

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2023

Bc. Irina Matveeva

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Vliv bazického prostředí na spektrometrické vlastnosti extraktu kořene lopuchu  
Diplomová práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Irina Matveeva**  
Osobní číslo: **C21430**  
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Vliv bazického prostředí na spektrometrické vlastnosti extraktu kořene lopuchu**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. Popište botanické zařazení byliny lopuch (*Articum sp.*) a jeho základní složení. S využitím zahraničních odborných periodik popište využití kořene lopuchu v medicíně/léčitelství, a v potravinářství s ohledem na obsah významných látek.
2. Spektrometricky charakterizujte změny vodného extraktu z kořene lopuchu v oblasti pH 7-8. Pokuste se zjistit, co může být příčinou těchto změn.
3. Výsledky vyhodnoťte s využitím relevantních statistických metod a kriticky diskutujte s dostupnou literaturou.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:  
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie  
Konzultant diplomové práce: **MSc. Sali Muriqi**  
Katedra analytické chemie  
Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**  
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem „Vliv bazického prostředí na spektrometrické vlastnosti extraktu kořene lopuchu“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Bc. Irina Matveeva

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce doc. Ing. Liboru Červenkoví, Ph.D. za jeho velkou trpělivost, připomínky, rady a pomoc při psaní mé diplomové práce. Současně bych ráda poděkovala MSc. Sali Muriqi za pomoc v průběhu experimentu.

## Obsah

<b>SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK</b> .....	10
<b>SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK</b> .....	13
<b>ÚVOD</b> .....	14
<b>1 Teoretická část</b> .....	15
1.1    Lopuch.....	15
1.1.1    Morfologické znaky .....	15
1.1.2    Historie využití .....	15
1.1.3    Léčivé vlastností rostliny .....	16
1.1.4    Celkové složení.....	16
1.1.5    Složení kořene.....	17
1.2    Tvrдост vody .....	22
1.2.1    Vliv tvrdosti vody na vlastnostech nápoje z bylin.....	23
1.3    Barevnost.....	23
1.3.1    CIELAB model .....	24
1.3.2    CIELUV model.....	26
1.3.3    Model HSV .....	26
1.3.4    Přístroje pro měření barevnosti.....	27
1.4    Použité metody.....	27
1.4.1    Spektrofotometrie .....	27
1.4.2    IČ spektroskopie .....	29
1.4.3    Voltametrie .....	31
1.4.4    ISP/MS.....	33
1.4.5    Kapalinová chromatografie.....	33
<b>2 Experimentální část</b> .....	35
2.1    Přístroje a chemikálie .....	35
2.1.1    Přístrojové vybavení .....	35
2.1.2    Použité chemikálie .....	35
2.2    Příprava chemických roztoků.....	37
2.2.1    Příprava pufrů .....	37
2.2.2    Příprava činidla DPPH a měření antioxidačních vlastností extraktu.....	37
2.2.3    Příprava roztoků EDTA a anorganických solí.....	38
2.3    Příprava bylinných nálevů.....	38
2.4    Měření pH .....	38
2.5    Spektrometrická měření .....	39

2.5.1	Měření barevnosti v systému CIELa*b* a CIELUV .....	39
2.5.2	Měření absorpčních křivek ve viditelné a UV oblasti .....	39
2.5.3	Měření infračerveného spektra .....	39
2.6	Voltametrická měření nálevů .....	40
2.7	Minerální analýza nálevů .....	40
2.8	Kapalinová chromatografie nálevů lopuchu .....	41
2.9	Zpracování a hodnocení získaných údajů .....	41
<b>3</b>	<b>Výsledky a diskuse</b> .....	<b>42</b>
3.1	Měření pH roztoků .....	42
3.2	Vlastnosti nálevů v bazickém prostředí .....	43
3.2.1	Měření barevnosti .....	43
3.2.2	Měření v UV-VIS oblasti.....	47
3.2.3	Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH .....	51
3.3	Vliv přídavku EDTA na barevnost extraktu lopuchu .....	53
3.4	Vliv anorganických iontů na absorbanci a elektrochemické vlastnosti nálevu lopuchu v bazickém prostředí .....	59
3.5	Infračervená spektroskopie použitých pufrů a vod .....	66
3.5.1	Infračervená spektroskopie extraktů s přídavky vybraných anorganických iontů 70	
3.6	ISP/MS .....	75
3.7	Kvalita extraktů metodou HPLC.....	76
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>80</b>
	<b>POŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>82</b>
	<b>Příloha</b> .....	<b>92</b>



## **ANOTACE**

Diplomová práce se zabývá spektrofotometrickou charakterizací změn vodného extraktu z kořene lopuchu v oblasti pH 7,0–8,0. Byly připraveny roztoky kořene lopuchu (*Articum* sp.) v destilované vodě, ve velmi tvrdé vodě, ve fosfátovém pufru o pH 7,0, 7,5, 8,0 a v Britton-Robinsonově pufru pH 8,0. Ve vzorcích byla změřena barevnost, pH a byla stanovena antioxidační aktivita metodou DPPH. Byl změřen vliv EDTA a anorganických iontů na absorbanci a elektrochemické vlastnosti nálevu lopuchu v bazickém prostředí. Rovněž byla změřena infračervená spektra nálevu a byla vyhotovena minerální analýza pomocí ICP/MS.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Lopuch, barevnost, pH, spektroskopie, VTV, fosfátový pufr, kationty, EDTA, voltametrie

## **TITLE**

Effect of basic environment on spectrophotometric properties of burdock root extract

## **ANNOTATION**

The thesis deals with the spectroscopic characterization of changes in aqueous extracts of burdock root in the pH range of 7.0–8.0. Infusions of burdock root (*Articum* sp.) were prepared in distilled water, very hard water, in a phosphate buffer at pH 7.0, 7.5, 8.0, and in Britton-Robinson buffer at pH 8.0. The color, pH, and antioxidant activity using the DPPH method were measured in the samples. The effect of EDTA and inorganic ions on the absorbance and electrochemical properties of the burdock infusion in a basic environment were measured. The infrared spectra of the infusion were also measured, and a mineral analysis was performed using ICP/MS.

