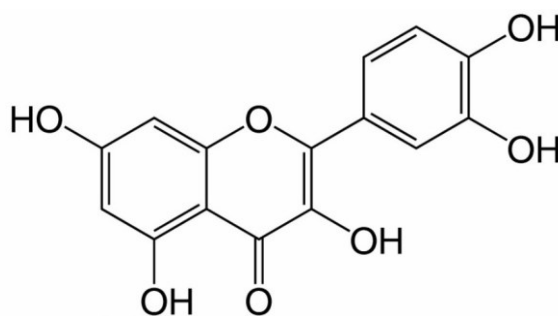
V bylinných nálevech analyzovali Ishizaki a kol. [37] obsah luteolinu a apigeninu pomocí metody IT-SPME/LC-MS/MS. Z 10 testovaných bylinných čajů byl luteolin detekován ve vysokých koncentracích v mátě peprné (375 $\mu\text{g/ml}$) a šalvěji (99 $\mu\text{g/ml}$). Naopak apigenin byl ve vyšší koncentraci (110 $\mu\text{g/ml}$) obsažen v heřmánkovém čaji [37].



Obr. 7: Vzorec luteolinu [38]

2.4.3 Kvercetin

Kvercetin, rostlinný flavonoid, se vyskytuje v mnoha druzích ovoce, zeleniny a ořechů. Bohatými zdroji kvercetinu jsou jablka, brusinky, černá aronie, cibule, brokolice, rajčata, chilli papričky a hlávkový salát. V přírodě je nejčastěji přítomen ve formě glykosidů, tedy sloučenin, ve kterých je vázán na cukry, jako jsou glukóza a rutinóza. Tato látka je ceněna pro své rozmanité příznivé účinky na lidské zdraví. Vyznačuje se silnými antioxidačními vlastnostmi, které pomáhají chránit buňky před poškozením volnými radikály. Kromě antioxidačních účinků má schopnost potlačovat zánětlivé procesy v těle. Dále je zkoumán pro své antivirové a neuroprotektivní vlastnosti [39; 40].



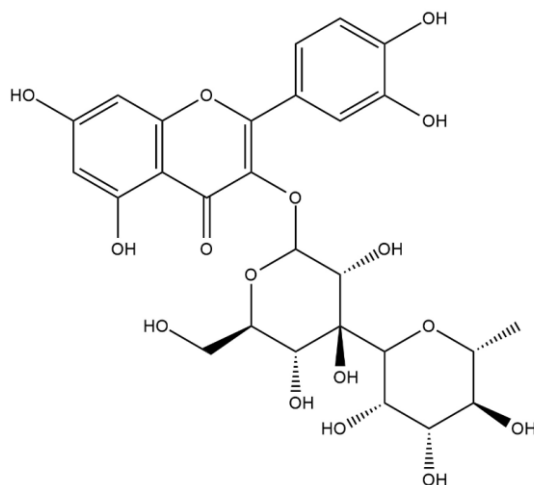
Obr. 8: Vzorec kvercetinu [41]

2.4.4 Rutin

Rutin, známý také jako rutinosid nebo vitamín P, je přírodní antioxidant ze skupiny flavonoidů. Poprvé byl izolován z routy vonné (*Ruta graveolens*). Přirozeně se vyskytuje v pohance, mučence, cibuli nebo citrusových plodech. Tato polyfenolická sloučenina s nízkou molekulovou hmotností obsahuje dvě strukturní složky, a to aglykon kvercetin a disacharid rutinózu. Byly u něj zjištěny silné antioxidační, antibakteriální, protizánětlivé, antialergické a antivirové účinky. Díky těmto svým vlastnostem má široké spektrum využití. V potravinářství se používá jako barvivo, antioxidant, konzervant a stabilizátor. Ve farmacii je součástí rostlinných léčiv a multivitaminových doplňků stravy. V kosmetice se využívá jako aktivní složka kosmetických přípravků [42; 43].

Studie Laina a kol. [44] kombinuje ultrazvukovou a mikrovlnnou extrakci (UAE–MAE) jako potenciální metodu pro izolaci bioaktivních látek z různých druhů rostlin. V experimentu byl analyzován etanolový heřmánkový extrakt, u kterého byla detekována přítomnost flavonoidů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s diodovým polem (HPLC–DAD). Analýza odhalila dva významné píky v chromatogramu, které byly identifikovány

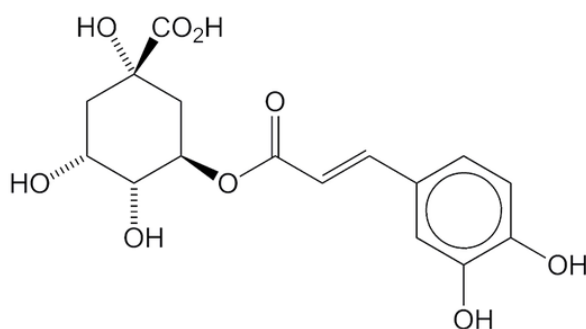
jako flavonoidy kvercetin a rutin. Z provedených měření vyplývá, že v extraktu bylo stanoveno 3,5 mg rutinu/g sušiny vzorku a 2,5 mg kvercetinu/g sušiny vzorku [44].



Obr. 9: Vzorec rutinu [45]

2.4.5 Kyselina chlorogenová

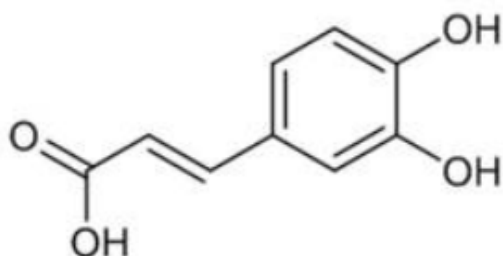
Kyselina chlorogenová je polyfenolická sloučenina, která je přítomna v zelených kávových zrnech, ovoci, zelenině, olivovém oleji a listech tabáku. Tato sloučenina, chemicky známá jako 5-kafeoylchinová kyselina, vzniká spojením kyseliny kávové a chininové. Díky jejím protizánětlivým, antioxidačním a antipatogenním účinkům se zkoumá její potenciál pro léčbu kardiovaskulárních onemocnění, kožních problémů, diabetu, poškození jater a ledvin i neurologických poruch, včetně Alzheimerovy choroby a neuropatické bolesti [46; 47; 48].



Obr. 10: Vzorec kyseliny chlorogenové [49]

2.4.6 Kyselina kávová

Kyselina kávová je hydroxyskořicová kyselina, která spadá do rozsáhlé skupiny fenolových kyselin. Tato sloučenina se přirozeně vyskytuje v mnoha potravinách, včetně kávy, vína, čaje a propolisu. V rostlinách se může nacházet v různých formách, od jednoduchých monomerů, jako jsou estery organických kyselin, estery cukrů, amidy a glykosidy, až po složitější struktury, jako jsou dimery, trimery a deriváty flavonoidů. Může být také vázána na proteiny a další polymery v buněčných stěnách rostlin. Kyselina kávová a její deriváty jsou známy svými biologickými účinky. Zvláštní pozornost je věnována jejímu antihepatokarcinomovému potenciálu, neboť hepatokarcinom představuje celosvětově jednu z hlavních příčin úmrtí na rakovinu [50].



Obr. 11: Vzorec kyseliny kávové [50]

Studie dle Meinhart a kol. [51] zkoumala obsah izomerů chlorogenových kyselin a kyseliny kávové v 89 různých bylinných extraktech pomocí metody UPLC. Celkové množství chlorogenových kyselin bylo stanoveno jako součet koncentrací mono- a dikafeoylchinových kyselin a kyseliny kávové. Analýza ukázala, že chlorogenové kyseliny byly přítomny v 93 % zkoumaných extraktů. Nejvyšší koncentrace těchto kyselin byla detekována v nálevu z yerba maté (*Ilex paraguariensis*), a to 52,6 mg/100 ml extraktu. Vyšší množství chlorogenových kyselin bylo také zjištěno v bílém a zeleném čaji a v květu černého bezu [51].

Kyselina kávová byla detekována v 60 % analyzovaných extraktů. Její koncentrace se pohybovala v rozmezí od 1,0 µg/100 ml extraktu (*Polygonum acre*) do 567 µg/100 ml extraktu (*Echinodorus grandiflorus*) [51].

3 ANTIOXIDANTY

V lidském těle probíhají procesy, při kterých jako vedlejší produkty mohou vznikat škodlivé látky známé jako reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), souhrnně označované jako RONS. Tyto sloučeniny mohou ve vyšších koncentracích poškodit lipidy, proteiny a DNA. Klíčovou roli pro obranu organismu proti škodlivým účinkům volných radikálů hrají antioxidanty. Antioxidanty působí různými mechanismy, čímž neutralizují účinky volných radikálů. Některé z nich inhibují produkci volných radikálů, čímž snižují jejich celkovou koncentraci v těle. Jiné vychytávají volné radikály a mění je na méně toxické sloučeniny. Díky těmto mechanismům antioxidanty pomáhají chránit lidský organismus před oxidačním stresem. Oxidační stres je stav, kdy v těle vzniká nerovnováha mezi volnými radikály a antioxidanty. Dlouhodobý oxidační stres je spojen s mnoha chronickými onemocněními, včetně rakoviny, kardiovaskulárních či neurologických chorob [52].

Hlavním zdrojem přírodních antioxidantů jsou rostliny. Jejich antioxidační aktivita se liší v závislosti na rostlinném druhu, odrůdě, podmínkách pěstování či způsobu extrakce. Mezi rostlinné antioxidanty patří především polyfenoly (fenolové kyseliny, flavonoidy, antokyany, lignany a stilbeny), karotenoidy (xantofyly a karoteny) a vitaminy (E a C). Vysoký obsah antioxidantů byl prokázán u mnoha druhů ovoce a zeleniny, zejména u těch s červeným (např. rajčata, jahody), oranžovým (mrkev, pomeranče) a fialovým (zelí, borůvky) zbarvením [53; 54].

Pro úspěšné studium přírodních antioxidantů z rostlin je klíčová efektivní extrakce. Účinnost extrakce závisí na mnoha faktorech včetně teploty, pH, doby extrakce či typu a koncentraci extrakčního rozpouštědla. Zejména pak volba rozpouštědla hraje důležitou roli. K extrakci antioxidantů z rostlinného materiálu se obvykle používají konvenční metody, a to extrakce organickými rozpouštědly (macerace, Soxhletova extrakce) nebo extrakce pomocí vody s různě vysokou teplotou. Hlavními nevýhodami těchto metod je jejich časová náročnost, vysoká spotřeba rozpouštědel a nízká výtěžnost. Navíc dlouhý proces zahřívání může vést k nežádoucí degradaci termolabilních sloučenin. Dalším způsobem izolace látek s antioxidační aktivitou je použití nekonvenčních metod (např. extrakce superkritickou tekutinou, extrakce pulzním elektrickým polem). Nekonvenční metody sice nabízejí rychlejší a efektivnější extrakci, avšak vyžadují značné investice. Alternativní metodou může být též macerace jedlými oleji. Tato metoda patří mezi tzv. „metody zelené extrakce“, jelikož nevyžaduje použití organických rozpouštědel a nemá škodlivé účinky na životní prostředí. [54; 55].

4 STANOVENÍ OBSAHU POLYFENOLŮ

4.1 Stanovení obsahu polyfenolů metodou HPLC s UV detekcí

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je rutinní separační metoda založena na principu separace jednotlivých složek vzorku dle jejich rozdílné afinity k mobilní fázi (kapalině) a stacionární fázi (pevné látce). Citlivost a přesnost výsledků při analýze rostlinných vzorků závisí na správně volbě stacionární fáze, mobilní fáze a detektoru. Nejčastěji se využívá nepolární stacionární fáze, jelikož je hydrofobní a efektivně tak odděluje a detekuje nepolární sloučeniny obsažené v rostlinných extraktech. Vysokotlaké čerpadlo vhání vzorek do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek směsi. Následně prochází separované složky detektorem, nejčastěji UV-VIS, fluorescenčním či hmotnostním a poté dochází k jejich identifikaci [56; 57; 58].

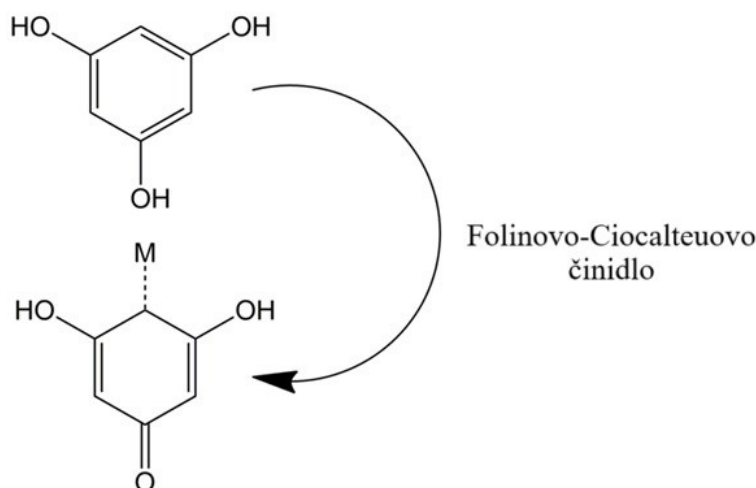
Vědecká práce vypracovaná Gligor a kol. [59] identifikovala a kvantifikovala fenolické sloučeniny v extraktu *Salvia officinalis* pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí (HPLC-UV). Extrakty byly připraveny macerací sušených listů šalvěje v 70% etanolu. Analýza extraktu *S. officinalis* odhalila přítomnost všech devíti sledovaných fenolických sloučenin. Naměřené výsledky jsou uvedeny v Tab. 1 [59].

Tab. 1: Fenolické složení extraktu *S. officinalis* [59]

Detekovaná látka	Naměřená koncentrace (µg / ml)
(+)-Katechin	34,86
Kyselina syringová	3,32
Kyselina skořicová	4,92
Resveratrol	0,98
Kyselina chlorogenová	38,61
Kyselina kávová	55,07
Kyselina ferulová	115,11
Rutin	43,99
Kvercetin	143,32

4.2 Stanovení obsahu polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla

Folin-Ciocalteuova metoda je celosvětově nejpoužívanější metodou pro kvantifikaci celkových polyfenolů. Původně byla vyvinuta pro kvantifikaci dvou aromatických aminokyselin, tyrosinu a tryptofanu a nepřímo i celkového obsahu bílkovin. Popularita této metody pramení zejména z její relativní rychlosti provedení a celkových nízkých nákladů. Další její nespornou výhodou je jednoduchost provedení, která nevyžaduje použití složitých přístrojů a velkého množství chemikálií. Nicméně, pro dosažení spolehlivých výsledků je klíčové pečlivě kontrolovat reakční podmínky, jelikož je citlivá na pH, teplotu a čas. Princip metody spočívá v oxidaci hydroxylových skupin v polyfenolech za použití Folin-Ciocalteuova činidla. Folin-Ciocalteuovo (FC) činidlo je z chemického hlediska směsí sodných solí molybdenanu a wolframanu, anorganických kyselin chlorovodíkové a fosforečné, síranu lithného a vody. Komplex kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové má v oxidovaném stavu žlutou barvu. Při redukci fenolátovými ionty (vzniklými z polyfenolů) dochází ke vzniku intenzivního modrého zbarvení. Podstata barevné změny spočívá v přenosu elektronů mezi FC činidlem (oxidační činidlo) a polyfenolem (redukční činidlo). Intenzita modré barvy, která vznikne po přijetí elektronů činidlem, je úměrná redukční schopnosti polyfenolů. Reakce fenolických sloučenin s kyselým FC činidlem probíhá efektivně pouze v zásaditém prostředí. Důvodem je nutnost deprotonace hydroxylové skupiny (-OH) ve fenolovém jádru. Proto se do směsi vzorku a činidla přidává roztok uhličitanu sodného, čímž se pH zvýší přibližně na 10 a zároveň se předejde příliš vysoké alkalitě prostředí. Výsledky stanovení celkových polyfenolů se často vyjadřují jako ekvivalenty kyseliny gallové. Kyselina gallová totiž vykazuje ve srovnání s jinými fenolickými sloučeninami, jako je například kyselina chlorogenová nebo neochlorogenová, nejvyšší absorbanci. Kvantifikace intenzity zbarvení analyzovaného vzorku probíhá spektrofotometricky při vlnové délce 750 nm [60; 61; 62; 63].



Obr. 12: Redoxní reakce mezi polyfenoly a Folin-Ciocalteuovým činidlem [60]

V rámci vědecké studie popsané v kapitole 4.1 byl kvantifikován i obsah celkových polyfenolů v etanolovém extraktu šalvěje lékařské. Výsledky získané pomocí Folin-Ciocalteuovy metody ukázaly, že testovaný extrakt obsahuje 67,12 mg GAE/ml [59].

Studie, kterou se zabývali Jasicka-Misiak a kol. [12] (1.4), rovněž stanovovala TPC. Množství celkových polyfenolů bylo zjišťováno u dvou různých vzorků šalvěje lékařské. U prvního vzorku byl TPC 93,8 mg GAE/g a u druhého 63,9 mg GAE/g [12].

Karaaslan Ayhan [29] se zaměřil na porovnání vlastností bílého a žlutého heřmánku, přičemž analyzoval nejen jejich antioxidační aktivitu (2.4), ale i celkový obsah polyfenolů. V extraktu ze žlutého heřmánku bylo zjištěno vyšší množství TPC (5,22 mg GAE/g) ve srovnání s extraktem z bílého heřmánku, kde hodnota TPC činila 3,86 mg GAE/g [29].

V rámci analýzy etanolového heřmánkového extraktu, kterou provedl Al-Dabbagh a kol. [30] byl rovněž kromě AA (2.4) stanoven i TPC. Naměřená hodnota TPC 21,4 mg GAE/g svědčí o vysokém obsahu polyfenolů v extraktu [30].

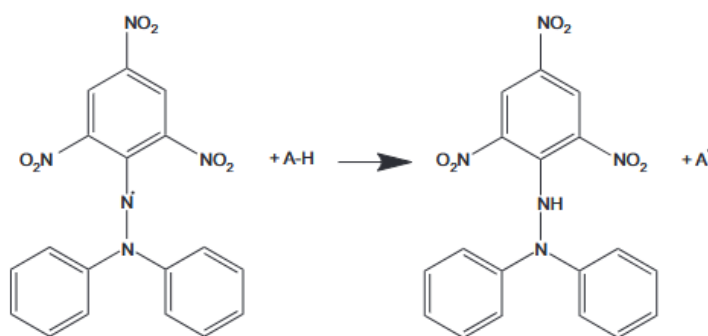
5 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

Existuje široká škála metod, které mohou být využívány ke stanovení antioxidační aktivity látek. Důvodem této různorodosti je skutečnost, že antioxidanty mohou neutralizovat volné radikály různými mechanismy. K neutralizaci volných radikálů dochází nejčastěji přímou reakcí antioxidantu s radikálem, kdy antioxidant, díky své stabilitě, může darovat elektron volnému radikálu a tím ho stabilizovat. Další možností může být interakce antioxidantu s přechodnými kovy. Přechodné kovy, jako je železo nebo měď, mohou v organismu vyvolat vznik volných radikálů, které poškozují buňky. Antioxidanty tyto kovy chelatují a tím zabraňují jejich škodlivým účinkům. Metody měření antioxidační aktivity lze rozdělit na ty, které hodnotí schopnost látek vychytávat volné radikály (ABTS a DPPH) a ty, které se zaměřují na redoxní vlastnosti látek (FRAP) [64; 65; 56].

Chaves a kol. [66] se zaměřili na stanovení AA v 12 různých rostlinných druzích, s cílem identifikovat nové potenciální látky s antioxidačními vlastnostmi. Ke stanovení AA v připravených extraktech byly použity metody DPPH, FRAP a ABTS [66]. Analýza AA s použitím metody DPPH odhalila, že *R. aculeatus* vykazuje nejnižší antioxidační potenciál (0,007 QE mg/mg sušiny). Naopak, rostliny *A. unedo*, *C. salvifolius*, *C. ladanifer* a *P. lentiscus* se vyznačují výrazně vyšší AA (0,035; 0,032; 0,030; 0,030 QE mg/mg sušiny), což ukazuje na jejich silnější antioxidační vlastnosti. Při použití metody ABTS byla nejvyšší AA zjištěna u *E. australis* (0,014 QE mg/mg sušiny), *C. salvifolius* (0,013 QE mg/mg sušiny), *A. unedo* a *P. lentiscus* (oba 0,012 QE mg/mg sušiny). Opět se potvrdilo, že *R. aculeatus* vykazuje nejnižší aktivitu (0,0004 QE mg/mg sušiny). Metoda FRAP potvrdila předchozí zjištění, kdy *R. aculeatus* opět vykazoval nejnižší AA (0,004 FeSO₄ E mg/mg sušiny) a *C. ladanifer* a *P. lentiscus* naopak nejvyšší (oba 0,071 FeSO₄ E mg/mg sušiny) [66].

5.1 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH

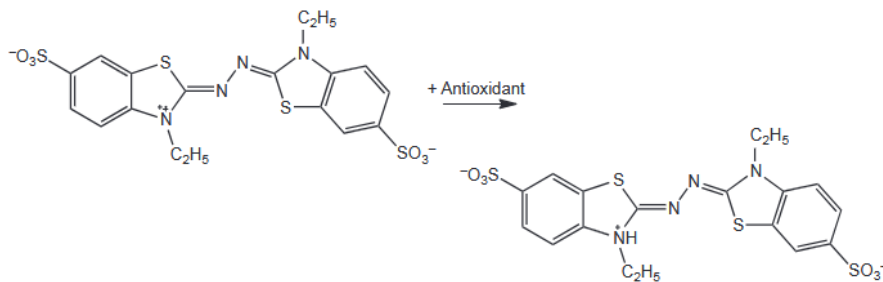
Metoda stanovení antioxidační aktivity s využitím DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) je jednou z nejčastěji využívaných metod. Je oblíbená především díky své rychlosti a ekonomické dostupnosti. Podstata této metody spočívá v interakci zkoumané látky se stabilním radikálem DPPH[•], který má tmavě fialové zbarvení. Tento radikál je během reakce redukován na DPPH-H (difenylpikrylhydrazin) a současně dochází ke změně barvy roztoku z fialové na žlutou. Průběh reakce je monitorován spektrofotometricky, a to měřením úbytku absorpance při vlnové délce 517 nm [64; 67; 68].



Obr. 13: Mechanismus reakce DPPH radikálu s antioxidantem [67]

5.2 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Metoda využívající ABTS (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)) je považována za jednu z nejcitlivějších technik pro stanovení antioxidační aktivity. Její princip spočívá ve schopnosti testované látky zhaset kationtový radikál ABTS^{•+}. Tento radikál se připravuje oxidací ABTS persíranem draselným a vyznačuje se zelenomodrou barvou. V přítomnosti antioxidantů, které darují vodík, dochází k redukci ABTS^{•+} a postupnému odbarvování roztoku. Míra zhasení radikálu se měří spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm. Výsledky se obvykle vyjadřují jako ekvivalenty troloxu, což umožňuje srovnání s antioxidační kapacitou standardní látky [64; 67; 69].



Obr. 14: Chemická reakce ABTS s antioxidantem [67]

II PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Diplomová práce je zaměřena na popis a stanovení polyfenolů a antioxidačních charakteristik šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) a heřmánku pravého (*Matricaria chamomilla*).

V teoretické části:

- Popsat šalvěj lékařskou (*Salvia officinalis*) a heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*), charakterizovat jejich chemické složení, využití a antioxidační účinky.
- Popsat antioxidanty a jednotlivé metody používané pro kvantifikaci celkového obsahu polyfenolů a stanovení antioxidační aktivity.

V praktické části práce:

- Připravit etanolové, metanolové a vodní extrakty z obou zkoumaných léčivých bylin.
- Pro detailnější analýzu daných extraktů provést stanovení jednotlivých fenolických látek pomocí HPLC techniky s DAD detekcí.
- Následně tyto extrakty podrobit analýze s cílem stanovit obsah celkových polyfenolů a antioxidační aktivitu. Celkový obsah polyfenolů kvantifikovat spektrofotometricky s použitím Folin-Ciocalteuova činidla. Antioxidační aktivitu stanovit pomocí dvou spektrofotometrických metod, konkrétně s použitím ABTS a DPPH činidel.

7 MATERIÁL, CHEMIKÁLIE, POMŮCKY A PŘÍSTROJE

7.1 Materiál

Pro přípravu extraktů byly zvoleny jako výchozí materiál dvě léčivé rostliny: šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*) a heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*).

Pro zajištění reprezentativnosti výsledků bylo analyzováno celkem 14 vzorků těchto rostlin (Tab. 2 a Tab. 3), z toho vždy po 6-ti vzorcích sušené rostliny od různých komerčních výrobců. Pro doplnění experimentu byly zahrnuty i dva vzorky čerstvé šalvěje ze soukromého pěstitelství. Pro extrakci byly použity následující části rostlin: u šalvěje nať a listy, u heřmánku květ.

Tab. 2: Vzorky šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*)

Označení vzorku	Forma vzorku	Část byliny	Země původu
SŠ_1	Sušená	Nať	Česká republika
SŠ_2	Sušená	Nať	Česká republika
SŠ_3	Sušená	Nať	Česká republika
SŠ_4	Sušená	Nať	Česká republika
SŠ_5	Sušená	Listy, bio	Německo
SŠ_6	Sušená	Nať	Česká republika
ČŠ_1	Čerstvá	Nať, listy	Česká republika
ČŠ_2	Čerstvá	Nať, listy	Česká republika

Tab. 3: Vzorky heřmánku pravého (*Matricaria chamomilla*)

Označení vzorku	Forma byliny	Část byliny	Země původu
SH_1	Sušená	Květ	Česká republika
SH_2	Sušená	Květ	Česká republika
SH_3	Sušená	Květ	Česká republika
SH_4	Sušená	Květ	Česká republika
SH_5	Sušená	Květ, bio	Česká republika
SH_6	Sušená	Květ	Česká republika

7.2 Chemikálie

Etanol, p.a. (Penta, Česká republika)

Metanol, p.a. (Lach:Ner, s.r.o., Česká republika)

Demineralizovaná voda

Folin-Ciocalteuovo činidlo (Penta s.r.o., Česká republika)

Uhličitan sodný (Lukeš, Česká republika)

Acetátový pufr (Lukeš, Česká republika)

DPPH (Sigma Aldrich, Francie)

Trolox (Sigma Aldrich, Francie)

ABTS (Sigma Aldrich, Francie)

Peroxodisíran draselný (Lach:Ner, s.r.o., Česká republika)

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 vanilové (Sigma Aldrich, Francie)

Standard kyseliny chlorogenové (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 kvercetinu (Sigma Aldrich, Francie)

7.3 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy Voyager PRO VP214C (Ohaus, USA)
Filtrační papír KA 4 (Papírna Perštein, Česká republika)
Laboratorní sklo
Laboratorní třepačka LT2 (Kavalier, Česká republika)
Třepačka na zkumavky (Vortex CHS, Česká republika)
Spektrofotometr WPA S1200+ (Bio-chrom, s.r.o., Slovensko)
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)

8 METODIKA STANOVENÍ

8.1 Příprava extraktů

V první části experimentu byly připraveny extrakty z šalvěje (*Tab. 2*) a heřmánku (*Tab. 3*). Jako extrakční rozpouštědla byla zvolena: etanol, metanol a demineralizovaná voda.

Pro extrakci heřmánku a šalvěje byly vzorky rostlin naváženy s přesností 0,0001 g na analytických vahách. U sušeného heřmánku byla navážka 1,0 g pro každý vzorek. U šalvěje se navážka lišila dle toho, zda se jednalo o sušenou či čerstvou rostlinu. Sušená forma šalvěje byla navážena v množství 0,5 g, u čerstvé šalvěje byla navážka 1,0 g.

Vodné extrakty byly připraveny extrakcí vzorku 50ml demineralizované vody o teplotě 100 °C po dobu 10 minut. Během této doby byl vzorek míchán. Po dané době extrakce byl extrakt ochlazen na laboratorní teplotu a následně přefiltrován přes filtrační papír. Takto získaný filtrát byl naředěn dle potřeby a podroben analýze s cílem stanovit celkový obsah polyfenolů, přítomnost a obsah jednotlivých polyfenolických látek u vybraných vzorků, a antioxidační aktivitu.

Etanolové a metanolové extrakty byly připraveny extrakcí vzorku 50ml etanolu či metanolu. Vzorky byly třepány na třepačce po dobu 30 minut. Následně byly extrakty opět zfiltrvány, vhodně naředěny a byl stanoven celkový obsah polyfenolů, přítomnost a obsah jednotlivých polyfenolických látek u vybraných vzorků, a antioxidační aktivitu.

8.2 Stanovení obsahu polyfenolů pomocí HPLC/DAD

Celkový obsah polyfenolů byl stanoven metodou HPLC/DAD v 6 extraktech. Analyzovány byly metanolové, etanolové a vodné extrakty ze sušeného heřmánku (SH_2) a bio extraktu šalvěje (SŠ_5).

Pro separaci polyfenolických látek byla využita kolona Phenomenex Kinetex C 18 o rozměrech 150 mm x 4,6 mm, přičemž velikost částic byla 5 µm. Mobilní fáze A byla tvořena směsí vody a kyseliny octové (o čistotě 99,8 %) v poměru 99:1. Zatímco mobilní fáze B se skládala z vody, acetonitrilu a kyseliny octové (o čistotě 99,8 %) v poměru 67:32:1. Optimální separace bylo dosaženo díky využití selektivity mobilních fází. Detailní popis složení mobilních fází v průběhu času je uveden v *Tab. 4*.

Tab. 4: Složení mobilních fází během gradientové eluce

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0 –10	80 –90	10 –20
10 –16	60 –80	20 –40
16 –20	50 –60	40 –50
20 –25	30 –50	50 –70
25 –30	30	70
30 –40	30 –90	70 –10
40 –45	90	10

Měření bylo provedeno za následujících podmínek: teplota kolony 30 °C, průtok mobilní fáze 1 ml/min, injekční objem 10 µl a doba analýzy 45 minut. Data byla zaznamenávána při 4 různých vlnových délkách (210, 254, 275 a 375 nm). Pro kvantitativní stanovení obsahu polyfenolů v extraktech byla využita data naměřená při vlnové délce 275 nm vůči standardům.

8.2.1 Kalibrační křivky standardů polyfenolických látek

V rámci analýzy bylinných extraktů bylo s využitím HPLC s DAD detekcí identifikováno, na základě porovnání se standardy, a kvantifikováno celkem 22 různých polyfenolických sloučenin. Pro vyhodnocení množství těchto analyzovaných látek byly stanoveny rovnice lineární regrese, které jsou uvedeny v Tab. 5. Z těchto rovnic bylo nejprve zjištěno množství jednotlivých polyfenolů v µg/ml a následně přepočítáno na µg/g vzorku.