## **KEYWORDS**

Burdock, color, pH, spectroscopy, very hard water, phosphate buffer, cations, EDTA, voltammetry

# SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

## Obrázky

<b>Obrázek 1</b> – CIELab systém [43] .....	25
<b>Obrázek 2</b> – Parametry barevnosti extraktu ve velmi tvrdé vodě .....	45
<b>Obrázek 3</b> – Parametry barevnosti pro extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0.....	46
<b>Obrázek 4</b> – a) Skenování extraktu lopuchu ve VTV během 24 h, b) závislost absorbance na čase u extraktu lopuchu ve VTV .....	47
<b>Obrázek 5</b> – a) Skenování extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 během 24 h, b) závislost absorbance na čase u extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 .....	48
<b>Obrázek 6</b> – a) Skenování extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 7,5 během 24 h, b) závislost absorbance na čase u extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 7,0 .....	49
<b>Obrázek 7</b> – a) Skenování extraktu lopuchu v Britton-Robinsonově pufru pH 8,0 během 24 hodin, b) Závislost absorbance na čase u extraktu lopuchu v Britton-Robinsonově pufru pH 8,0 .....	50
<b>Obrázek 8</b> – Skenování extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 v UV oblasti .....	51
<b>Obrázek 9</b> – Skenování extraktu lopuchu v Britton-Robinsonově pufru pH 8,0 v UV oblasti .....	51
<b>Obrázek 10</b> – Vliv přidavku různého množství EDTA (g/20 ml) na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0.....	54
<b>Obrázek 11</b> – Voltametrické měření vlivu přidavku různého množství EDTA (g/20 ml) na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0.....	55
<b>Obrázek 12</b> – Vliv přidavku roztoků EDTA o různé koncentrací na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0.....	56
<b>Obrázek 13</b> – Voltametrické měření vlivu přidavku roztoků EDTA o různé koncentrací na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0.....	57
<b>Obrázek 14</b> – Závislost potenciálu na pH vzorků .....	57
<b>Obrázek 15</b> – Závislost proudu na pH roztoků.....	58
<b>Obrázek 16</b> – Závislost koncentrace přidaného EDTA na pH roztoků.....	58
<b>Obrázek 17</b> – Vliv přidavku roztoku $\text{mgso}_4$ o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0.....	59
<b>Obrázek 18</b> – Vliv přidavku roztoku $\text{CaSO}_4$ o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0.....	59

<b>Obrázek 19</b> – Vliv přidavku roztoku $MgCl_2$ o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0.....	60
<b>Obrázek 20</b> – Vliv přidavku roztoku $CaCl_2$ o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0.....	60
<b>Obrázek 21</b> – Vliv přidavku roztoku $MnCl_2$ o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0.....	61
<b>Obrázek 22</b> – Voltametrické měření vlivu přidavku roztoku $MgSO_4$ o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 .....	62
<b>Obrázek 23</b> – Voltametrické měření vlivu přidavku roztoku $CaSO_4$ o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 .....	63
<b>Obrázek 24</b> – Voltametrické měření vlivu přidavku roztoku $MnCl_2$ o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 .....	64
<b>Obrázek 25</b> – Voltametrické měření vlivu přidavku roztoku $CaCl_2$ o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 .....	64
<b>Obrázek 26</b> – Voltametrické měření vlivu přidavku roztoku $MnCl_2$ o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 .....	65
<b>Obrázek 27</b> – Infračervená spektra extraktu lopuchu v destilované vodě.....	66
<b>Obrázek 28</b> – Infračervená spektra extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 .....	67
<b>Obrázek 29</b> – Infračervená spektra extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru o různém pH .....	67
<b>Obrázek 30</b> — a) Infračervená spektra (FTIR/ATR) extraktu lopuchu ve VTV oproti extraktu v destilované vodě, b) Infračervená spektra extraktu lopuchu ve VTV .....	68
<b>Obrázek 31</b> - FTIR/ATR spektrum extraktu kořene lopuchu v Britton-Robinsonově (B-R) a fosfátovém pufru (pH 8,0). šipkou je označeno pouze spektrum v B-R pufru. ....	69
<b>Obrázek 32</b> – Infračervená spektra přidavku 0,5 M $MgSO_4$ do extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0.....	70
<b>Obrázek 33</b> – Infračervená spektra přidavku $1,84 \times 10^{-2}$ M $CaSO_4$ do extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 v porovnání s extraktem bez kationtu .....	71
<b>Obrázek 34</b> - FTIR/ATR spektrum extraktu kořene lopuchu ve fosfátovém pufru (pH 8,0) s přidavkem 0,005 M $MgCl_2$ oproti čistému extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0. šipkou je označeno pouze spektrum extraktu s přidavkem 0,005 M $MgCl_2$ .....	72
<b>Obrázek 35</b> - FTIR/ATR spektrum extraktu kořene lopuchu ve fosfátovém pufru (pH 8,0) s přidavkem 0,0005 M $MgCl_2$ oproti čistému extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0. šipkou je označeno pouze spektrum extraktu s přidavkem 0,0005 M $MgCl_2$ . ....	72

<b>Obrázek 36</b> – FTIR/ATR spektrum extraktu kořene lopuchu ve fosfátovém pufru (pH 8,0) s přídavkem 0,005 M CaCl <sub>2</sub> a 0,0005 M CaCl <sub>2</sub> oproti čistému extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0.....	73
<b>Obrázek 37</b> – FTIR/ATR spektrum extraktu kořene lopuchu ve fosfátovém pufru (pH 8,0) s přídavkem 0,005 M MnCl <sub>2</sub> oproti čistému extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0. šipkou je označeno pouze spektrum extraktu s přídavkem 0,005 M MnCl <sub>2</sub> .....	73
<b>Obrázek 38</b> – Infračervená spektra extraktů lopuchu s přídavkem 0,0005 M MnCl <sub>2</sub> oproti extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0.....	74
<b>Obrázek 39</b> – Graf projekce <b>a)</b> proměnných a <b>b)</b> případů do faktorové roviny.....	75
<b>Obrázek 40</b> – Měření pomocí kapalinové chromatografie extraktu lopuchu v destilované vodě .....	76
<b>Obrázek 41</b> – Měření pomocí kapalinové chromatografie extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0.....	77
<b>Obrázek 42</b> – Měření pomocí kapalinové chromatografie extraktu lopuchu ve velmi tvrdé vodě .....	77
<b>Obrázek 43</b> – Měření pomocí kapalinové chromatografie extraktu lopuchu v britton-robisonově pufru pH 8,0.....	78

## **Tabulky**

<b>Tabulka 1</b> – Množství chemikálii (g/l) na přípravu fosfátových pufrů o různém pH .....	37
<b>Tabulka 2</b> – hodnoty pH různých extraktů .....	42
<b>Tabulka 3</b> – barevnost připravených nálevů.....	43
<b>Tabulka 4</b> – % inhibice pro různé vzorky .....	52

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

$\Delta E^*$	barevný rozdíl v soustavě CIELAB
$a^*, b^*$	barevné osy
$C^*$	sytost
CIE	Commission internationale de l'éclairage (Mezinárodní komise pro osvětlování)
CIELAB	kolorimetrická soustava CIE $L^*a^*b^*$
DEMI	demineralizovaná voda
DP	stupeň polymerace
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazin
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraoctová
Ferozzin kyseliny	3-(2-Pyridyl)-5,6-difenyl-1,2,4,-triazin-p,p'-hydrát monosodné soli disulfonové kyseliny
FRAP	ferric reducing-antioxidant power, redukční síla antioxidantu
FTIR	IČ spektrometrie s Fourierovou transformací
$h^\circ$	odstín
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSV	barevný model
ICP/MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IR	infračervené záření
$L^*$	jas – světlost
NIR	blízká infračervená oblast
RGB	barevný prostor
SWV	obdélníková voltametrie
TTRAN	totální transmise
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast
VTV	velmi tvrdá voda
XYZ	tristimulární složky

# ÚVOD

Lopuch je léčivou rostlinu s celkovým názvem *Arctium lappa L.*, která spadá do čeledi *Asteraceae*. Tato rostlina pochází z Asie a Evropy, avšak je rozšířena a pěstuje se na různých kontinentech. *Arctium lappa* je velmi známá ve východoasijské kuchyni jako oblíbená ingredience. V evropských zemích se častěji používá jako bylinný nálev nebo odvar. Své využití lopuch našel i v kosmetickém průmyslu, zejména v šamponech a kondicionérech na vlasy, a to především díky svým vlastnostem proti lupům a zlepšení zdraví vlasů. *Arctium lappa* obsahuje mnoho biologicky aktivních látek, jako jsou kyselina oleanolová, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina p-kumarová a inulin. Kořeny jsou bohaté na makroprvky, jako jsou draslík, vápník, fosfor, hořčík a sodík, a také obsahují menší množství manganu, zinku, železa a mědi. Využití lopuchu se rozšířilo i do medicíny díky svým antioxidačním, protizánětlivým, protinádorovým, antimikrobiálním a gastroprotektivním vlastnostem.

Cílem této práce bylo popsat botanické zařazení byliny lopuch (*Articum sp.*) a jeho základní složení. Dalším cílem je spektrofotometricky charakterizovat změny vodného extraktu z kořene lopuchu v oblasti pH 7,0–8,0.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Lopuch

*Arctium lappa L.* (*A. lappa L.*) je běžně známý jako lopuch nebo *gobo* (v Japonsku). Je to léčivá rostlina z čeledi *Asteraceae*, původem z Asii a Evropy, která je rozšířená a přizpůsobená pro pěstování v různých klimatických podmínkách a kontinenty. Často roste jako plevel na smetištích a kolem cest. Název lopuch pochází od slova *lupene* v překladu – list [1–2].

### 1.1.1 Morfologické znaky

Je to dvouletá rostlina, má válcovitý tvar (45–50 cm dlouhý a 3–6 cm v průměru), tenkou hnědou slupku a větvenovitý kořen, ale některé jedinci mohou vyrůst na 1 m výšku. Vnitřní část je bílá až žlutobílá. Listy jsou velké, tmavě zelené barvy srdčitého tvaru se zubatými okraji. Má červené trubkovité květy v kulovitých úborech s hákovitou špičkou, které se díky tomu lehce zachycují ve srsti zvířat, a tak rostlina šíří svoji semena. Objevují se na dlouhých stoncích v létě a na podzim. Vegetační doba se pohybuje od 8 do 12 měsíců.

Nejčastěji užívanou částí rostliny je kořen, který je větvený a až 1 metr hluboký. Ze země se dobývá na podzim (září a říjen), ale i začátkem jara v dubnu. Sbírá se v prvním roce vegetace, starší kořeny nejsou zdaleka tak účinné [2, 3].

### 1.1.2 Historie využití

Rostlina lopuchu je velmi oblíbená ve východoasijské kuchyni. Konzumuje se jako kořenová zelenina, ale se používají i její nezralé květy, stonky a mladé listy. Ve Spojeném království je lopuch přísadou nealkoholického nápoje. Ve východní Asii už dlouhá leta se konzumuje jako zelenina. V evropských zemích lidí upřednostňují častěji jako bylinný nálev nebo odvar. Byl historicky používán jako dietní zelenina a jako přísada do lidových léků na hypertenzi, arteriosklerózu, hepatitidu a zánětlivá onemocnění. Lopuch lze také zpracovat pro použití v různých výrobcích včetně čajů, koláčů, omáček, vína, nápojů, a dokonce i pracího prostředku. Své využití *Arctium lappa* našel i v kosmetickém průmyslu, zejména v šamponech a kondicionérech na vlasy, kvůli svým údajným vlastnostem proti lupům a zlepšení zdraví vlasů. Olej z kořenů se také používá jako přírodní kondicionér a hydratační prostředek pro pleť [3,4].

### 1.1.3 Léčivé vlastnosti rostliny

Výtažky z kořenů a listů lopuchu zlepšují metabolismus a močopudné působení. Používají se při katarrech trávicího traktu a ke zlepšení funkce jater a slinivky břišní. Navíc se doporučují v časném stadiu cukrovky jako podpůrný prostředek k udržení správné hladiny glukózy v krvi. Plody lopuchu se v tradiční medicíně používají jako pomocný prostředek při léčbě rakoviny. Listy a kořeny lopuchu se také používají zevně ke zmírnění zánětů kůže, jako jsou pupínky, vředy, akné a vředy. Zmírňují podráždění a podporují hojení ran, včetně infikovaných. Farmakologické studie a klinické studie ukázaly, že kořeny lopuchu mají hepatoprotektivní a antivirové účinky, působí proti zánětům a aktivity pohlcující volné radikály. Na druhé straně semena mají chemopreventivní účinky spojeny s lignany, jako je arctiin a arctigenin.

Vodní extrakt z kořenů *Arctium lappa L.* zlepšuje průběh abdominální obezity a některé studie naznačují, tyto extrakty mohou být slibným neuroprotektivním prostředkem. Působí protektivně u neurodegenerativních onemocnění spojených s oxidačním stresem [4,5,6].

### 1.1.4 Celkové složení

Bylo provedeno mnoho studií o aktivitě a chemickém složení extraktů z kořenů, listů a plodů. V extraktech plodů lopuchu byla zjištěna přítomnost sloučenin ze skupiny lignanů: lappaol A, lappaol C, lappaol F, matairesinol, arctiin, arctigenin a kyselina arctigenová. V extraktech z listů lopuchu byl nalezen arctiin a arctigenin ze skupiny lignanů, onopordopikrin ze skupiny seskviterpenových laktonů a dále flavonoidy – luteolin, kvercetin, kvercitrin a rutin a fenolové kyseliny. Extrakty z kořenů lopuchu jsou bohaté na fenolové kyseliny – především izomery kyseliny dikafeoylchinové a jejich deriváty. Jsou také bohatým zdrojem polysacharidů, zejména inulinu, fenolů a polyacetylenů, a derivátů nenasycených mastných kyselin – linoleátu a oleátu. Ve svých kořenech obsahují pektické polysacharidy (993 mg kyselina uronová/100 g) [6–9].