Tab. 5: Rovnice lineární regrese polyfenolických látek

Polyfenolická látka	Rovnice lineární regrese
Kyselina gallová	$y = 0,3413x$
Kyselina protokatechová	$y = 0,2359x$

Polyfenolická látka	Rovnice lineární regrese
Kyselina neochlorogenová	$y = 0,1559x$
Kyselina 4-hydroxybenzoová	$y = 0,5114x$
Epigallokatechin	$y = 0,0221x$
Katechin	$y = 0,0987x$
Kyselina chlorogenová	$y = 0,2125x$
Kyselina vanilová	$y = 0,2612x$
Kyselina kávová	$y = 0,5478x$
Kyselina syringová	$y = 0,3716x$
Epikatechin	$y = 0,1366x$
Kyselina trans-p-kumarová	$y = 0,1882x$
Kyselina ferrulová	$y = 0,4502x$
Kyselina sinapová	$y = 0,1767x$
Kyselina elagová	$y = 0,2005x$
Rutin	$y = 0,1257x$
Kyselina trans-hydroxyskořicová	$y = 1,2589x$
Etylester kyseliny protokatechové	$y = 0,3095x$
Resveratrol	$y = 0,3613x$
Kyselina trans-skořicová	$y = 1,4882x$
Kaempferol	$y = 0,2241x$
Kvercetin	$y = 0,3202x$

kde y je plocha píku (mAU.min) a x je koncentrace dané polyfenolické látky ($\mu\text{g/ml}$)

8.3 Stanovení obsahu polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla

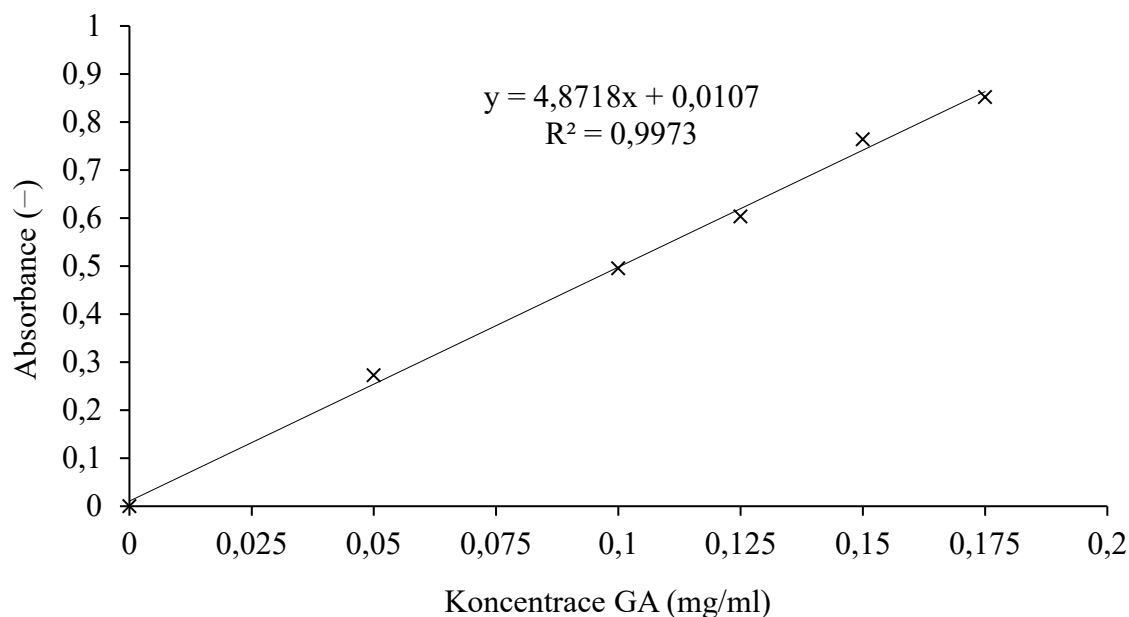
Pro kvantifikaci celkového obsahu polyfenolů v bylinných extraktech připravených dle postupu uvedeného v kapitole 8.1 byl použit modifikovaný postup s využitím Folin-Ciocalteuova činidla [70].

Do skleněné zkumavky bylo napipetováno 0,4 ml extraktu příslušné byliny a 4 ml 10% Folin-Ciocalteuova činidla. Tato reakční směs byla promíchána na vortexu a inkubována při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 5 minut. Poté byly k reakční směsi přidány 4 ml 10% uhličitanu sodného. Směs byla opět promíchána a inkubována ve tmě dalších 15 minut. Po druhé inkubaci byla reakční směs důkladně promíchána a následně byly vzorky měřeny spektrofotometricky při vlnové délce 750 nm proti slepému vzorku. Jako slepý vzorek byla použita směs, která se svým složením shodovala s reakční směsí, avšak místo extraktu byliny bylo pipetováno 0,4 ml demineralizované vody, etanolu nebo metanolu, v závislosti na typu extrakčního rozpouštědla. Absorbance každého vzorku byla měřena ve třech paralelních stanoveních pro zajištění přesnosti a reprodukovatelnosti výsledků.

Množství celkových polyfenolů v extraktech bylo vypočítáno z hodnot zjištěné absorbance s přepočtem přes regresní rovnici kalibrační závislosti absorbance na koncentraci kyseliny gallové (GA). Výsledky byly vyjádřeny jako mg ekvivalentu kyseliny gallové (GAE) na ml extraktu. Následně byly tyto koncentrace přepočítány jako množství celkových polyfenolů vyjádřené v mg GAE na g vzorku.

8.3.1 Kalibrační křivka kyseliny gallové

Pro vytvoření kalibrační křivky byl jako standard použit roztok kyseliny gallové o následujících koncentracích: 0,05; 0,1; 0,125; 0,15 a 0,175 mg/ml. U připravených kalibračních roztoků byla stanoven obsah celkových polyfenolů (TPC) spektrofotometricky ($\lambda=750$ nm) dle postupu popsání v kapitole 8.3. Následně byla sestavena kalibrační křivka, která zobrazuje závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové. Proložením kalibračních bodů přímkou byla určena regresní rovnice.



Obr. 15: Kalibrační křivka kyseliny gallové

Rovnice lineární regrese kalibrační přímky kyseliny gallové (GA):

$$y = 4,8718x + 0,0107,$$

kde y je absorbance (-) a x je koncentrace kyseliny gallové (mg/ml).

$$R^2 = 0,9973,$$

a R^2 je hodnota spolehlivosti (-)

8.4 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH

Pro stanovení antioxidační aktivity šalvějových a heřmánkových extraktů bylo využito spektrofotometrické hodnocení extraktů po reakci s DPPH činidlem.

Reakční směs byla připravena smícháním modifikovaným postupem ze zdroje [70] 3 ml acetátového pufru (pH 5,5), 5 ml DPPH a 0,3 ml šalvějového extraktu, respektive 0,6 ml heřmánkového extraktu. Po důkladném promíchání byla směs inkubována po dobu jedné hodiny při laboratorní teplotě na tmavém místě s občasným mícháním. Po uplynutí inkubační doby byla směs opět promíchána na vortexu a byla změřena absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 517 nm proti slepému vzorku. Slepý vzorek měl obdobné složení jako reakční směs, ale DPPH bylo nahrazeno etanolem. Pro stanovení

hodnoty inaktivace byl připraven kontrolní vzorek, který obsahoval 3 ml acetátového pufru (pH 5,5), 5 ml DPPH a 0,3/0,6 ml etanolu, metanolu nebo demineralizované vody dle typu extrakce. Každý vzorek byl připraven a měřen 3x.

Hodnota inaktivace (I, %) byla vypočítána z naměřených hodnot absorbance kontrolního vzorku a extraktů pomocí následujícího vzorce:

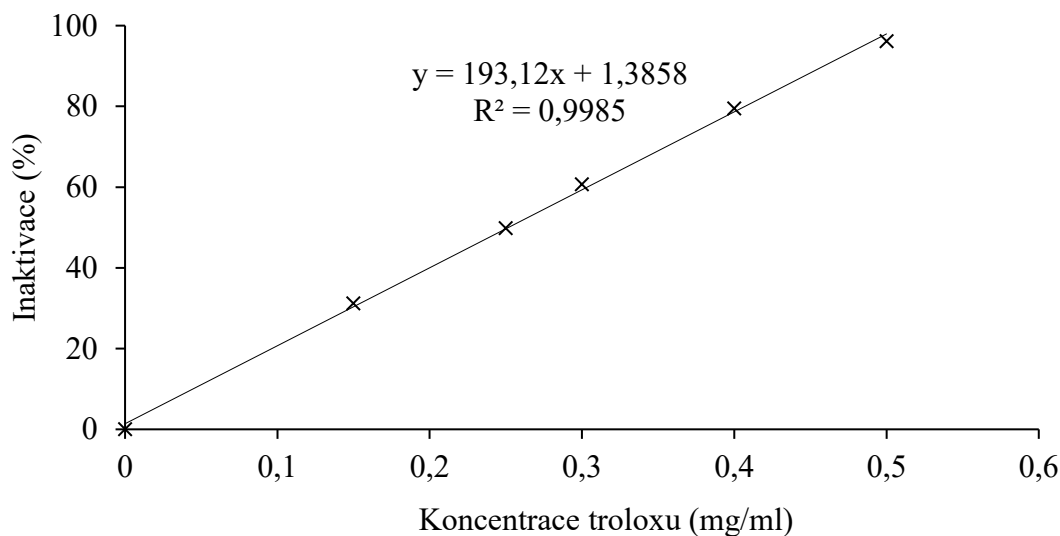
$$I = \left(\frac{K - A}{K} \right) \times 100 (\%),$$

kde I je hodnota inaktivace (%), K je absorbance kontrolního vzorku ($\lambda=517$ nm) (–), A je absorbance extraktu ($\lambda=517$ nm) (–).

Antioxidační aktivita analyzovaných extraktů byla stanovena z hodnot zjištěné inaktivace s přepočtem přes regresní rovnici kalibrační závislosti inaktivace na koncentraci troloxu. Výsledky antioxidační aktivity (AA) byly vyjádřeny v mg troloxu na ml extraktu a poté přepočítány na mg ekvivalentu troloxu (TE) na g vzorku.

8.4.1 Kalibrační křivka troloxu (DPPH)

Pro vytvoření kalibrační křivky bylo připraveno 5 kalibračních roztoků troloxu o koncentracích 0,15; 0,25; 0,3; 0,4 a 0,5 mg/ml. U každého z těchto roztoků byla spektrofotometricky ($\lambda=517$ nm) změřena absorbance, která byla přepočtena na inaktivaci, a to v souladu s postupem podrobněji popsáním v kapitole 8.4. Na základě těchto dat byla sestavena kalibrační křivka, která znázorňuje závislost inaktivace na koncentraci troloxu. Body v grafu byly aproximovány přímkou a byla určena rovnice lineární regrese.



Obr. 16: Kalibrační křivka troloxu (DPPH)

Rovnice lineární regrese kalibrační přímky troloxu:

$$y = 193,12x + 1,3858,$$

kde y je inaktivace (%) a x je koncentrace troloxu (mg/ml).

$$R^2 = 0,9985,$$

a R^2 je hodnota spolehlivosti (-).

8.5 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Pro stanovení AA byla použita také metoda s využitím ABTS činidla. Reakční směs pro toto stanovení (modifikovaný postup dle zdroje [70]) byla připravena tak, že roztok ABTS ($c=3,5$ mmol/l) byl smíchán s roztokem peroxosíranu draselného ($c=0,06$ mol/l) v poměru 50:1. Takto připravená směs byla ponechána 16 hodin ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby, kdy směs reagovala, byl výsledný kationtový radikál ABTS smíchán s octanovým puftrem (pH 4,3) v poměru 1:39.

Do zkumavky bylo napipetováno 0,1 ml extraktu z šalvěje/heřmánku. K tomuto extraktu bylo přidáno 8 ml reakční směsi. Celý obsah zkumavky byl důkladně promíchán pomocí vortexu a poté byl ponechán reagovat ve tmě 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla směs znovu promíchána a byla proměřena absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 734 nm. Měření bylo provedeno proti slepému vzorku, kterým byl octanový

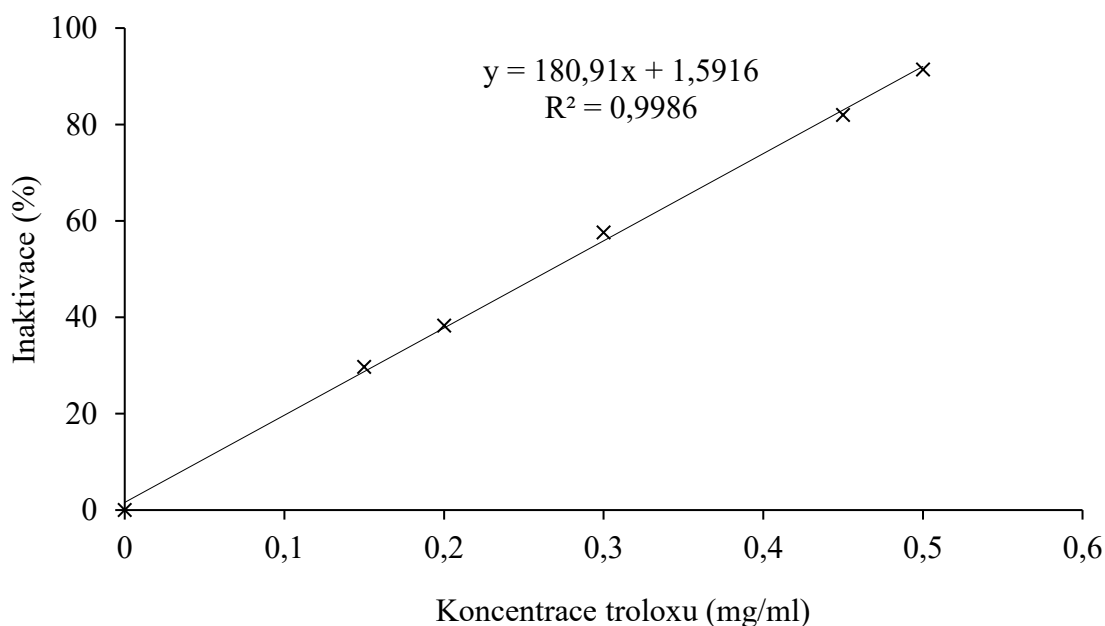
pufr. Každý vzorek byl připraven třikrát. Nakonec byla vypočítána hodnota inaktivace dle vztahu:

$$I = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100 (\%),$$

kde I je hodnota inaktivace (%), A_0 je absorbance reakční směsi bez extraktu ($\lambda=734$ nm), A_1 je absorbance extraktu ($\lambda=734$ nm) (-).

8.5.1 Kalibrační křivka troloxu (ABTS)

Za účelem sestrojení kalibrační křivky byly připraveny kalibrační roztoky standardu troloxu o koncentracích 0,15; 0,2; 0,3; 0,45 a 0,5 mg/ml. Tyto roztoky byly analyzovány spektrofotometricky ($\lambda=734$ nm), podle postupu uvedeného v kapitole 8.5. Následně byly ze získaných hodnot absorbance vypočítány hodnoty inaktivace. Na základě získaných dat byla sestavena kalibrační křivka závislosti inaktivaci na koncentraci troloxu. Data byla aproximována přímkou, čímž byla získána rovnice lineární regrese.



Obr. 17: Kalibrační křivka troloxu (ABTS)

Rovnice lineární regrese kalibrační přímky troloxu:

$$y = 180,91x + 1,5916,$$

kde y je inaktivace (%) a x je koncentrace troloxu (mg/ml).

$$R^2 = 0,9986,$$

a R^2 je hodnota spolehlivosti (-).

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

9.1 Stanovení obsahu jednotlivých polyfenolických látek ve vybraných extraktech z šalvěže a heřmánku pomocí HPLC/DAD

Z bio vzorků sušené šalvěže (SŠ_5) a sušeného heřmánku (SH_2) byly připraveny metanolvé, etanolvé a vodné extrakty podle postupu uvedeného v kapitole 8.1. Pomocí HPLC/DAD byla stanovena přítomnost jednotlivých polyfenolických látek na základě porovnání s 22 vybranými standardy, a obsah jednotlivých polyfenolů v extraktech na základě porovnání plochy jejich píků s hodnotami ploch z kalibračního grafu, pomocí regresních rovnic uvedených v *Tab. 5* v $\mu\text{g/ml}$. Poté byla tato množství převedena na $\mu\text{g/g}$ vzorku (*Tab. 6*).

V připravených extraktech byla detekována široká škála polyfenolických sloučenin v závislosti na druhu rostliny a použitém rozpouštědle.

Vodný extrakt ze sušené šalvěže lékařské (SŠ_5 bio voda) obsahoval všech 22 sledovaných polyfenolických sloučenin. Nejvyšší obsah byl zjištěn u epigallokatechinu ($7156,81 \mu\text{g/g}$), dále etylester kyseliny protokatechové ($3738,91 \mu\text{g/g}$) a rutin ($2264,45 \mu\text{g/g}$). Nejméně zastoupená byla ve vodném extraktu kyselina gallová ($8,01 \mu\text{g/g}$). V etanolovém extraktu (SŠ_5 bio etanol) bylo kvantifikováno celkem 16 polyfenolů. Mezi nepřítomnými polyfenoly byly kyselina gallová, kyselina neochlorogenová, kyselina chlorogenová, epikatechin, kyselina trans-skořicová a kaempferol. V bio vzorku SŠ_5 etanol byly nejvyšší koncentrace zjištěny u etylesteru kyseliny protokatechové ($409,93 \mu\text{g/g}$) a epigallokatechinu ($306,69 \mu\text{g/g}$), naopak nejnižší množství bylo stanoveno u kyseliny protokatechové ($1,94 \mu\text{g/g}$). Metanolvý extrakt (SŠ_5 bio metanol) obsahoval celkem 18 polyfenolických sloučenin, přičemž stejně jako v etanolovém extraktu zde nebyly detekovány epikatechin, kyselina chlorogenová a kyselina gallová. Metanolvý extrakt na rozdíl od etanolového neobsahoval i kyselinu vanilovou. Nejvyšší obsah vykazoval epigallokatechin ($1848,41 \mu\text{g/g}$) a etylester kyseliny protokatechové ($1778,49 \mu\text{g/g}$), zatímco nejnižší množství bylo kvantifikováno u kyseliny protokatechové ($0,36 \mu\text{g/g}$).