### 1.1.5 Složení kořene

Hlavní biologicky aktivní látky v kořene lopuchu zahrnují celkem 181 těkavých složek (v pořadí: lineární/aromatické uhlovodíky> alkeny> aldehydy> ostatní> alkoholy> kyseliny> estery> ketony. Nejvíce detekovanými složkami jsou kyselina oleanolová, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina p-kumarová a inulin. Hlavními fenolickými sloučeninami kořenů lopuchu jsou deriváty kyseliny kafeochinové, včetně dvou monomerů: kyseliny 3-kafeochinové (kyselina chlorgenová) a kyseliny 4-kafeochinové (kyselina kryptochlorgenová). Deriváty kyseliny kafeochinové (kyseliny 1,3-, 1,4-, 1,5-dikafeochinové) jsou jednou z hlavních účinných látek kořene lopuchu a mají neuroprotektivní účinky. Fenolové složky jako kyselina kávová a kyselina chlorgenová mají silný inhibiční účinek na oparvirus (HSV-1, HSV-2) a adenovirus (ADV-3,ADV-11)[6,10].

Byly však nalezeny také karotenoidy, cynarin, kvercitrin, arctiin, luteolin, tanin,  $\beta$ -eudesmol, trachelogenin, sitosterol- $\beta$ -D-glukopyranosid, lappaol, terpeny, arctigenin a diartigenin a vitamin C. Kořen lopuchu obsahuje vlákninu inulin, který prokazuje bobtnavé vlastnosti a lepší schopnost zadržovat olej. Lopuch je bohatý na antioxidační polyfenoly a má *in vitro* antioxidační aktivitu a protizánětlivé účinky. Izolováním z vodné frakce ozařováním za pomoci mikrovln lze získat fruktan inulinového typu s průměrným stupněm polymerace 20–24, molekulovou hmotností 3,82 kDa [6, 8].

Kořeny lopuchu patří mezi potraviny s nízkým obsahem tuku. Celý lopuchový prášek obsahuje sedm farmakodynamických aminokyselin, ale v prášku z kořene lopuchu bylo zjištěno jen šest: arginin, kyselina glutamová, kyselinu asparagová, fenylalanin, leucinu, izoleucin. Byly také nalezeny makroprvky: draslík (K), vápník (Ca), fosfor (P), hořčík (Mg) a sodík (Na) Mezi další prvky, které se vyskytují v menším množství jsou mangan (Mn), zinek (Zn), železo (Fe) a měď (Cu) [10].

#### 1.1.5.1 Inulin

Inulin je nestravitelný sacharid patřící do třídy známé jako fruktany. Vyskytuje se v kořenech u rostlin hvězdnicovitých a zvonkovitých, kde nahrazuje škrob jako zásobní látku. Je součástí každodenní stravy člověka po několik staletí. Je přítomen v mnoha pravidelně konzumované zelenině, ovoci a obilovinách, včetně jiriny, cibule, česneku, pšenice, čekanky, artyčoku a banánu. Také má široké uplatnění v jiných typech potravin, jako jsou cukrovinky, ovocné přípravky, mléčné dezerty, jogurt a čerstvý sýr, pečivo, čokoláda, zmrzlina a omáčky. Inulin lze také použít k přípravě fruktózových sirupů. Inulin jako prebiotikum je definován jako složka potravy, která nemůže být trávena trávicími enzymy, které se dostanou do tlustého střeva

bez změny struktury a může selektivně stimulovat růst a aktivitu prospěšných bakterií v zažívací trakt. Prebiotika inulinového typu zahrnují inulin, oligofruktózu a fruktooligosacharidy, oligo – nebo polysacharidové řetězce složené primárně z molekuly fruktózy, které jsou bifidogenní. Používají se jako funkční složky potravin v nápojích, jogurtech, sušenkách a pomazánkách a jako doplňky stravy. Inulin v lidském těle může měnit složení střevní flóry specifickou fermentací, jejímž výsledkem je společenství převládající bifidobakterie [11].

Experimentální studie ukázaly jeho použití jako bifidogenní látky, která stimuluje imunitní systém těla, má vliv na snížení hladiny patogenních bakterií ve střevě, zmírňuje zácpy a snižuje riziko aterosklerózy. Inulin také snižuje výskyt rakoviny tlustého střeva. V potravinářském průmyslu hlavními zdroje inulinu jsou čekanka a topinambur, ale jako čištěná složka potravin prodává pouze inulin z hlíz čekanky. Inulin se chová podobně jako objemové přísady a spolu s vysokým obsahem umělých sladidel, jako je aspartam a acesulfam K, poskytuje dobrý pocit v ústech s malou pachutí [12,13].

Výroba probíhá ve dvou fázích. V první fázi se provádí extrakce horkou vodou nebo vodným roztokem ethanolu. Dále počáteční čištění surového sirupu, který se dále rafinuje během sekundární fázi zpracování. V klasickém procesu čištění, aby se odstranily nečistoty z extrahované šťávy, musí být provedeno více kroků úprava (předvápnění, vápnění a karbonizace) při relativně vysoké teplotě (80–90 °C). To může vést k hydrolyze molekul inulinu v extrahované šťávě a způsobit přechod vápenatých iontů do vyčištěné šťávy, která by pak vyžadovala další čištění. Existuje však technologie založené na membránách. Uvádí se, že mikrofiltrace a ultrafiltrace usnadňují tyto časově náročné kroky a výsledný inulin má hodnotu DP (stupeň polymerace) v rozmezí 3 až 60 což napodobuje původní přítomný DP v cikorce. Dalším krokem je hydrolyza inulinu na fruktózu. Dal pomocí destilace, krystalizace nebo chromatografie lze fruktózu oddělit od ostatních složek extraktu. Konečným výsledkem je čistá fruktóza a vedlejší produkty, jako jsou oligosacharidy [12–14].

#### **1.1.5.2 Antioxidační látky**

Oxidační proces je chemická reakce, která zahrnuje přenos vodíkových nebo kyslíkových atomů a vytváření volných radikálů. Tyto radikály následně spouštějí řetězovou reakci, která může poškodit tkáň a způsobit oxidační stres. Volné radikály jsou atomy, molekuly nebo ionty obsahující nepárové elektrony, které mohou být produkovány buď v organismu samotném, nebo vystavením vnějším faktorům. Příklady volných radikálů zahrnují peroxidy, hydroxylové radikály, peroxid vodíku, oxid dusičitý a singletový kyslík.

Tyto radikály mohou způsobit poškození buněčných funkcí, narušení nukleových kyselin a peroxidaci lipidů buněčné membrány, což vede k denaturaci enzymů a dalším škodlivým účinkům [15,17].