Z výsledků experimentu je patrné, že bio vzorek SŠ_5 měl vysoký obsah etylesteru kyseliny protokatechové a epigallokatechinu ve všech třech testovaných extraktech bez ohledu na použité extrakční rozpouštědlo.

Ve vodném heřmánkovém extraktu (SH_2 voda) bylo stanoveno a kvantifikováno všech 22 polyfenolických sloučenin, kdy v nejvyšším množství byla zastoupena kyselina ferulová 2360,40 µg/g. Mezi další významně zastoupené látky patřily katechin (216,64 µg/g) a kyselina neochlorogenová (196,38 µg/g). Nejnižší množství bylo zjištěno u kyseliny syringové, jejíž koncentrace v extraktu činila 1,02 µg/g. Kvalitativní analýza etanolového extraktu z heřmánku (SH_2 etanol) určila přítomnost 15 polyfenolických sloučenin. Na rozdíl od vodného extraktu nebyly v etanolovém extraktu detekovány kyselina gallová, kyselina neochlorogenová, epigallokatechin, kyselina chlorogenová, kyselina syringová, epikatechin a kyselina trans-hydroxyskořicová. Nejvyšší koncentraci v etanolovém extraktu vykazoval kvercetin (1779,40 µg/g), následovaný kyselinou ferulovou (496,44 µg/g) a etylesterem kyseliny protokatechové (447,81 µg/g). Nejnižší množství bylo naměřeno u kyseliny trans-skořicové (0,57 µg/g) a kyseliny elagové (0,78 µg/g). V metanolovém heřmánkovém extraktu (SH_2 metanol) bylo detekováno 19 polyfenolických sloučenin. Podobně jako u etanolového extraktu, ani v tomto případě nebyla zjištěna přítomnost epikatechinu, kyseliny syringové a kyseliny chlorogenové. Nejvyšší koncentrace v metanolovém extraktu dosahoval kvercetin (1614,92 µg/g), kyselina ferulová (955,70 µg/g) a etylester kyseliny protokatechové (811,77 µg/g). Nejnižší zastoupení bylo zaznamenáno u kyseliny trans-hydroxyskořicové (0,31 µg/g) a kyseliny trans-skořicové (0,88 µg/g). Z výsledků analýzy vyplývá, že v alkoholových extraktech byl v největším množství detekován kvercetin, zatímco ve vodném extraktu dominovala kyselina ferulová, jejíž obsah byl nicméně významný i v metanolovém a etanolovém extraktu.

Provedená analýza extraktů pomocí kapalinové chromatografie potvrdila, že typ použitého extrakčního rozpouštědla má významný vliv na konkrétní složení získaného extraktu. U vodných, metanolových i etanolových extraktů, jak ze šalvěje, tak i z heřmánku, bylo zjištěno odlišné spektrum a množství detekovaných polyfenolických látek.

Tab. 6: Polyfenolické látky detekované pomocí HPLC/DAD ve vybraných extraktech z šalvěže a heřmánku

Polyfenolická látka	SŠ_5 bio etanol		SH_2 etanol		SŠ_5 bio metanol		SH_2 metanol		SŠ_5 bio voda		SH_2 voda	
	Obsah (µg/g)	s	Obsah (µg/g)	s	Obsah (µg/g)	s	Obsah (µg/g)	s	Obsah (µg/g)	s	Obsah (µg/g)	s
Kyselina gallová	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	2,55	0,07	8,01	0,08	42,68	1,49
Kyselina protokatechová	1,94	0,18	8,76	0,13	0,36	0,09	16,12	0,16	15,58	0,21	8,87	0,07
Kyselina neochlorogenová	N.D.	-	N.D.	-	7,68	0,50	20,54	0,23	74,42	0,63	196,38	2,86
Kyselina 4-hydroxybenzoová	3,39	0,08	2,30	0,05	26,82	0,41	2,32	0,03	51,95	0,25	11,76	0,06
Epigallokatechin	306,69	2,23	N.D.	-	1848,41	15,58	2,93	1,60	7156,81	6,06	28,28	1,60
Katechin	17,96	0,29	104,10	8,79	116,98	3,92	193,77	1,14	191,44	1,14	216,64	3,12
Kyselina chlorogenová	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	22,44	1,00	7,68	0,48
Kyselina vanilová	4,40	0,35	22,87	0,28	N.D.	-	43,24	0,69	48,68	0,68	106,67	0,45
Kyselina kávová	58,74	1,66	53,32	0,42	207,69	0,22	96,25	1,26	926,40	0,33	15,10	0,45
Kyselina syringová	8,68	0,15	N.D.	-	49,73	0,15	N.D.	-	49,09	0,17	1,02	0,05
Epikatechin	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	1639,26	33,15	17,68	0,41
Kyselina trans-p-kumarová	10,46	0,17	1,46	0,01	46,78	0,01	1,81	0,07	21,47	0,20	5,97	0,11
Kyselina ferulová	3,97	0,17	496,44	2,33	13,21	2,48	955,70	3,95	192,62	3,40	2360,40	6,82
Kyselina sinapová	34,44	1,51	42,73	0,44	383,21	1,67	62,12	0,72	949,33	6,87	174,53	0,44
Kyselina elagová	4,37	0,63	0,78	0,05	37,01	0,88	1,79	0,28	504,80	4,40	8,39	0,34

Polyfenolická látka	SŠ_5 bio etanol		SH_2 etanol		SŠ_5 bio metanol		SH_2 metanol		SŠ_5 bio voda		SH_2 voda	
	Obsah (µg/g)	s	Obsah (µg/g)	s	Obsah (µg/g)	s	Obsah (µg/g)	s	Obsah (µg/g)	s	Obsah (µg/g)	s
Rutin	31,38	0,11	97,67	0,31	157,73	1,85	212,51	0,93	2264,45	3,31	41,81	2,76
Kyselina trans- hydroxyskořicová	3,81	0,08	N.D.	-	18,03	0,06	0,31	0,04	48,57	0,38	9,13	0,04
Etyl ester kyseliny protokatechové	409,93	0,36	447,81	0,56	1778,49	17,92	811,77	0,02	3738,91	3,19	47,28	0,01
Resveratrol	9,43	0,51	2,60	0,15	23,92	0,25	2,57	0,07	23,48	1,15	40,53	0,20
Kyselina trans-skořicová	N.D.	-	0,57	0,03	4,28	0,04	0,88	0,09	16,13	0,01	26,40	0,20
Kaempferol	N.D.	-	171,85	0,33	104,44	0,78	18,10	0,24	49,57	0,47	67,39	0,11
Kvercetin	36,69	0,22	1779,40	38,54	111,88	1,62	1614,92	3,49	248,06	7,53	29,18	0,14

N.D. – nedetekováno; s – směrodatná odchylka

Analýza heřmánkového etanolového extraktu provedená Mekinić a kol. [71] pomocí HPLC/DAD zjistila přítomnost 5 fenolových kyselin: protokatechové, gallové, skořicové, kávové a rozmarýnové. Nejvyšší koncentrace byla zaznamenána u kyseliny rozmarýnové (71,3 mg/l), jejíž přítomnost byla potvrzena i pomocí HPLC/MS [71].

Podobně, Dent a kol. [72] provedli analýzu etanolových extraktů šalvěje lékařské pomocí HPLC/DAD. V extraktech identifikovali několik polyfenolických sloučenin, včetně kyseliny rozmarýnové, chlorogenové, katechinu, epikatechinu, kyseliny salvianolové I a K, apigenin-7-O-glukosidu a luteolin-7-glukuronidu [72].

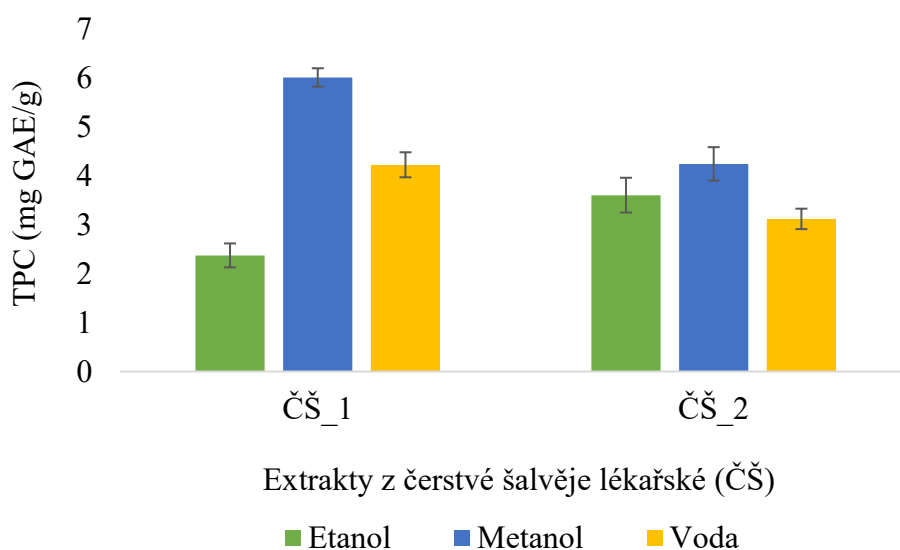
Výsledky analýz ukazují, že ve zkoumaných extraktech byly nalezeny látky, které odpovídají sloučeninám identifikovaným v extraktech připravených v této diplomové práci. Mezi tyto látky patří například kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina skořicová, katechin či epikatechin.

9.2 Stanovení obsahu celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla

V rámci experimentu byly připraveny extrakty ze sušené/čerstvé šalvěje lékařské a sušeného heřmánku pravého (8.1) s cílem analyzovat vliv použitého rozpouštědla na extrakci polyfenolických sloučenin. Pro tento účel byly připraveny etanolové, metanolové a vodné extrakty. Následně byl ve všech extraktech spektrofotometricky stanoven obsah celkových polyfenolů (TPC) dle postupu uvedeného v kapitole 8.3. Získané výsledky TPC byly graficky znázorněny, což umožnilo srovnání extrakční účinnosti jednotlivých rozpouštědel. TPC je vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové v miligramech na gram vzorku (mg GAE/g).

9.2.1 Stanovení obsahu celkových polyfenolů v extraktech z čerstvé šalvěje lékařské

Kromě extraktů ze sušené šalvěje bylo připraveno také 6 extraktů z čerstvé šalvěje, kdy 2 extrakty byly etanolové, 2 metanolové a 2 vodné. Získané výsledky TPC jsou uvedeny graficky na *Obr. 18*.



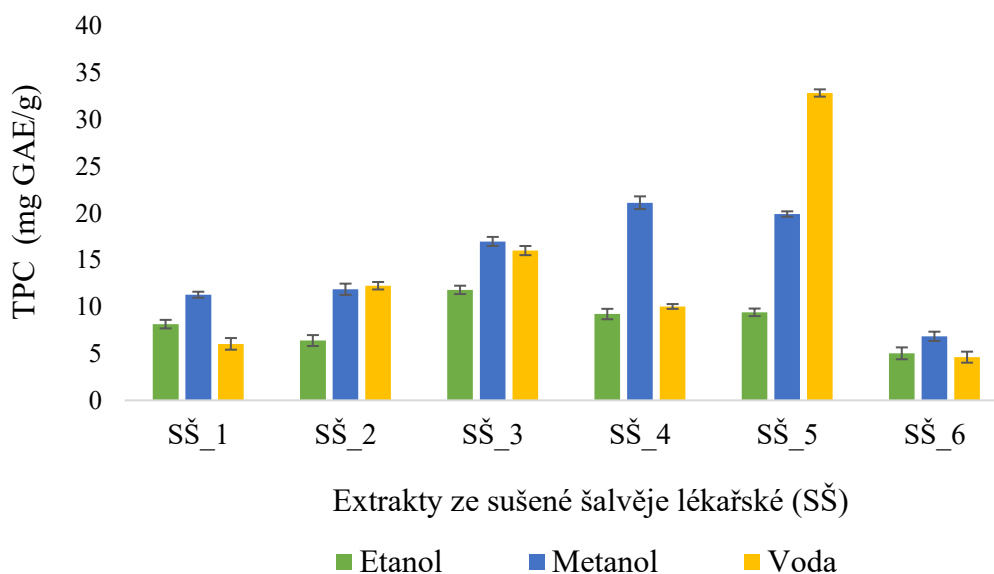
Obr. 18: TPC v extraktech z čerstvé šalvěje lékařské

Výsledky analýzy obsahu celkových polyfenolů (TPC) ukázaly, že nejvyšší množství polyfenolů bylo kvantifikováno v metanolech extraktech u obou zkoumaných vzorků. Konkrétně, u vzorku ČŠ_1 byl zjištěn TPC 6,01 mg GAE/g a u ČŠ_2 4,25 mg GAE/g. Nejnižší množství TPC bylo stanoveno vzorku ČŠ_1 v etanolovém extraktu (2,37 mg GAE/g), zatímco vzorku ČŠ_2 to bylo u vodného extraktu.

V porovnání s metanolech extrakty vykazovaly etanolové extrakty o 41,70 % menší TPC a vodné extrakty o 28,37 % menší TPC.

9.2.2 Stanovení obsahu celkových polyfenolů v extraktech ze sušené šalvěje lékařské

Byla provedena komplexní analýza, která zahrnovala celkem 18 extraktů získaných ze sušené šalvěje lékařské. Tyto extrakty byly připraveny s použitím tří různých rozpouštědel: metanolu, etanolu a vody. Výsledky analýzy obsahu celkových fenolických sloučenin (TPC) v jednotlivých extraktech ze sušené šalvěje jsou prezentovány Obr. 19.



Obr. 19: TPC v extraktech ze sušené šalvěje lékařské

Nejvyšší obsah polyfenolů byl kvantifikován ve vodném extraktu bio vzorku SŠ_5, a to 32,86 mg GAE/g. Tato hodnota výrazně převyšovala ostatní naměřené hodnoty, přičemž druhý nejvyšší výsledek u vodných extraktů byl zaznamenán u vzorku SŠ_3 (16,01 mg GAE/g), což představuje o 51,28 % nižší hodnotu. Kromě bio vzorku SŠ_5 byl nejvyšší TPC ve vodném extraktu stanoven ještě u vzorku SŠ_2 (12,25 mg GAE/g).

U ostatních vzorků byly nejvyšší hodnoty TPC naměřeny u metanolových extraktů. Nejvyšší obsah polyfenolů byl zjištěn u metanolového extraktu vzorku SŠ_4, s hodnotou 21,13 mg GAE/g. Dalšími vzorky s vysokým TPC v metanolovém extraktu byly bio SŠ_5 (19,92 mg GAE/g) a SŠ_3 (16,99 mg GAE/g).

Naopak, nejnižší hodnoty TPC byly zaznamenány u všech etanolových extraktů, přičemž nejvyšší hodnota v této skupině byla naměřena u vzorku SŠ_3 (11,81 mg GAE/g), následovaného bio vzorkem SŠ_5 (9,41 mg GAE/g).

Vzorek SŠ_6 vykazoval nejnižší TPC ve všech testovaných extraktech. Etanolový extrakt vykazoval TPC 5,03 mg GAE/g, metanolový extrakt 6,85 mg GAE/g a vodný extrakt 4,62 mg GAE/g.

Z naměřených výsledků lze konstatovat, že s výjimkou metanolového extraktu vykazovaly nejvyšší hodnoty TPC vzorky bio SŠ_5 a SŠ_3.

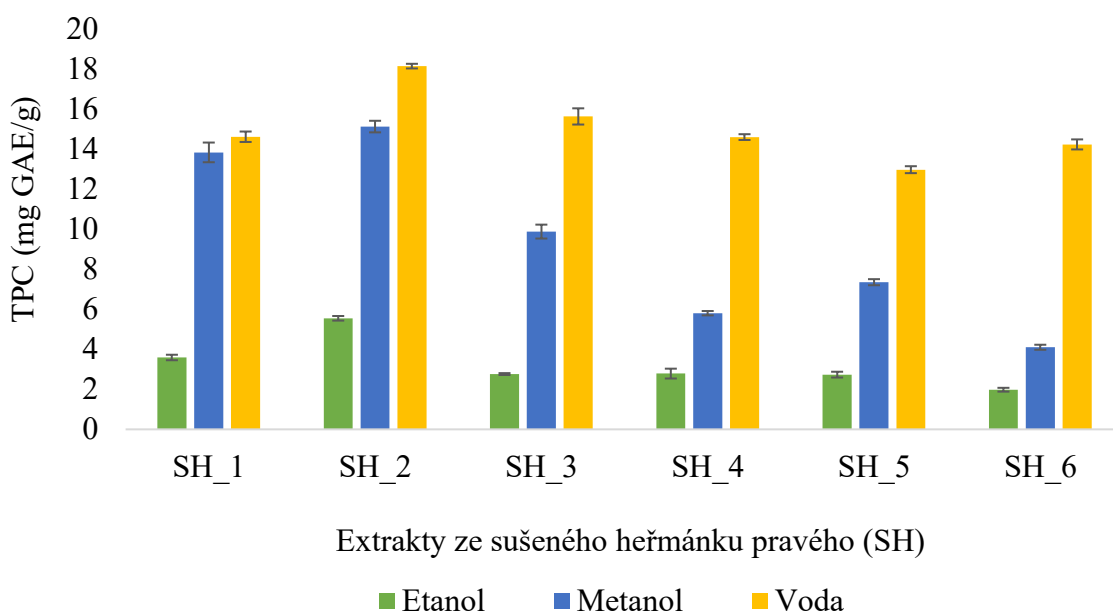
Průměrný obsah polyfenolů byl u etanolových extraktů o 43,19 % menší a u vodných extraktů o 7,08 % menší než u metanolových extraktů.

Na analýzu extraktů připravených z čerstvé šalvěje lékařské se zaměřila Svydenko [73]. Zjištěné hodnoty TPC se u jejich vzorků pohybovaly v rozmezí 24,52–95,62 mg GAE/g v závislosti na použité části rostliny [73]. V rámci této práce byly u etanolových extraktů z čerstvé šalvěje naměřeny hodnoty TPC 2,37 a 3,51 mg GAE/g a u sušené šalvěje 5,03–11,81 mg GAE/g. Hodnoty TPC stanovené v citované studii byly tedy podstatně vyšší než výsledky získané v této diplomové práci. Za těmito rozdíly může být jiná použitá část rostliny, její původ a další charakteristiky, odlišný postup extrakce, a specifika stanovení danou metodou.

Cílem studie Khiya a kol. [74] bylo stanovit TPC v extraktech z listů šalvěje lékařské. Při porovnání vzorků šalvěje lékařské ze dvou různých oblastí bylo zjištěno, že nejvyšší TPC byl kvantifikován ve vodných extraktech, a to v prvním vzorku 85,1 mg GAE/g a ve druhém 176,5 mg GAE/g. Nejvyšší hodnota TPC v této diplomové práci byla stanovena u vodného extraktu sušeného vzorku (32,86 mg GAE/g). Námi zjištěné hodnoty se i v tomto případě liší, což pravděpodobně souvisí s výše uvedenými důvody.

9.2.3 Stanovení obsahu celkových polyfenolů v extraktech ze sušeného heřmánku pravého

Celkem bylo pro účely srovnání připraveno 18 extraktů (6 metanolových, 6 etanolových, 6 vodných) z různých komerčních vzorků sušeného heřmánku. Výsledky TPC jsou zobrazeny na *Obr. 20*.



Obr. 20: TPC v extraktech ze sušeného heřmánku pravého

Z provedených měření je patrné, že nejvyšší hodnoty TPC byly zaznamenány u vodných heřmánkových extraktů. Nejvyšší TPC byl naměřen u vzorku SH_2 (18,16 mg TE/g), SH_3 (15,64 mg TE/g) a SH_1 (14,63 mg TE/g). Nejnižší TPC byl zjištěn u bio vzorku SH_5 (12,98 mg TE/g). Rozdíly mezi jednotlivými vodnými extrakty heřmánku nebyly tak výrazné, přičemž nejvyšší hodnota se od nejnižší lišila o 28,52 %.

Po vodných extraktech vykazovaly druhé nejvyšší hodnoty TPC metanolové extrakty. I zde byl nejvyšší obsah fenolických sloučenin kvantifikován u vzorku SH_2 (15,14 mg TE/g) a SH_1 (13,84 mg TE/g). Nejnižší TPC byl opět naměřen vzorku SH_6 (4,19 mg TE/g), kdy rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou činil 72,92 %.

Etanolové extrakty vykazovaly nejnižší obsah TPC. Hodnoty se značně lišily od vodných a metanolových extraktů, a byly znatelně nižší. Nejvyšší TPC byl zaznamenán u vzorku SH_2 (5,55 mg TE/g) a SH_1 (3,59 mg TE/g). Nejnižší pak u vzorku SH_6 (1,98 TE mg/g).

Z výsledků měření vyplývá, že nejvyšší TPC byl zjištěn u vzorku SH_2, jak u vodného, tak metanolového i etanolového extraktu. Naopak nejnižší TPC byl naměřen u vodného bio extraktu SH_5 a u alkoholových extraktů SH_6.

Celkový obsah polyfenolických látek byl v etanolových a metanolových extraktech výrazně nižší oproti extraktům vodným, a to o 78,49 %, respektive 37,81 %.

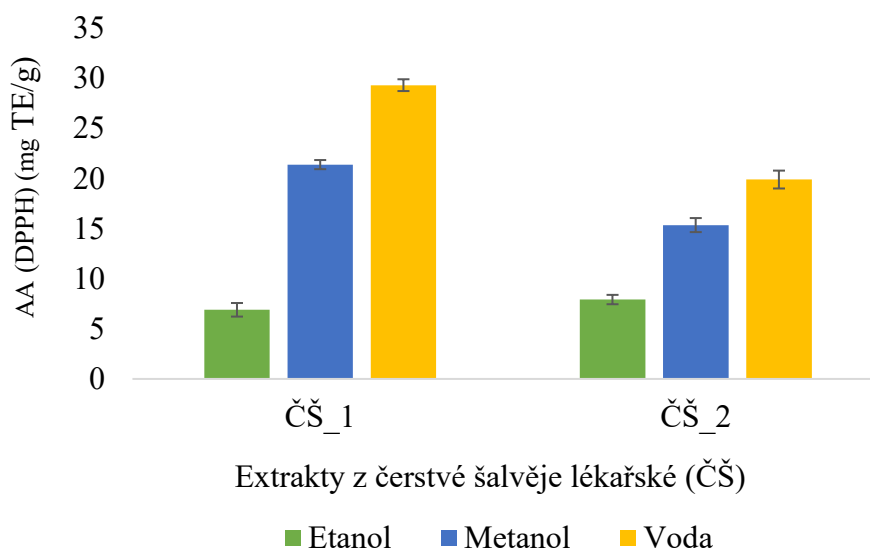
Ve studii, kterou provedl Ašimović a kol. [75] byl kvantifikován TPC v heřmánkovém extraktu, přičemž jako extrakční činidlo byla použita směs vody a etanolu v poměru 30:70. Extrakce byla provedena při čtyřech různých teplotách: 50 °C, 60 °C, 70 °C a 80 °C. Maximální koncentrace TPC, 11,34 mg GAE/g, byla zjištěna při extrakční teplotě 80 °C. V rámci našeho experimentu byl TPC detekován v rozmezí 12,98 až 18,16 mg GAE/g u vodných extraktů a v rozmezí 1,98 až 5,55 mg GAE/g u etanolových extraktů. Z výsledků našich měření vyplývá, že vodné extrakty vykazovaly vyšší obsah TPC ve srovnání s citovanou studií, zatímco etanolové extrakty měly obsah polyfenolů nižší. Nicméně, přímé srovnání těchto výsledků je limitováno použitím směsi obou rozpouštědel a jinou extrakční teplotou.

9.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH

Pro stanovení antioxidační aktivity připravených heřmánkových a šalvějových extraktů byla použita spektrofotometrická metoda s využitím DPPH činidla, jak je popsáno v metodické části této práce (8.4). Cílem bylo srovnat vliv různých extrakčních rozpouštědel (metanol, etanol, demineralizovaná voda) na AA těchto extraktů. Výsledky stanovení byly zaznamenány graficky. AA byla kvantifikována jako mg ekvivalentu troloxu na gram vzorku (mg TE/g).

9.3.1 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH v extraktech z čerstvé šalvěje lékařské

Pro stanovení AA pomocí DPPH bylo připraveno 6 extraktů (2 metanolové, 2 etanolové, 2 vodné) z čerstvé šalvěje získané z domácího pěstitelství. Výsledky měření jsou zaznamenány na *Obr. 21*.



Obr. 21: AA (DPPH) v extraktech z čerstvé šalvěje lékařské

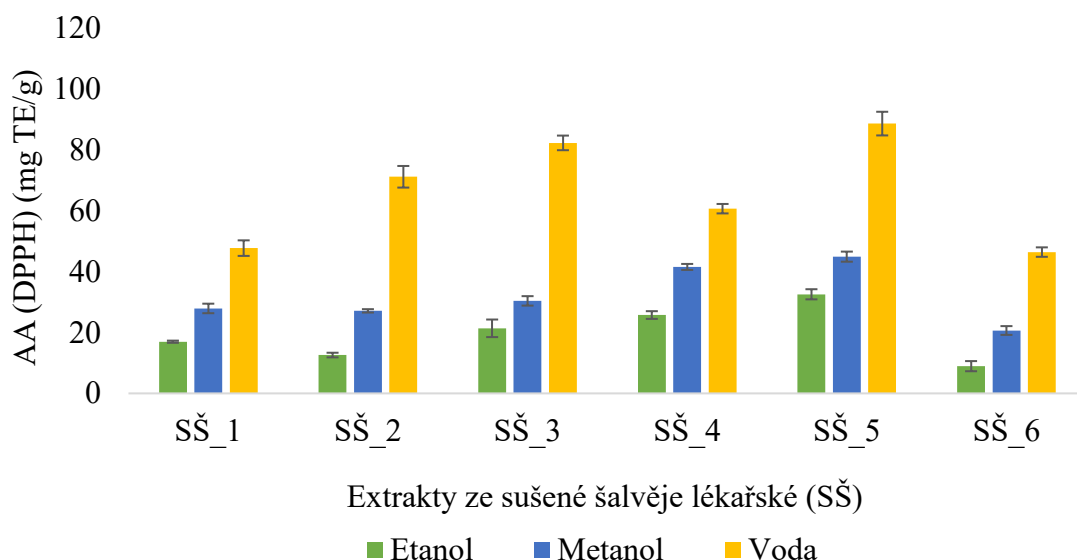
Při analýze antioxidační aktivity dvou vzorků z čerstvé šalvěje lékařské (ČŠ_1 a ČŠ_2) byly nejvyšší hodnoty zaznamenány u obou vzorků u vodných extraktů následovanými metanolovými extrakty a etanolovými extrakty. Konkrétně u vzorku ČŠ_1 byly hodnoty AA následující: vodný extrakt (29,33 mg TE/g), metanolový extrakt (21,40 mg TE/g) a etanolový extrakt (6,90 mg TE/g). U vzorku ČŠ_2 byly zjištěny tyto hodnoty: vodný extrakt (19,91 mg TE/g), metanolový extrakt (15,36 mg TE/g) a etanolový extrakt (7,93 mg TE/g).

Z těchto výsledků vyplývá, že jako nejúčinnější rozpouštědlo pro extrakci látek s antioxidačním potenciálem ze šalvěje se jeví voda. Tento výsledek úplně nekoresponduje s výsledky TPC (9.2.1), kde se jako nejlepší rozpouštědlo ukázal metanol.

Vodné extrakty vykazovaly nejvyšší antioxidační aktivitu, následované metanolovými extrakty (o 25,34 % nižší) a etanolovými extrakty (o 69,88 % nižší).

9.3.2 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH v extraktech ze sušené šalvěje lékařské

Pro vyhodnocení antioxidačních vlastností pomocí metody DPPH sušené šalvěje lékařské bylo připraveno osmnáct extraktů, konkrétně šest metanolových, šest etanolových a šest vodných. Výsledky tohoto stanovení jsou prezentovány v grafické podobě na Obr. 22.



Obr. 22: AA (DPPH) v extraktech ze sušené šalvěje lékařské

Výsledky analýzy ukázaly, že vodné extrakty sušené šalvěje lékařské vykazovaly nejvyšší antioxidační aktivitu. V rámci vodných extraktů byla nejvyšší AA zjištěna u vzorku SŠ_5 bio, a to 88,72 mg TE/g. Vysoké hodnoty AA byly kvantifikovány u vzorků SŠ_3 (82,38 mg TE/g) a SŠ_2 (71,23 mg TE/g). Oproti tomu nejnižší AA byla stanovena u vzorku SŠ_6 (46,47 mg TE/g), což je o 47,62 % méně než u vzorku SŠ_5 bio.

Metanol se ukázal jako druhé nejúčinnější rozpouštědlo. U metanolových extraktů byly nejvyšší hodnoty AA opět naměřeny u vzorku SŠ_5 bio (44,96 mg TE/g), dále u SŠ_4 (41,58 mg TE/g) a SŠ_3 (30,42 mg TE/g). Nejnižší hodnota byla opět zaznamenána u vzorku SŠ_6 (20,68 mg TE/g).

Etanol se jeví jako nejméně účinné extrakční rozpouštědlo. Nejvyšší hodnoty AA byly naměřeny u vzorku SŠ_5 bio (32,59 mg TE/g), SŠ_4 (25,77 mg TE/g) a SŠ_3 (21,40 mg TE/g). Nejnižší hodnota byla opět kvantifikována u vzorku SŠ_6 (8,96 mg TE/g).

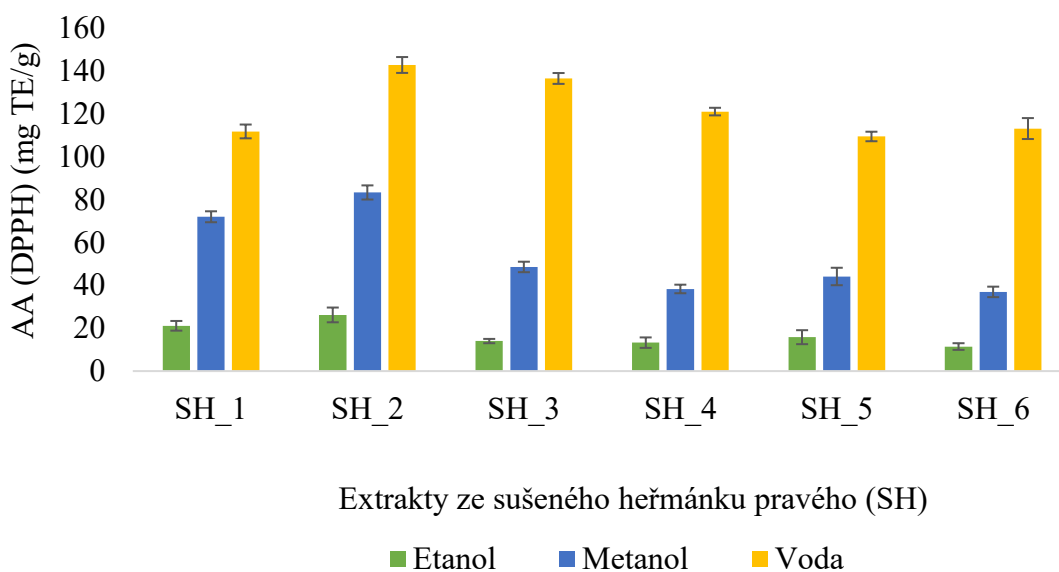
Z výsledků měření vyplývá, že nejvyšší AA byla zaznamenána u bio vzorku SŠ_5 a nejnižší SŠ_6, což je v souladu s výsledky stanovení TPC (9.2.2). Nicméně, existují rozdíly v účinnosti použitých extrakčních rozpouštědel. Při stanovení TPC u vzorku SŠ_6 se ukázalo jako nejúčinnější rozpouštědlo voda, následovaná etanolem a metanolem. Kdežto, při stanovení AA pomocí DPPH byla účinnost rozpouštědel v pořadí: voda, metanol a etanol.

Ve srovnání s vodnými extrakty vykazovaly etanolové extrakty značné snížení antioxidační aktivity, konkrétně o 70,22 %, zatímco u vodných extraktů byl tento pokles menší, a to 51,49 %.

Stanovení AA šalvěje provedla Svydenko [73] pomocí metody DPPH. V etanolových extraktech z čerstvé šalvěje se naměřené hodnoty AA pohybovaly v rozmezí 6,05–8,59 mg TE/g. V porovnání s výsledky této práce, lze konstatovat, že námi zjištěné hodnoty jsou velmi podobné, neboť u extraktů z čerstvé šalvěje byly naměřeny hodnoty 6,90 a 7,93 mg TE/g. Naopak u extraktů ze sušené šalvěje byly hodnoty AA podstatně vyšší, dosahující až 32,59 mg TE/g.

9.3.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH v extraktech ze sušeného heřmánku pravého

Za účelem stanovení AA pomocí DPPH bylo připraveno 6 metanolových, 6 etanolových a 6 vodných extraktů z heřmánku pravého. Výsledky analýzy jsou graficky znázorněny na Obr. 23.