Antioxidanty jsou sloučeniny, které inhibují reakci volných radikálů a zabraňují škodlivým účinkům vznikajícím během metabolismu. Antioxidační obranné mechanismy se dělí do dvou typů: enzymatické a neenzymatické. Enzymatické antioxidanty zahrnují superoxidodismutázu, katalázu, askorbátperoxidázu a glutathionreduktázu. Mezi neenzymatické antioxidanty patří organické sloučeniny, jako jsou peptidy, polysacharidy, polyfenoly, vitamíny a další. Především antioxidanty jsou lignany jako arctigenin, arctiin a essiac [16, 18].

### 1.1.5.3 Antioxidační testy

Obecně existují dva typy metod pro posouzení antioxidační aktivity. První typ se zaměřuje na schopnost odstranit volné radikály, zatímco druhý typ zkoumá redoxní vlastnosti látek. Pro srovnání antioxidačních účinků různých vzorků se používá termín „celková antioxidační aktivita“ (TAA), což je množství volných radikálů, které vzorek dokáže eliminovat.

Další rozdělení zahrnuje chemické metody, které měří intenzitu zabarvení vznikající díky obsaženým antioxidantům, a fyzikální metody, které sledují změny fyzikálních vlastností. Existují různé testy pro hodnocení antioxidační aktivity, jako je DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazin), FRAP (test antioxidační síly redukující železo), ABTS (vychytávání radikálů kyseliny 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové) a NO (vychytávání oxidu dusnatého), které se zaměřují na vychytávání radikálů. Celková antioxidační kapacita (TAC) stanovuje celkovou schopnost organismu eliminovat volné radikály. Je však obtížné srovnávat výsledky různých metod, protože existuje mnoho různých antioxidantů a reaktivních látek, které mohou způsobovat oxidační změny a žádná metoda je nedokáže úplně zahrnout [16–19].

Z těchto testů je test DPPH jednoduchý a jeden z nejpoužívanějších metod. Díky své stabilitě a dostatečně vysokému redoxnímu potenciálu oxidovat nejběžnější přírodní antioxidanty, byl navržen pro stanovení antioxidační kapacity biologických materiálů. Radikál DPPH se redukuje na 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazin (DPPH-H) připojením atomu vodíku nebo elektronu k centru radikálu v důsledku reakce s antioxidantem. Ty mohou reagovat s DPPH• různými mechanismy, jako je HAT (přenos atomů vodíku), SET (přenos jednoho elektronu) a SPLET (sekvenční přenos elektronů se ztrátou protonů). Antioxidanty reagují s DPPH• a redukují ho na DPPH-H, což vede ke změně barvy z fialové na žlutou, které lze

spektrofotometricky měřit při vlnové délce 517 nm. Měřítkem antioxidační síly je rozdíl absorbance roztoku radikálu DPPH před a po reakci s antioxidantem [16, 20].

#### 1.1.5.4 Fenolické látky

Fenolické látky jsou organické sloučeniny, které se vyskytují v rostlinách a obsahují jeden nebo více aromatických kruhů s jedním nebo více hydroxylovými substituenty. Fenolické látky mají významnou biologickou aktivitu, která se projevuje jejich schopností ovlivňovat růst a rozmnožování rostlin, ochránit je před patogeny a poskytnout jim charakteristickou vůni, barvu a aroma. Tyto látky mají také vliv na lidské zdraví, protože mohou působit jako hepatoprotektanty, antioxidační látky, antialergeny a protizánětlivé látky. Další vlastnosti zahrnují schopnost příznivě ovlivňovat kardiovaskulární systém, působit proti řadě mutagenů, karcinogenů a mikrobů. Mají antitrombotické a vazodilatační účinky. Antioxidační účinek fenolických sloučenin je odvozen od jejich struktury a může se lišit v závislosti na počtu a poloze hydroxylových substituentů. Tyto sloučeniny jsou důležité součásti lidské výživy a jsou také obsaženy v léčivých rostlinách [21, 22].

Fenolické látky jsou sekundární rostlinné metabolity, které obecně působí jako antioxidanty, pomáhají tlumit kardiovaskulární a nádorová onemocnění, Parkinsonovu a Alzheimerovu chorobu. Lze je rozdělit na:

- fenolové kyseliny (kyselina benzoová a její deriváty, k. gálová a k. allagová),
- flavonoidy (flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony, antokyanidiny, flavanoly),
- stilbeny (resveratrol),
- lignany (matairesinol, sekoisolariciresinol).

Obvykle volné fenolové sloučeniny jsou proanthokyanidiny nebo flavonoidy, zatímco vázané sloučeniny jsou esterové vázané do polymerů buněčné stěny (arabinoxylany, lignin). Ve vázaných polymerech je nejvíce zastoupena kyselina ferulová a její dehydrodimer. Nacházejí se v rostlinách, obilovinách, luštěninách, kávě, čaji či červeném víně. Obvykle se podílejí na obraně proti oxidačním změnám, ultrafialovému záření nebo patogenům. U různých druhů rostlin bylo identifikováno více než 8 000 polyfenolických sloučenin. Všechny rostlinné fenolové sloučeniny pocházejí z meziprojektu fenylalaninu nebo blízkého prekurzoru kyseliny šikimové. Primárně se vyskytují v konjugovaných formách s jedním nebo více sacharidovými zbytky spojenými s hydroxylovými skupinami [23–25].

Termín "fenolické kyseliny" obecně označuje organické sloučeniny, které mají jednu funkční skupinu karboxylových kyselin a jednu hydroxylovou skupinu vázanou na benzenové jádro (aromatický kruh) a řadí se mezi polyfenoly. Některá studia dodává že fenolické kyseliny

pouze ty látky, které mají ve své struktuře C1 – C6 jednotky a jsou odvozeny od kyseliny skořicové. Patří mezi rostlinné fenolické sloučeniny, které se řadí k významným sekundárním metabolitům. Fenolické sloučeniny dodávají jedinečnou chuť, vůni a zdraví prospěšné vlastnosti, které se nacházejí v zelenině a ovoci. Lze je rozdělit na 2 skupiny, a to na fenolické kyseliny odvozené od kyseliny benzoové a fenolické kyseliny odvozené od kyseliny skořicové. Obvykle jsou v rostlinách přítomny vázané ve formě amidů, esterů nebo glykosidů a volné se příliš nevyskytují [21, 25].

Tyto sloučeniny byly studovány především pro jejich vlastnosti proti oxidačnímu poškození vedoucímu k různým degenerativním onemocněním, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, záněty a rakovina. V posledních letech, vzrostl zájem o využití těchto látek ve zpracovaných potravinách jako přírodních antioxidačních látek. Dokonce fenolické složky jako kyselina kávová a kyselina chlorogenová mají silný inhibiční účinek na herpes virus (HSV-1, HSV-2) a adenovirus (ADV-3, ADV-11) [22, 26].