Obr. 23: AA (DPPH) v extraktech ze sušeného heřmánku pravého

V rámci tohoto experimentu bylo prokázáno, že vodné extrakty z heřmánku vykazují nejvyšší AA. Nejvyšší AA byla naměřena u vzorků SH_2 (142,84 mg TE/g) a SH_3 (136,55 mg TE/g), zatímco nejnižší AA byla zjištěna u vzorku SH_5 bio (109,48 mg TE/g), což představuje o 23,35 % méně než u SH_2.

U metanolových extraktů byla opět nejvyšší AA kvantifikována u SH_2 (83,35 mg TE/g), následovaná SH_1 (72,01 mg TE/g) a nejnižší u SH_6 (36,96 mg TE/g).

Etanoloové extrakty vykazovaly výrazně nižší AA než vodné a metanoloové extrakty, s rozdílem 81,65 % mezi vodným a etanoloovým extraktem SH_2. Nejvyšší AA u etanoloových extraktů byla nalezena u SH_2 (26,21 mg TE/g) a nejnižší u SH_6 (11,45 mg TE/g).

Lze tedy konstatovat, že nejúčinnějším extrakčním rozpouštědlem je voda, následovaná metanolem a etanolem. Nejvyšší AA byly zaznamenány u vzorku SH_2 ve všech třech typech extraktů. Nejnižší AA u vodných extraktů byla zjištěna u bio vzorku SH_5 a u etanoloových a metanoloových extraktů shodně u vzorku SH_6. V porovnání s výsledky TPC lze říci, že hodnoty TPC korespondují s hodnotami stanovení AA pomocí DPPH.

AA u metanoloových extraktů byla o 86,14 % nižší a u etanoloových extraktů o 56,00 % nižší ve srovnání s vodnými extrakty.

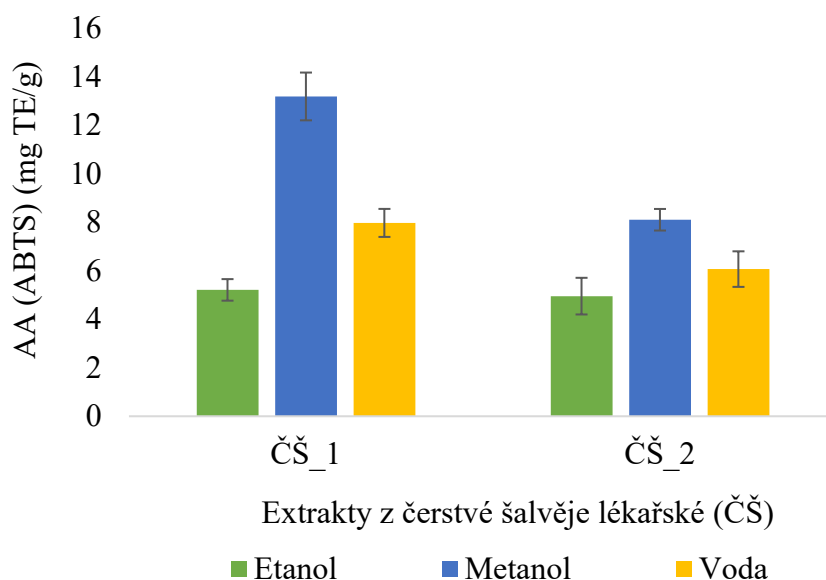
Studie Tsivelika a kol. [76] se zaměřila na stanovení antioxidační aktivity v heřmánkových extraktech, které byly připraveny extrakcí sušených květů 100% metanolem a následně směsí metanolu a vody (70:30). V této studii byla antioxidační aktivita měřena pomocí DPPH a pohybovala se v rozmezí 136,68-101,57 mg TE/g. Naše vlastní analýza extraktů ze sušeného heřmánku ukázala u metanoloových extraktů AA v rozmezí 83,35-36,96 mg TE/g a u vodných extraktů v rozmezí 142,84-109,48 mg TE/g. Z těchto výsledků je patrná podobnost mezi AA stanovenou v citované studii a námi zjištěnou AA u vodných extraktů. Přímé srovnání však není možné z důvodu odlišných podmínek extrakce, rozdílných vzorků heřmánku a použitého extrakčního rozpouštědla. Nicméně, i přes tyto rozdíly výsledky jasně ukazují, že heřmánek vykazuje významnou antioxidační aktivitu.

9.4 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Antioxidační aktivita byla stanovena také pomocí ABTS metody, která je založena na reakci s kation-radikálem ABTS (8.5). Byly analyzovány metanoloové, etanoloové a vodné extrakty, přičemž byl hodnocen vliv použitého rozpouštědla na antioxidační aktivitu. Výsledky byly vyjádřeny jako mg ekvivalentu troloxu na gram vzorku (mg TE/g).

9.4.1 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS v extraktech z čerstvé šalvěje lékařské

AA byla stanovena pomocí metody využívající ABTS u 2 vodných, 2 etanolových a 2 metanolových extraktů připravených z listů a nati čerstvé šalvěje. Naměřené hodnoty jsou zobrazeny na *Obr. 24*.



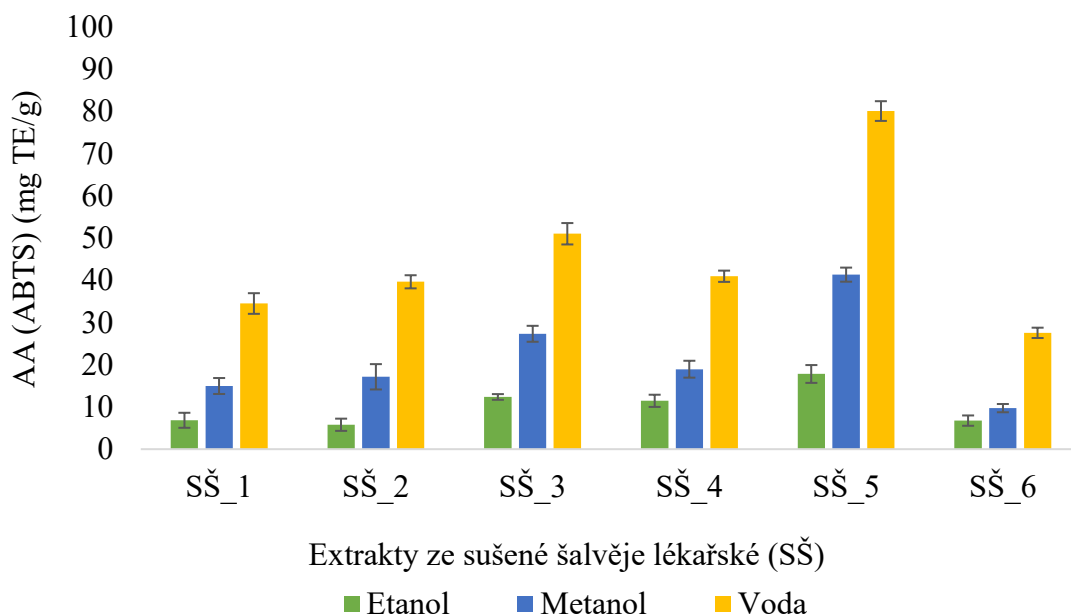
Obr. 24: AA (ABTS) v extraktech z čerstvé šalvěje lékařské

Analýza antioxidační aktivity extraktů z čerstvé šalvěje ukázala, že nejvyšší hodnoty byly naměřeny v metanolových extraktech. U vzorků dosáhla hodnot 13,19 a 8,11 mg TE/g. Druhou v pořadí účinnosti s ohledem k extrakčnímu rozpouštědлу se jevila voda, kde hodnoty AA dosahovaly 7,98 a 6,07 mg TE/g. Nejnižší hodnoty byly zaznamenány u etanolových extraktů, a to 5,21 a 4,96 mg TE/g.

Tyto naměřené výsledky AA pomocí metody ABTS se ne úplně shodují s výsledky získanými s metodou DPPH. Zatímco u metody ABTS byla nejvyšší AA naměřena u metanolových extraktů, u metody DPPH byly nejvyšší hodnoty zaznamenány u vodných extraktů. U etanolových extraktů byla zaznamenána o 52,26 % nižší AA ve srovnání s metanolovými extrakty a u vodných extraktů byl tento rozdíl 34,05 %.

9.4.2 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS v extraktech ze sušené šalvěje lékařské

Celkem u 18 extraktů připravených ze sušené šalvěje lékařské byla analyzována antioxidační aktivita pomocí ABTS. Tyto extrakty byly připraveny s použitím metanolu, etanolu a vody jako rozpouštědel. Výsledky této analýzy jsou graficky znázorněny na *Obr. 25*.



Obr. 25: AA (ABTS) v extraktech ze sušené šalvěje lékařské

U extraktů připravených ze sušené šalvěje se ukázalo, že nejvyšší hodnoty AA byly naměřeny u vodných extraktů. Konkrétně, bio vzorek SŠ_5 dosáhl hodnoty 80,07 mg TE/g, což významně převyšovalo ostatní vzorky. Rozdíl oproti druhému nejvyššímu vzorku SŠ_3 s hodnotou 51,01 mg TE/g činil 36,29 %. Nejnižší AA byla zaznamenána u vzorku SŠ_6 (27,55 mg TE/g), což představuje o 65,59 % nižší hodnotu než u bio SŠ_5.

U metanolových extraktů byly opět nejvyšší hodnoty AA naměřeny u bio vzorku SŠ_5 (41,33 mg TE/g) a SŠ_3 (27,32 mg TE/g), zatímco nejnižší hodnota byla stanovena znovu u vzorku SŠ_6 (9,72 mg TE/g).

U etanolových extraktů byly naměřeny nejnižší hodnoty, v rozmezí 5,78-17,81 mg TE/g. Nejvyšší AA byla naměřena opět u bio SŠ_5, a to 17,81 mg TE/g, a vzorku SŠ_3, a to 12,36 mg TE/g. Nejnižší hodnota byla tentokrát naměřena u vzorku SŠ_2, a to 5,78 mg TE/g.

Ze získaných výsledků analýz je patrné, že nejvyšší AA, stanovená metodou ABTS, byla detekována u vzorků SŠ_5 bio a SŠ_3, a to ve všech použitých rozpouštědlech (voda,

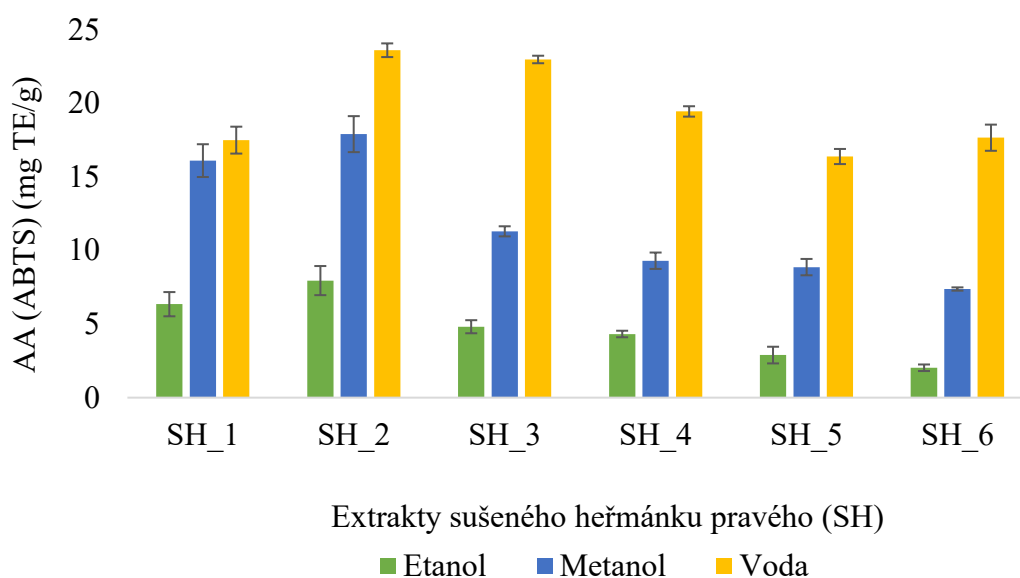
metanol, etanol). Stejně jako u předchozího stanovení AA metodou DPPH se voda ukázala jako nejúčinnější extrakční rozpouštědlo. Shodně nejvyšší AA byla v obou metodách (ABTS i DPPH) naměřena u bio vzorku SŠ_5. S výjimkou etanolového extraktu u metody ABTS, byla nejnižší AA u obou metod zaznamenána u vzorku SŠ_6.

Jak metanolové, tak i etanolové extrakty vykazovaly podstatně nižší antioxidační aktivitu v porovnání s vodnými extrakty. Konkrétně u etanolových extraktů došlo ke snížení AA o 77,35 % a u metanolových extraktů o 52,16 % oproti vodným extraktům.

Gad a kol. [77] analyzovali silice ze tří druhů šalvěje. Nadzemní části rostlin byly usušeny a silice byly získány destilací s vodní párou. Metodou ABTS byla následně u vzorků zjištěna antioxidační aktivita, v průměrné hodnotě 55,7 mg/g. Porovnání našich výsledků s hodnotami z této studie není možné, neboť tato studie analyzovala silice, jiný typ produktu než v našich měřeních, kde se analýza zaměřila na louhované extrakty.

9.4.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS v extraktech ze sušeného heřmánku pravého

Pomocí metody ABTS byla analyzována antioxidační aktivita 18 extraktů ze sušeného heřmánku, které byly připraveny s použitím tří různých rozpouštědel: metanolu, etanolu a vody (6 extraktů s využitím daného rozpouštědla). Naměřené hodnoty jsou zobrazeny graficky na *Obr. 26*.



Obr. 26: AA (ABTS) v extraktech ze sušeného heřmánku pravého

Vodné extrakty připravené ze sušeného heřmánku pravého vykazovaly nejvyšší antioxidační aktivitu. Nejvyšší hodnota AA byla naměřena u vzorku SH_2 (23,60 mg TE/g) a SH_3 (22,97 mg TE/g). Naopak nejnižší AA mezi vodnými extrakty byla zaznamenána u bio vzorku SH_5, a to 16,38 mg TE/g.

U analýzy metanolových extraktů se naměřené hodnoty AA pohybovaly v rozmezí 7,38 až 17,90 mg TE/g. Nejvyšší hodnotu opět vykazoval vzorek SH_2 s 17,90 mg TE/g, následovaný SH_1 (16,10 mg TE/g) a SH_3 (11,30 mg TE/g). Nejnižší AA byla zjištěna u vzorku SH_6, a to 7,38 mg TE/g.

Etanolové extrakty vykazovaly ze všech testovaných rozpouštědel nejnižší antioxidační aktivitu. Nejvyšší AA byla stanovena opět u SH_2 (7,95 mg TE/g), SH_1 (6,36 mg TE/g) a SH_3 (4,82 mg TE/g). Nejnižší hodnota AA byla stanovena u vzorku SH_6, a to 2,03 mg TE/g, což představuje o 68,03 % nižší hodnotu než u vzorku SH_2.

Výsledky potvrdily účinnost extrakčních rozpouštědel v pořadí voda, metanol a etanol. Nejvyšší AA byla naměřena u vzorku SH_2, což odpovídá i výsledkům měření pomocí metody DPPH. Stejně tak bylo potvrzeno, že nejnižší AA u vodných extraktů byla pozorována u bio vzorku SH_5 a u alkoholových extraktů u vzorku SH_6.

Naměřená AA byla u metanolových extraktů o 39,73 % nižší a u etanolových extraktů o 75,88 % nižší oproti vodným extraktům.

Antioxidační aktivita u heřmánkových extraktů, podrobněji popsanych v kapitole 9.3.3 byla stanovena nejen pomocí DPPH, ale i pomocí ABTS metody. Hodnoty AA získané metodou ABTS se pohybovaly v rozmezí 58,27 až 72,44 mg TE/g, které jsou znatelně nižší než hodnoty naměřené pomocí DPPH (101,57 až 136,68 mg TE/g). V této diplomové práci byla hodnota ABTS u extraktů ze sušeného heřmánku kvantifikována v rozmezí 7,38 až 17,90 mg TE/g u metanolových extraktů a 16,38 až 23,60 mg TE/g u vodných extraktů.

Extrakty, které připravili Tsivelika a kol. [76], vykazovaly vyšší AA než extrakty připravené v této práci. Nicméně v těchto analýzách byly použity jiné podmínky extrakce.