Téměř v každé rostlině se nachází zástupce hlavní třídy fenolických sloučenin kyseliny kafeoylchinové. Jedná z nich je kyselina kávová, která je klíčovým meziproduktem při biosyntéze z ligninu. Druhou je kyselina chlorogenová, která je významná svojí antioxidační aktivitou, antibakteriálními, hepatoprotektivními, kardioprotektivními a protizánětlivými vlastnostmi. Pomáhá proti obezitě a hypertenzi. Předpokládá se, že kyselina chlorogenová může plnit klíčovou roli v regulaci metabolismu lipidů a glukózy, a tím pomáhat při léčbě mnoha poruch, jako je steatóza jater, kardiovaskulární onemocnění, diabetes a také obezita. Kyselina chlorogenová a kyselina kávová jsou in vitro antioxidanty a mají schopnost inhibovat tvorbu mutagenních a karcinogenních N-nitrososloučenin, protože jsou in vitro inhibitory N-nitrosační reakce. Hlavním problémem při měření absorpce kyseliny chlorogenové a kyseliny kávové u lidí je jejich bakteriální degradace v tlustém střevě. Kyselina kávová inhibují oxidaci LDL in vitro, a proto by mohla chránit před kardiovaskulárními chorobami. Nejběžnějším zdrojem těchto kyselin v lidské stravě je pití kávy. Najdeme je také ve víně, kurkumě, bazalce, zelí, jablkách, houbách, olivovém oleji a dalších ovoci [28–30].

Flavonoidy jsou bohatou skupinou rostlinných fenolických látek, které se řadí mezi sekundární metabolity rostlin. Jsou odvozeny od flavanu, který vzniká spojením dvou benzenových kruhů pomocí heterocyklického pyranu. Flavonoidy jsou klasifikovány podle své chemické struktury. Hlavní třídy jsou flavonoly, flavony, flavanony, katechiny, anthokyanidiny, dihydroflavonoly a chalkony. Jednotlivé deriváty odlišují se od sebe stupněm oxidace pyranového kruhu a stupněm substituce. Mohou se vyskytovat ve volné i vázané formě.

Mnoho flavonoidů váží se s cukernou složkou tak vznikají glykosidy, především O-glykosidy [6, 30].

Zastupují ve vyšších rostlinách, a to hlavně v květech, listech a kůře. Často je najdeme v ovoci a zelenině, čaje, víně a pivu, obilí a ořechách. Flavonoidy mají antioxidační účinky, jsou tedy schopny redukovat volné radikály. Vyšší příjem flavonoidů v potravě může působit v prevenci kardiovaskulárních onemocnění, snižovat množství cholesterolu v plazmě a bránit vzniku aterosklerózy [30–32].

## 1.2 Tvrdost vody

Tvrdost vody je dneska známý a používaný termín, přesto v mnoha studiích nenajdeme stejnou definici. Obecně se tvrdostí vody rozumí koncentrace všech vícemocných kationtů kovů alkalických zemin, což je součet koncentrací dvojmocných vápníku (Ca) a hořčíku (Mg). Jsou běžnou součástí povrchových i podzemních vod, především vápník. Jeho koncentrace je však ještě závislá na množství rozpuštěného oxidu uhličitého. Ale přispět mohou i další prvky: hliník, mangan, zinek, baryum, stroncium, železo. Jejich obsah závisí na pH vody a geografickém původu [33,34].

Z technického hlediska existuje několik rozdělení (např.: velmi měkká – měkká – středně tvrdá – tvrdá – velmi tvrdá). Zatímco obě extrémní oblasti tvrdosti mohou způsobovat nežádoucí zdravotní a technické problémy. Určit optimální koncentraci hlavních kationtů Ca a Mg v pitné vodě není snadné. Taky rozlišují dvě hlediska: technologické a analytické, přičemž z hlediska technologického jde o všechny vícemocné kationty kovů a z hlediska analytického se dává tvrdost vody spíše do souvislosti s kationty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  a  $\text{Ba}^{2+}$ , ale někdy jen  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  [35].

Měření obsahu jen vápenatých a hořečnatých iontů má praktické důvody, protože ostatní dvojmocné či vícemocné prvky se ve vodě vyskytují jen ve velmi nízkých koncentracích, a proto nemohou případnou tvrdost vody příliš ovlivnit. Tvrdost vody rozlišujeme dočasnou a trvalou. Dočasná je způsobena převážně hydrogenuhličitanem vápníku a hořčíku a lze ji snadno odstranit převařením vody. Trvalá je způsobena většinou ostatními solí uvedených kovů, zejména sírany vápníku a hořčíku. Celková tvrdost vody je dána součtem dočasné i trvalé a udává se v mmol  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  na 1 dm<sup>3</sup> vody [34]

### 1.2.1 Vliv tvrdosti vody na vlastnostech nápoje z bylin

Tvrdość vody především ovlivňuje kvalitu čaje a bylinných nálevů. Hlavně to působí na barvu. Tvrdość vody nepříznivě ovlivňuje extrakce přírodních barviv z rostlin a obsažené kovové ionty jako ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) působí na celkové pH použité vody na přípravu čajových extraktů. Celkově vysoké množství minerálů zvyšují elektrickou vodivost a reagují s čajovými polyfenolickými sloučeninami za vzniku nekvalitního nálevu s usazeninou. Většina polyfenolických sloučenin je stabilní pouze v kyselém stavu. Dvojmocné kationty mohou tvořit komplexy s fenolickými sloučeninami a tím zhoršit rozpustnost a dostupnost fenolických sloučenin. To může vést ke snížení obsahu fenolů a jeho biologické aktivity v extraktu [36, 37].

Antioxidační aktivita je silně ovlivňovaná katechiny. Katechiny jsou flavonoidy, které ovlivňují chuť a barvu látky, v níž se vyskytují. Nejznámější katechiny jsou epikatechin (EC), epikatechin galát (ECG) a epigalokatechin galát (EGCG), které se vyskytují v zeleném čaji, v kávě a víně. Vysoké teploty a dlouhé inkubační doby ve vodě s vysokým obsahem vápenatých kationtů podporují degradaci molekul a tím i snižuje obsah katechinů [38].

### 1.3 Barevnost

Barva je jednou z důležitých organoleptických vlastností potravin a je celkovým ukazatelem kvality. Vznik barvy je způsoben elektromagnetickým vlněním s různou vlnovou délkou a odlišnost těchto hodnot vytváří u nás vnímání různých barev. Světelné paprsky odražené od předmětu se odrazí na sítnici oka. Každá barva disponuje jinou hodnotou této veličiny. Ale pro člověka existuje několik podmínek pro správné vyjadřování barvy. Pro normální realizaci obrazu je nutná neporušená činnost zraku, důležitou roli hraje i druh osvětlení předmětu. Proto bylo nutný vynalézt takový systém, který by byl nezávislý na individuálním hodnocení a který by byl srovnatelný na různých pracovištích a v různých laboratořích.