ZÁVĚR

Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*) a heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*) jsou aromatické rostliny vyznačující se pestrou škálou farmakologických účinků, včetně prozánětlivých, antimikrobiálních či antioxidačních. Právě antioxidační účinky jsou dány přítomností různých fytochemikálií, jako jsou kyselina karnosová, kyselina rozmarýnová, deriváty kyseliny kávové, apigenin a rutin, které neutralizují volné radikály.

Cílem této diplomové práce bylo stanovit celkový obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu v metanolových, etanolových a vodných extraktech šalvěje a heřmánku. Obsah polyfenolů byl kvantifikován spektrofotometricky s Folin-Ciocalteuovým činidlem a také pomocí techniky HPLC/DAD. Antioxidační aktivita byla stanovena spektrometricky s využitím dvou činidel ABTS a DPPH.

Obsah celkových polyfenolů (TPC) pomocí Folin-Ciocalteuova činidla byl hodnocen u extraktů připravených ze čerstvé a sušené šalvěje a sušeného heřmánku. U extraktů připravených z čerstvé šalvěje bylo nejvyšší TPC zjištěno v metanolových extraktech. U extraktů připravených ze sušené šalvěje byl nejvyšší TPC určen u bio vzorku extrahovaného vodou. Avšak při porovnání všech zkoumaných vzorků bylo zjištěno, že metanol byl nejúčinnějším extrakčním činidlem polyfenolů ze sušené šalvěje. U všech zkoumaných vzorků ze sušeného heřmánku byl nejvyšší obsah celkových polyfenolů zjištěn ve vodných extraktech.

Přítomnost a množství jednotlivých polyfenolických látek bylo stanoveno pomocí HPLC/DAD ve vybraných etanolových, metanolových a vodných extraktech šalvěje a heřmánku. Všechny 22 sledovaných polyfenolických sloučenin bylo detekováno u vodných extraktů. V metanolovém, etanolovém i vodném extraktu bio šalvějového vzorku byl detekován vysoký obsah etylesteru kyseliny protokatechové a epigallokatechinu. Extrakty sušeného heřmánku obsahovaly značné množství kyseliny ferulové. Nejméně polyfenolických látek bylo zjištěno u obou rostlin v etanolových extraktech. Účinnost použitých extrakčních rozpouštědel klesala v následujícím pořadí: voda > metanol > etanol.

Při stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH byla nejvyšší AA zjištěna u vodných extraktů obou vzorků čerstvé šalvěje. V extraktech připravených ze sušené šalvěje byla nejvyšší antioxidační aktivita zjištěna u všech tří rozpouštědel u bio vzorku. Jako nejúčinnější rozpouštědlo se u všech vzorků jevila voda, dále metanol a etanol. U extraktů

ze sušeného heřmánku byla nejvyšší antioxidační aktivita naměřena u vodných extraktů. Zjištěné hodnoty AA u této rostliny odpovídají hodnotám TPC.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS prokázalo, že nejlepší extrakční rozpouštědlo u extraktů z čerstvé šalvěje byl metanol, následovaný vodou a etanolem. Co se týče AA u vzorků sušené šalvěje, nejvyšší AA byla zaznamenána u vodných extraktů, konkrétně nejvyšší AA vykazoval bio vzorek šalvěje. AA u heřmánkových extraktů byla opět nejvyšší u vodných extraktů.

Celkově lze konstatovat, že u vzorků čerstvé šalvěje se metanol ukázal jako nejlepší činidlo pro extrakci polyfenolických látek, což bylo prokázáno i výsledky AA stanovené metodou ABTS, zatímco u AA metodou DPPH byla nejúčinnější voda. U sušené šalvěje a heřmánku se voda jevila jako účinnější extrakční činidlo než metanol nebo etanol.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VERMA, Ram S.; PADALIA, Rajendra C. a CHAUHAN, Amit. Harvesting season and plant part dependent variations in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. grown in northern India. Online. *Journal of Herbal Medicine*. 2015, roč. 5, č. 3, s. 165-171. ISSN 22108033. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2015.04.004>. [cit. 2025-03-28].
- [2] KREUTER, Marie-Luise. *Bylinky nejlepší druhy a odrůdy : pěstování v souladu s přírodou - sklizeň - použití*. Praha: Rebo Productions, 2003. ISBN 80-7234-277-0.
- [3] GHORBANI, Ahmad a ESMAEILIZADEH, Mahdi. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. Online. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2017, roč. 7, č. 4, s. 433-440. ISSN 22254110. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.12.014>. [cit. 2025-01-12].
- [4] ELPINIKI, Skoufogianni a SOLOMOU, Alexandra. Ecology, Cultivation, Composition and Utilization of *Salvia officinalis* L. in Greece: A Review. Online. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*. 2017. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/327043526_Ecology_Cultivation_Composition_and_Utilization_of_Salvia_officinalis_L_in_Greece_A_Review. [cit. 2025-02-28].
- [5] POULIOS, Efthymios; GIAGINIS, Constantinos a VASIOS, Georgios K. Current State of the Art on the Antioxidant Activity of Sage (*Salvia* spp.) and Its Bioactive Components. Online. *Planta Medica*. 2020, roč. 86, č. 04, s. 224-238. ISSN 0032-0943. Dostupné z: <https://doi.org/10.1055/a-1087-8276>. [cit. 2025-04-15].
- [6] *Šalvěj lékařská (Salvia officinalis)*. Online. Herbalista.cz. Dostupné z: <https://www.herbalista.cz/bylinky/salvej-lekarska-salvia-officinalis/>. [cit. 2025-03-31].
- [7] WU, Bei-Yu; LIU, Chun-Ting; SU, Yu-Li; CHEN, Shih-Yu; CHEN, Yung-Hsiang et al. A review of complementary therapies with medicinal plants for chemotherapy-induced peripheral neuropathy. Online. *Complementary Therapies in Medicine*. 2019, roč. 42, s. 226-232. ISSN 09652299. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2018.11.022>. [cit. 2025-01-13].
- [8] ILIĆ, Zoran S.; KEVREŠAN, Žarko; ŠUNIĆ, Ljubomir; STANOJEVIĆ, Ljiljana; MILENKOVIĆ, Lidija et al. Chemical Profiling and Antioxidant Activity of Wild and Cultivated Sage (*Salvia officinalis* L.) Essential Oil. Online. *Horticulturae*. 2023, roč. 9, č. 6. ISSN 2311-7524. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/horticulturae9060624>. [cit. 2025-03-21].
- [9] MOHAMMED, Hamdoon A.; ELDEEB, Hussein M.; KHAN, Riaz A.; AL-OMAR, Mohsen S.; MOHAMMED, Salman A. A. et al. Sage, *Salvia officinalis* L., Constituents, Hepatoprotective Activity, and Cytotoxicity Evaluations of the Essential Oils Obtained from Fresh and Differently Timed Dried Herbs: A Comparative Analysis. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 19. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26195757>. [cit. 2025-01-29].
- [10] LU, Yinrong a YEAP FOO, L. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). Online. *Food Chemistry*. 2001, roč. 75, č. 2, s. 197-202. ISSN 03088146. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00198-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00198-4). [cit. 2025-02-10].

- [11] WALCH, Stephan. Antioxidant capacity and polyphenolic composition as quality indicators for aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). Online. *Frontiers in Pharmacology*. 2011, roč. 2. ISSN 16639812. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00079>. [cit. 2025-03-31].
- [12] JASICKA-MISIAK, Izabela; POLIWODA, Anna; PETECKA, Magdalena; BUSLOVYCH, Olena; SHLYAPNIKOV, Vladimir A. et al. Antioxidant Phenolic Compounds in *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* L. Online. *Ecological Chemistry and Engineering S*. 2018, roč. 25, č. 1, s. 133-142. ISSN 1898-6196. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/eces-2018-0009>. [cit. 2025-03-21].
- [13] ELUFIOYE, Taiwo O. a HABTEMARIAM, Solomon. Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action. Online. 2019, roč. 112. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108600>. [cit. 2025-02-11].
- [14] BAKOTA, Erica L.; WINKLER-MOSER, Jill K.; BERHOW, Mark A.; ELLER, Fred J. a VAUGHN, Steven F. Antioxidant Activity and Sensory Evaluation of a Rosmarinic Acid-Enriched Extract of *Salvia officinalis*. Online. *Journal of Food Science*. 2015, roč. 80, č. 4. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12837>. [cit. 2025-03-20].
- [15] KYSELINA ROZMARÝNOVÁ. Online. P-lab.cz. Dostupné z: <https://www.p-lab.cz/kyselina-rozmarynova>. [cit. 2025-02-11].
- [16] WANG, Hua; LIU, Fang; YANG, Lei; ZU, Yuangang; WANG, Han et al. Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage. Online. *Food Chemistry*. 2011, roč. 128, č. 1, s. 93-99. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.082>. [cit. 2025-03-29].
- [17] ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R. a LÖLIGERS, J. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. Online. *Xenobiotica*. 2008, roč. 22, č. 2, s. 257-268. ISSN 0049-8254. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/00498259209046624>. [cit. 2025-03-27].
- [18] MANTZOURANI, Christiana; TARANTILIS, Petros A. a KOKOTOU, Maroula G. Carnosic Acid and Carnosol: Analytical Methods for Their Determination in Plants, Foods and Biological Samples. Online. *Separations*. 2023, roč. 10, č. 9. ISSN 2297-8739. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/separations10090481>. [cit. 2025-02-15].
- [19] PAVIĆ, Valentina; JAKOVLJEVIĆ, Martina; MOLNAR, Maja a JOKIĆ, Stela. Extraction of Carnosic Acid and Carnosol from Sage (*Salvia officinalis* L.) Leaves by Supercritical Fluid Extraction and Their Antioxidant and Antibacterial Activity. Online. *Plants*. 2019, roč. 8, č. 1. ISSN 2223-7747. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/plants8010016>. [cit. 2025-02-15].
- [20] EBRU K, Fatma; A, Ayse a K, Caglar. Extraction and HPLC Analysis of Sage (*Salvia officinalis*) Plant. Online. 2017, roč. 05, č. 08. ISSN 23296836. Dostupné z: <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000298>. [cit. 2025-03-21].
- [21] EL MIHYAOUI, Amina; ESTEVES DA SILVA, Joaquim C. G.; CHARFI, Saoulajan; CANDELA CASTILLO, María Emilia; LAMARTI, Ahmed et al. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): A Review of Ethnomedicinal Use, Phytochemistry and Pharmacological Uses. Online. *Life*. 2022, roč. 12, č. 4. ISSN 2075-1729. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/life12040479>. [cit. 2025-01-13].
- [22] SINGH, Ompal; KHANAM, Zakia; MISRA, Neelam a SRIVASTAVA, ManojKumar. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. Online.

- Pharmacognosy Reviews*. 2011, roč. 5, č. 9. ISSN 0973-7847. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0973-7847.79103>. [cit. 2025-01-29].
- [23] ZACKER, Christina. *Domácí recepty proti nemocem: nejlepší recepty z babiččiny lékárničky*. Vyd. 2. Pro zdraví. V Praze: Ikar, 2003. ISBN 80-249-0306-7.
- [24] *Heřmánek pravý (Matricaria recutita)*. Online. Herbalista.cz. Dostupné z: <https://www.herbalista.cz/bylinky/hermanek-pravy-matricaria-recutita/>. [cit. 2025-01-15].
- [25] DAI, Yun-Lei; LI, Ying; WANG, Qi; NIU, Feng-Jv; LI, Kun-Wei et al. Chamomile: A Review of Its Traditional Uses, Chemical Constituents, Pharmacological Activities and Quality Control Studies. Online. *Molecules*. 2023, roč. 28, č. 1. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules28010133>. [cit. 2025-01-15].
- [26] T. NOBREGA, Ananda; A. L. WAGEMAKER, Tais a M. B. G. MAIA CAMPOS, Patricia. Antioxidant activity of *Matricaria chamomilla* L. extract and clinical efficacy of cosmetic formulations containing this extract and its isolated compounds. Online. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*. 2013, roč. 10, č. 2, s. 249-261. ISSN 2182-2379. Dostupné z: <https://doi.org/10.19277/BBR.10.2.69>. [cit. 2025-03-25].
- [27] HAJJAJ, Ghizlane; BOUNIHI, Amina; TAJANI, Mouha; CHERRAH, Yahia a ZELLOU, Amina. Evaluation of cns activities of *Matricaria chamomilla* L. essential oil in experimental animals from Morocco. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013, roč. 5, č. 2, s. 530 - 534. ISSN 09751491.
- [28] DE ANGELIS, Marella; AMICUCCI, Chiara; BANCHELLI, Martina; D'ANDREA, Cristiano; GORI, Antonella et al. Rapid determination of phenolic composition in chamomile (*Matricaria recutita* L.) using surface-enhanced Raman spectroscopy. Online. *Food Chemistry*. 2025, roč. 463. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141084>. [cit. 2025-02-10].
- [29] KARAASLAN AYHAN, Nagihan. Investigation of antioxidant properties of chamomile consumed as herbal tea. Online. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2021, roč. 45, č. 2. ISSN 0145-8892. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15327>. [cit. 2025-03-31].
- [30] AL-DABBAGH, Bayan; ELHATY, Ismail A.; ELHAW, Mohamed; MURALI, Chandrababha; AL MANSOORI, Ameera et al. Antioxidant and anticancer activities of chamomile (*Matricaria recutita* L.). Online. *BMC Research Notes*. 2019, roč. 12, č. 1. ISSN 1756-0500. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3960-y>. [cit. 2025-03-31].
- [31] MCKAY, Diane L. a BLUMBERG, Jeffrey B. A Review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). Online. *Phytotherapy Research*. 2006, roč. 20, č. 7, s. 519-530. ISSN 0951-418X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ptr.1900>. [cit. 2025-03-31].
- [32] SUDHESH DEV, Sareshma; FARGHADANI, Reyhaneh; ZAINAL ABIDIN, Syafiq Asnawi; OTHMAN, Iekhsan a NAIDU, Rakesh. Flavonoids as receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. Online. *Journal of Functional Foods*. 2023, roč. 110. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105845>. [cit. 2025-02-18].
- [33] SHUKLA, Sanjeev a GUPTA, Sanjay. Apigenin and Cancer Chemoprevention. Online. *Bioactive Foods in Promoting Health*. 2010, s. 663-689. ISBN

9780123746283. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374628-3.00041-4>. [cit. 2025-02-18].
- [34] *Apigenin*. Online. Chemimpex.com. Dostupné z: <https://www.chemimpex.com/products/42433>. [cit. 2025-02].
- [35] KWON, Eun-Young a CHOI, Myung-Sook. Polyphenols and Nutrigenetic/Nutrigenomic Associations With Obesity-Related Metabolic Diseases. Online. *Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics*. 2020, s. 327-334. ISBN 9780128045725. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804572-5.00044-6>. [cit. 2025-02-18].
- [36] SALEEM, Hammad; ANWAR, Sirajudheen; ALAFNAN, Ahmed a AHMAD, Nafees. Luteolin. Online. *A Century of Valuable Plant Bioactives*. 2021, s. 509-523. ISBN 9780128229231. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822923-1.00022-4>. [cit. 2025-02-18].
- [37] ISHIZAKI, Atsushi; MIURA, Akiko a KATAOKA, Hiroyuki. Determination of Luteolin and Apigenin in Herbal Teas by Online In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with LC–MS/MS. Online. *Foods*. 2024, roč. 13, č. 11. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods13111687>. [cit. 2025-03-25].
- [38] PERVIN, Monira; UNNO, Keiko; NAKAMURA, Yoriyuki a IMAI, Shinjiro. Luteolin Suppresses Ultraviolet A- and B-induced Matrix Metalloproteinase 1- and 9 Expression in Human Dermal Fibroblast Cells. Online. 2016, roč. 06, č. 06. ISSN 21559600. Dostupné z: <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000560>. [cit. 2025-02-18].
- [39] DU, Yan a CAI, Xue. Therapeutic potential of natural compounds from herbs and nutraceuticals in spinal cord injury: Regulation of the mTOR signaling pathway. Online. 2023, roč. 163. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114905>. [cit. 2025-02-18].
- [40] GUO, Yi a BRUNO, Richard S. Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. Online. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2015, roč. 26, č. 3, s. 201-210. ISSN 09552863. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.10.008>. [cit. 2025-02-18].
- [41] *KVERCETIN*. Online. P-lab.cz. Dostupné z: <https://www.p-lab.cz/kvercetin>. [cit. 2025-02-18].
- [42] PATEL, Kanika a PATEL, Dinesh Kumar. The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. Online. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*. 2019, s. 457-479. ISBN 9780128138205. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813820-5.00026-X>. [cit. 2025-02-22].
- [43] KRISHNAN, Uma Maheswari a SIVANANTHAM, Banudevi. Rutin and its application to amyotrophic lateral sclerosis. Online. *Treatments, Nutraceuticals, Supplements, and Herbal Medicine in Neurological Disorders*. 2023, s. 141-161. ISBN 9780323900522. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90052-2.00031-7>. [cit. 2025-02-22].
- [44] LAINA, Konstantina Theodora; DROSOU, Christina; STERGIOPOULOS, Chrysanthos; ELENi, Panagiota Maria a KROKIDA, Magdalini. Optimization of Combined Ultrasound and Microwave-Assisted Extraction for Enhanced Bioactive Compounds Recovery from Four Medicinal Plants: Oregano, Rosemary, Hypericum, and Chamomile. Online. *Molecules*. 2024, roč. 29, č. 23. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules29235773>. [cit. 2025-03-25].