Pro správné vyjádření barev jsou potřebné tři údaje: odstín, sytost a jas. Tyto údaje jsou postavené na trichromatické soustavě, která je založena na lidském vidění a zahrnuje funkce X, Y a Z, které měří množství červené, zelené a modré barvy. Určuje odezvu oka na světlo z konstantní svítivosti při různých vlnových délkách. X a Z jsou modifikované funkce, které měří množství červené a modré barvy [39,40].

Hodnoty X, Y a Z jsou definovány následovně:

$$X = k \int_{\lambda} S(\lambda) \bar{x}(\lambda) \beta(\lambda) d\lambda \quad (1)$$

$$Y = k \int_{\lambda} S(\lambda) \bar{y}(\lambda) \beta(\lambda) d\lambda \quad (2)$$

$$Z = k \int_{\lambda} S(\lambda) \bar{z}(\lambda) \beta(\lambda) d\lambda, \quad (3)$$

$$\text{Kde} \quad k = \frac{100}{\int_{\lambda} S(\lambda) \bar{y}(\lambda) d\lambda}, \quad (4)$$

$B(\lambda)$  = spektrální odrazivost vzorku při vlnové délce  $\lambda$ , pro průhledné nebo průsvitné vzorky se jedná o spektrální propustnost  $\tau(\lambda)$ ,

$S(\lambda)$  = spektrální rozložení energie osvětlení podle vlnové délky  $\lambda$ ,

$x(\lambda)$ ,  $y(\lambda)$ ,  $z(\lambda)$  jsou barvové funkce pro 2° standardního pozorovatele,

$k$  je tzv. normalizační faktor, který byl určen tak, aby dokonale odrážející povrch (remise je při všech vlnových délkách 100 %) měl hodnotu trichromatické složky  $Y=100$ .

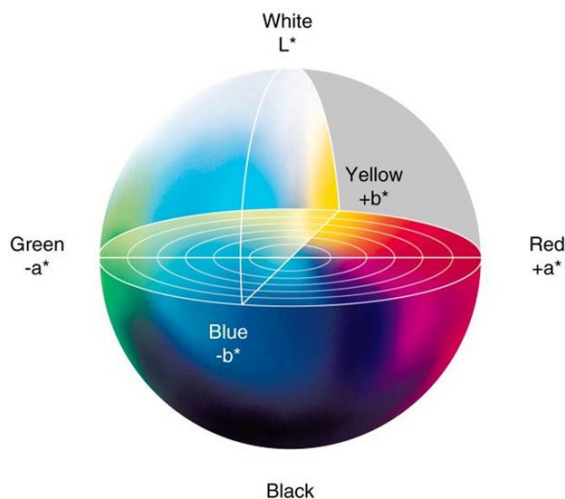
Do dvourozměrného tzv. CIE x, y diagramu lze tento prostor převést tak, že každá složka se vydělí součtem všech tří složek, a tím získáme trichromatické souřadnice  $x=X/(X+Y+Z)$ ,  $y=Y/(X+Y+Z)$ ,  $z=Z/(X+Y+Z)$ . A platí, že  $x+y+z=1$ .

Jestliže prostorová soustava XYZ protne rovinu, která protíná na osách stejné úseky, vznikne v kolorimetrickém prostoru trojúhelník barev. Čisté spektrální barvy v něm obsazené na křivce uzavřené mezi stranami trojúhelníku a každý bod uvnitř této křivky popisuje jednu barvu. Tento barevný prostor se obvykle v běžném životě nepoužívá, ale je základem systému CIE (Mezinárodní komise pro osvětlování), pokud jde o potraviny, nejčastější volbou je CIELAB model a CIELUV [41].

### 1.3.1 CIELAB model

Chromatické diagramy CIE 1931 umožňují vytvoření modelu barevnosti, který pomáhá získat jak vizuální vjemy barev, tak i jejich číselné hodnoty. Tyto barevné prostory jsou nezávislé na zařízení a subjektivních vlastnostech pozorovatele. Základem jsou chromatické diagramy CIE 1931 (x,y), kde hodnota  $L^*$  představuje jas a světlost, která se pohybuje v rozsahu od 0 (černá) do 100 (bílá). Osa  $a^*$  udává polohu barvy na červeno-zelené ose, kde kladné hodnoty vyjadřují červenou barvu a záporné hodnoty zelenou. Na ose  $b^*$  jsou kladné hodnoty žluté a záporné hodnoty modré. Střed kruhového diagramu zobrazuje odstíny šedé barvy [42].





**Obrázek 1** – CIELAB systém [43]

Pomocí tohoto systému je možné vypočítat rozdíl barev  $\Delta E^*_{ab}$  (1), který vyjadřuje barevnou odlišnost mezi pozorovaným předmětem a předlohou.

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

kde  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$  jsou rozdíly souřadnic  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  porovnávaných barev

Obecně platí, že rozdíl barev  $\Delta E^*_{ab} = 1$  je minimální hodnota, kterou je lidské oko schopné rozlišit.

Základní rovnice CIELAB systému jsou:

$$L^* = 116 * \left(\frac{Y}{Y_0}\right)^{1/3} - 16 \quad (6)$$

$$a^* = 500 * \left[ \left(\frac{X}{X_0}\right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_0}\right)^{1/3} \right] \quad (7)$$

$$b^* = 200 \left[ \left(\frac{Y}{Y_0}\right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_0}\right)^{1/3} \right] \quad (8)$$

Kde:

X, Y, Z – trichromatické hodnoty vzorků

$X_0$ ,  $Y_0$ ,  $Z_0$  – trichromatické hodnoty normalizovaného světla pro výpočet upravené tak, aby pro dokonale difuzně rozptylující povrch byly  $Y_0 = 100,00$ .

Model může být použit všude, kde je možno zajistit standardní podmínky pozorování [44, 45].

### 1.3.2 CIELUV model

V roce 1960 byl přijat model CIE LUV. Jeho hodnoty jsou vypočteny nelineární transformací XYZ. Díky čemuž by měl být odražen rozdíl mezi barvami. Ale se ukázalo, že takový soubor proměnných silně omezuje důležité oblasti kolem hnědé, oranžové a žluté, které se často vyskytují v malbě nebo přírodních fotografiích. Proto byla nutná modifikace. Tak v roce 1976 byly vyvinuty proměnné  $u'$  a  $v'$ , čímž vznikl prostor CIE LU'V'.

Souřadnice  $u^*$  a  $v^*$  byly odvozeny pomocí:

$$u^* = 13L \times (u' - u_n) \quad (9)$$

$$\text{kde } u' = \frac{4X}{(X+15Y+3Z)}; \quad u_n' = \frac{4X_0}{(X_0+15Y_0+3Z_0)} \quad (10)$$

$$v = 13L \times (v' - v_n) \quad (11)$$

$$v' = \frac{9Y}{(X+15Y+3Z)}; \quad v_n' = \frac{9Y_0}{(X_0+15Y_0+3Z_0)} \quad (12)$$

Kde:

X, Y, Z – trichromatické hodnoty vzorků

$X_0, Y_0, Z_0$  – trichromatické hodnoty normalizovaného světla pro výpočet upravené tak, aby pro dokonale difuzně rozptylující povrch byly  $Y_0 = 100,00$ .