- [45] VIJAYARAJ, Surendran; PALEI, Narahari N; ARCHANA, Devalapalli; LATHASRI, Kuppam a RAJAVEL, Ponnusamy. Quality by design (Qbd) approach to develop stability indicating HPLC method for estimation of rutin in chitosan-sodium alginate nanoparticles. Online. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020, roč. 56. ISSN 2175-9790. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/s2175-97902020000318793>. [cit. 2025-02-22].
- [46] VELJKOVIC, Emilija; XIA, Wenhao; PHILLIPS, Blaine; WONG, Ee Tsin; HO, Jenny et al. Other Compounds From Tobacco With Potential Impact on Neurodegenerative Diseases. Online. *Nicotine and Other Tobacco Compounds in Neurodegenerative and Psychiatric Diseases*. 2018, s. 83-97. ISBN 9780128129227. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812922-7.00010-X>. [cit. 2025-02-22].
- [47] PAWAR, Shubhangi H.; UPGANLAWAR, Aman B. a UPASANI, Chandrashekhar D. Therapeutic benefits of phenolic acids in peripheral neuropathy. Online. *Treatments, Nutraceuticals, Supplements, and Herbal Medicine in Neurological Disorders*. 2023, s. 753-771. ISBN 9780323900522. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90052-2.00036-6>. [cit. 2025-02-22].
- [48] NGUYEN, Vi; TAINE, Elaine G.; MENG, Dehao; CUI, Taixing a TAN, Wenbin. Chlorogenic Acid: A Systematic Review on the Biological Functions, Mechanistic Actions, and Therapeutic Potentials. Online. *Nutrients*. 2024, roč. 16, č. 7. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu16070924>. [cit. 2025-02-22].
- [49] *Chlorogenic acid*. Online. Acs.org. 2013. Dostupné z: <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/c/chlorogenic-acid.html>. [cit. 2025-02-22].
- [50] ESPÍNDOLA, Kaio Murilo Monteiro; FERREIRA, Roseane Guimarães; NARVAEZ, Luis Eduardo Mosquera; SILVA ROSARIO, Amanda Caroline Rocha; DA SILVA, Agnes Hanna Machado et al. Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. Online. *Frontiers in Oncology*. 2019, roč. 9. ISSN 2234-943X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00541>. [cit. 2025-02-27].
- [51] MEINHART, Adriana Dillenburg; CALDEIRÃO, Lucas; DAMIN, Fernanda Mateus; FILHO, José Teixeira a GODOY, Helena Teixeira. Analysis of chlorogenic acids isomers and caffeic acid in 89 herbal infusions (tea). Online. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018, roč. 73, s. 76-82. ISSN 08891575. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.08.001>. [cit. 2025-03-30].
- [52] LOSADA-BARREIRO, Sonia; SEZGIN-BAYINDIR, Zerrin; PAIVA-MARTINS, Fátima a BRAVO-DÍAZ, Carlos. Biochemistry of Antioxidants: Mechanisms and Pharmaceutical Applications. Online. *Biomedicines*. 2022, roč. 10, č. 12. ISSN 2227-9059. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123051>. [cit. 2025-01-29].
- [53] ZEHIROGLU, Cuma a OZTURK SARIKAYA, Sevim Beyza. The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. Online. *Journal of Food Science and Technology*. 2019, roč. 56, č. 11, s. 4757-4774. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03952-x>. [cit. 2025-01-29].
- [54] HREBIEN-FILISIŃSKA, Agnieszka M. a BARTKOWIAK, Artur. Antioxidative Effect of Sage (*Salvia officinalis* L.) Macerate as "Green Extract" in Inhibiting the Oxidation of Fish Oil. Online. *Antioxidants*. 2022, roč. 11, č. 1. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox11010100>. [cit. 2025-01-29].

- [55] XU, Dong-Ping; LI, Ya; MENG, Xiao; ZHOU, Tong; ZHOU, Yue et al. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, roč. 18, č. 1. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>. [cit. 2025-01-29].
- [56] LÜ, Jian-Ming; LIN, Peter H.; YAO, Qizhi a CHEN, Changyi. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. Online. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010, roč. 14, č. 4, s. 840-860. ISSN 1582-1838. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>. [cit. 2025-01-28].
- [57] HELL, Johannes; KNEIFEL, Wolfgang; ROSENAU, Thomas a BÖHMDORFER, Stefan. Analytical techniques for the elucidation of wheat bran constituents and their structural features with emphasis on dietary fiber – A review. Online. 2014, roč. 35, č. 2, s. 102-113. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.012>. [cit. 2025-01-28].
- [58] SHOCKCOR, J.P. HPLC–NMR, Pharmaceutical Applications. Online. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. 2017, s. 141-151. ISBN 9780128032244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00377-0>. [cit. 2025-01-28].
- [59] GLIGOR, Felicia Gabriela; FRUM, Adina; VICAS, Laura Grațela; TOTAN, Maria; ROMAN-FILIP, Corina et al. Determination of a Mixture of *Plantago lanceolata* L. and *Salvia officinalis* L. by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection (HPLC-UV). Online. *Analytical Letters*. 2020, roč. 53, č. 9, s. 1391-1406. ISSN 0003-2719. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1708373>. [cit. 2025-04-01].
- [60] EDDY, Diana Rakhmawaty; NURSYAMSIAH, Dian; PERMANA, Muhamad Diki; SOLIHUDDIN; NOVIYANTI, Atiek Rostika et al. Green Production of Zero-Valent Iron (ZVI) Using Tea-Leaf Extracts for Fenton Degradation of Mixed Rhodamine B and Methyl Orange Dyes. Online. *Materials*. 2022, roč. 15, č. 1. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma15010332>. [cit. 2025-01-17].
- [61] PÉREZ, Maria; DOMINGUEZ-LÓPEZ, Inés a LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa M. The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2023, roč. 71, č. 46, s. 17543-17553. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>. [cit. 2025-01-17].
- [62] RAPOSO, Francisco; BORJA, Rafael a GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ, Julio A. A comprehensive and critical review of the unstandardized Folin-Ciocalteu assay to determine the total content of polyphenols: The conundrum of the experimental factors and method validation. Online. *Talanta*. 2024, roč. 272. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.125771>. [cit. 2025-01-17].
- [63] DOMINGUEZ-LÓPEZ, Inés; PÉREZ, Maria a LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa M. Total (poly)phenol analysis by the Folin-Ciocalteu assay as an anti-inflammatory biomarker in biological samples. Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2024, roč. 64, č. 27, s. 10048-10054. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2220031>. [cit. 2025-01-17].
- [64] PAULOVÁ, HANA; BOCHOŘÁKOVÁ, HANA a TÁBORSKÁ, EVA. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK IN VITRO. *Chemické listy*. 2004, č. 98, s. 174-179.

- [65] LOBO, V; PATIL, A; PHATAK, A a CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Online. *Pharmacognosy Reviews*. 2010, roč. 4, č. 8. ISSN 0973-7847. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>. [cit. 2025-01-28].
- [66] CHAVES, Natividad; SANTIAGO, Antonio a ALÍAS, Juan Carlos. Quantification of the Antioxidant Activity of Plant Extracts: Analysis of Sensitivity and Hierarchization Based on the Method Used. Online. *Antioxidants*. 2020, roč. 9, č. 1. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox9010076>. [cit. 2025-03-31].
- [67] HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, Patricia; BAQUERO, Ludy Pabón a LARROTA, Harold Rodríguez. Flavonoids. Online. *Bioactive Compounds*. 2019, s. 265-288. ISBN 9780128147740. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00014-1>. [cit. 2025-01-20].
- [68] BALIYAN, Siddartha; MUKHERJEE, Riya; PRIYADARSHINI, Anjali; VIBHUTI, Arpana; GUPTA, Archana et al. Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. Online. *Molecules*. 2022, roč. 27, č. 4. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>. [cit. 2025-01-20].
- [69] RE, Roberta; PELLEGRINI, Nicoletta; PROTEGGENTE, Anna; PANNALA, Ananth; YANG, Min et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Online. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, roč. 26, č. 9-10, s. 1231-1237. ISSN 08915849. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3). [cit. 2025-01-20].
- [70] ŠKROVÁNKOVÁ, Soňa; MLČEK, Jiří a VLKOVÁ, Nikola. *Vliv extrakčních podmínek na antioxidační působení rostlin z čeledi Hluchavkovité*. Hygiena Alimentorum XLIV. Zborník prednášok a posterov. , Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach: s. 538-547. 15. - 17. 5. 2024, Štrbské Pleso, 2024. ISBN 978-80-8077-822-4.
- [71] MEKINIĆ, Ivana Generalić; SKROZA, Danijela; LJUBENKOV, Ivica; KRSTULOVIĆ, Luka; MOŽINA, Sonja Smole et al. Phenolic Acids Profile, Antioxidant and Antibacterial Activity of Chamomile, Common Yarrow and Immortelle (Asteraceae). Online. *Natural Product Communications*. 2014, roč. 9, č. 12. ISSN 1934-578X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1934578X1400901222>. [cit. 2025-04-07].
- [72] DENT, Maja; FUCHS-GODEC, Regina; PEDISIĆ, Sandra; GRBIN, Dorotea; DRAGOVIC-UZELAC, Verica et al. Polyphenols from Sage Leaves (*Salvia officinalis* L.): Environmentally Friendly Extraction under High Hydrostatic Pressure and Application as a Corrosion Inhibitor for Tinsplate. Online. *Separations*. 2024, roč. 11, č. 5. ISSN 2297-8739. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/separations11050158>. [cit. 2025-04-07].
- [73] SVYDENKO, Liudmyla. Polyphenol Compounds and Antioxidant Activity of *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* L. Online. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*. 2022, roč. 6, č. 2. ISSN 25858246. Dostupné z: <https://doi.org/10.15414/ainhlq.2022.0015>. [cit. 2025-04-07].
- [74] KHIYA, Zakaria; OUALCADI, Yassine; GAMAR, Abderrahmane; BERREKHIS, Fatima; ZAIR, Touria et al. Correlation of Total Polyphenolic Content with Antioxidant Activity of Hydromethanolic Extract and Their Fractions of the *Salvia officinalis* Leaves from Different Regions of Morocco. Online. *Journal of Chemistry*.

- 2021, roč. 2021, s. 1-11. ISSN 2090-9071. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2021/8585313>. [cit. 2025-04-07].
- [75] AŠIMOVIĆ, Zilha; SIRBUBALO, Elvedina; ČENGIĆ, Lejla; MUMINOVIĆ, Ševal a JURKOVIĆ, Josip. Phenolic Content and Antioxidant Activity Determination in Chamomile (*Matricaria Recutita*) and Sage (*Salvia Officinalis*) Teas. Online. *10th Central European Congress on Food*. 2022, s. 360-368. ISBN 978-3-031-04796-1. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-031-04797-8_31. [cit. 2025-04-07].
- [76] TSIVELIKA, Nektaria; IRAKLI, Maria; MAVROMATIS, Athanasios; CHATZOPOULOU, Paschalina a KARIOTI, Anastasia. Phenolic Profile by HPLC-PDA-MS of Greek Chamomile Populations and Commercial Varieties and Their Antioxidant Activity. Online. *Foods*. 2021, roč. 10, č. 10. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods10102345>. [cit. 2025-04-07].
- [77] GAD, Haidy A.; MAMADALIEVA, Rano Z.; KHALIL, Noha; ZENGİN, Gokhan; NAJAR, Basma et al. GC-MS Chemical Profiling, Biological Investigation of Three *Salvia* Species Growing in Uzbekistan. Online. *Molecules*. 2022, roč. 27, č. 17. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27175365>. [cit. 2025-04-07].

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA	Antioxidační aktivita
ABTS	Kyselina 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová)
ABTS ^{•+}	Kationtový radikál kyseliny 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové)
c	koncentrace
CA	Kyselina karnosová
CN	Karnosol
ČŠ	Čerstvá šalvěj
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DPPH [•]	Radikál 2,2-difenyly-1-pikrylhydrazylu
DPPH-H	Difenylypikrylhydrazin
F-C	Folin-Ciocalteuovo činidlo
FRAP	Ferric reducing ability of plasma
GAE	Ekvivalent kyseliny gallové
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-DAD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole
N.D.	Nedetkováno
MAE	Mikrovlnná extrakce
PPA	Polyfenolické kyseliny
QE	Ekvivalent kvercetinu
RA	Kyselina rozmarýnová
RNS	Reaktivní forma dusíku

ROS	Reaktivní forma kyslíku
s	Směrodatná odchylka
SH	Sušený heřmánek
SŠ	Sušená šalvěj
TE	Ekvivalent troloxu
TEAC	Ekvivalent antioxidační kapacity troloxu
TPC	Celkový obsah polyfenolů
UAE	Ultrazvuková extrakce
UV	Ultrafialové záření
VIS	Viditelná oblast spektra

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Šalvěj lékařská [6]</i>	15
<i>Obr. 2: Vzorec kyseliny rozmarýnové [15]</i>	18
<i>Obr. 3: Vzorec kyseliny karnosové [18]</i>	19
<i>Obr. 4: Vzorec karnosolu [18]</i>	19
<i>Obr. 5: Heřmánek pravý [24]</i>	20
<i>Obr. 6: Vzorec apigeninu [34]</i>	23
<i>Obr. 7: Vzorec luteolinu [38]</i>	23
<i>Obr. 8: Vzorec kvercetinu [41]</i>	24
<i>Obr. 9: Vzorec rutinu [45]</i>	25
<i>Obr. 10: Vzorec kyseliny chlorogenové [49]</i>	25
<i>Obr. 11: Vzorec kyseliny kávové [50]</i>	26
<i>Obr. 12: Redoxní reakce mezi polyfenoly a Folin-Ciocalteuovým činidlem [60]</i>	30
<i>Obr. 13: Mechanismus reakce DPPH radikálu s antioxidantem [67]</i>	32
<i>Obr. 14: Chemická reakce ABTS s antioxidantem [67]</i>	32
<i>Obr. 15: Kalibrační křivka kyseliny gallové</i>	42
<i>Obr. 16: Kalibrační křivka troloxu (DPPH)</i>	44
<i>Obr. 17: Kalibrační křivka troloxu (ABTS)</i>	45
<i>Obr. 18: TPC v extraktech z čerstvé šalvěje lékařské</i>	52
<i>Obr. 19: TPC v extraktech ze sušené šalvěje lékařské</i>	53
<i>Obr. 20: TPC v extraktech ze sušeného heřmánku pravého</i>	55
<i>Obr. 21: AA (DPPH) v extraktech z čerstvé šalvěje lékařské</i>	57
<i>Obr. 22: AA (DPPH) v extraktech ze sušené šalvěje lékařské</i>	58
<i>Obr. 23: AA (DPPH) v extraktech ze sušeného heřmánku pravého</i>	59
<i>Obr. 24: AA (ABTS) v extraktech z čerstvé šalvěje lékařské</i>	61
<i>Obr. 25: AA (ABTS) v extraktech ze sušené šalvěje lékařské</i>	62
<i>Obr. 26: AA (ABTS) v extraktech ze sušeného heřmánku pravého</i>	64

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1: Fenolické složení extraktu S. officinalis [59]</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 2: Vzorky šalvěje lékařské (Salvia officinalis)</i>	<i>35</i>
<i>Tab. 3: Vzorky heřmánku pravého (Matricaria chamomilla)</i>	<i>36</i>
<i>Tab. 4: Složení mobilních fází během gradientové eluce</i>	<i>39</i>
<i>Tab. 5: Rovnice lineární regrese polyfenolických látek</i>	<i>39</i>
<i>Tab. 6: Polyfenolické látky detekované pomocí HPLC/DAD ve vybraných extraktech z šalvěje a heřmánku</i>	<i>49</i>