Souřadnice  $u^*$  a  $v^*$  představují oponentní červeno-zelené stupnice (+ u červených, – u zelených) a soupeřových modro-žlutých stupnic (+  $v$  žlutí, –  $v$  modří). CIELAB a CIELUV korelují světlosti ( $L^*$ ) a sytosti ( $C_{ab}^*, C_{uv}^*$ ) se blíží přirozené proměnné vnímané barvy. Úhel odstínu ( $h_{ab}, h_{uv}$ ), však není tak blízko přirozeným barvám [46–48].

### 1.3.3 Model HSV

HSV model je barevný model, který se nejvíce přibližuje tomu, jak lidské oko vnímá barvy. Každá barva v tomto modelu má tři základní vlastnosti. Odstín (Hue) označuje běžné pojmenování barev, jako například žlutá nebo modrá. Sytost (Saturation) udává množství barvy v poměru k šedé, zatímco jas (Value) udává světlost nebo tmavost barvy. Tyto vlastnosti jsou postačující pro určení barvy [46, 50].

### 1.3.4 Přístroje pro měření barevnosti

Speciální kolorimetrické skříně a fotometry byly jedny z prvních nástrojů pro určování barevnosti. Tyto přístroje měly pár nevýhod. S rozvojem vědy vědci vymysleli další nástroje pro lepší a přesnější hodnoty. Z tohoto důvodu dnes používáme kolorimetry a spektrofotometry.

Kolorimetr je přístroj sloužící k určování přesných hodnot barvy předmětu pomocí snímání fotonů skrze fotočlánky. Díky své citlivosti je schopen, na rozdíl od lidského oka, měřit bez jakéhokoliv vlivu vnějšího prostředí ve dne i v noci a tím eliminuje odchylky při experimentu. Je velmi využíván v praxi kvůli nízké ceně, kompaktnosti a jednoduchému používání. Spektrofotometr je mnohem složitější přístroj než kolorimetr [49, 50]

## 1.4 Použité metody

### 1.4.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je metoda, která se používá k určení vlastností vzorku pomocí měření intenzity zeslabeného monochromatického záření, které prošlo vzorkem a bylo absorbováno různými vlnovými délkami světla. Tento proces umožňuje například měření koncentrace látek v roztoku. Spektrofotometrie využívá jak viditelné (380–780 nm), tak ultrafialové oblasti spektra (200–380 nm). Pokud se měří jen při jedné vlnové délce, metoda se spíše označuje fotometrie. Technicky složitější přístroje, které umožňují vlnovou délku monochromatického světla libovolně nastavit, a vydává číselné údaje o různých barevných prostorech. Tak pomocí něj lze získat graf spektrální odrazivosti, který poskytuje velmi podrobnou informace o měřeném objektu a povaze barvy. Tyhle přístroje se nazývají spektrofotometry.

Spektrofotometrické hodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně (5):

$$A = -\log_{10} \left( \frac{I_t}{I_0} \right) = -\log_{10} T = c \cdot l \cdot \varepsilon \quad (13)$$

$c$  – molární koncentrace roztoku ( $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )

$l$  – tloušťka absorbující vrstvy, nebo optická šířka kyvety (cm)

$\varepsilon$  – molární extinkční koeficient ( $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ), i jiné jednotky

$I_t$  – intenzita záření, které prošlo vzorkem

$I_0$  – intenzitu záření dopadající na vzorek

$A$  – absorbance, bez jednotek

Základní podmínkou proporcionálnosti mezi absorbancí a koncentrací je konstantní hodnota molárního absorpčního koeficientu. Při měření více složek ve směsi najednou je k výpočtu jejich koncentrací potřebná absorbance roztoku při tolika vlnových délkách, kolik je

absorbujících složek. Spektrofotometr má díky své vysoké přesnosti mnoho využití, a to v organické i anorganické analýze, při řešení některých problémů ve fyzikální chemii a v obyčejném průmyslu [50–52].

#### 1.4.1.1 Instrumentace

Standardní spektrofotometry disponují dvěma základními uspořádání a jsou konstruovány jako: jednopaprskové nebo dvoupaprskové, s tím že každá modifikace může mít různé podoby. U nejjednodušších jednopaprskových přístrojů se měření provádí bod po bodu stručným nastavením vlnových délek. Měří se relativní intenzita světla svazku před a po vložení zkušební vzorku. Ve dvoupaprskových přístrojích je svazek záření střídavě veden na vzorek a referenci zároveň [53, 54].

Tyhle dvě modifikace mají čtyři společné části:

- emisní systém – zdroj záření se spojitým spektrem, schopný uvolnit valenční elektrony,
- disperzní systém – monochromátor pro výběr vlnové délky,
- absorpční systém – kyveta, nebo dvojice párových kyvet,
- detekční systém – fotočlánek s vhodným zesilovačem + indikátor / zobrazení signálu.

**Zdroje záření** je součástí spektrofotometru vyzařující světlo, emitující elektromagnetické záření v rozsahu od 190 do 800 nm, které dále prochází vzorkem. Existuje dva zdroje záření: jeden pro UV – a druhý pro Vis-oblast. Pro ultrafialové záření (190-350 nm) nejvhodnější jsou vodíkové či deuteriové výbojky. Pro viditelnou oblast (350-800 nm) jsou nejlepší wolframové či halogenové lampy. Existuje však i zdroj záření schopné pokrývat celé UV – a Vis-spektrum – xenonová výbojka, emitující záření v oblasti 180 až 2500 nm. Hlavním požadavkem pro tento prvek je, aby emitující záření bylo časově stálé a dostatečně intenzivní po celou dobu měření [53, 55].

**Monochromátor** ... Zatím není znám žádný zdroj světla, který by vyzařoval přísně monochromatické záření. Proto se používá optické zařízení, sloužící k vymezení určité části spektra o konkrétní vlnové délce  $\lambda_i$ , resp. v úzkém oboru vlnových délek,  $\Delta\lambda_i$ . Monochromátor tvoří vstupní a výstupní štěrby, disperzní prvek (mřížka, hranol) a pomocná optika (čočky, zrcadla). Polohu štěrby nelze změnit, potřebné vlnové délky je dosaženo pohybem disperzního prvku. Kvalita spektrofotometru je dána především kvalitou monochromátoru [56].

**Pomocná optika** ... upravuje rozložené záření. Zahrnuje zrcadla, čočky a clony. Zrcadla slouží k odražení světelného toku záření, funkci zaostřování světelného záření plní

čočky a vymezení či odstínění svazku paprsků umožňují nastavitelné clony. Součástí pomocné optiky mohou být i speciální interferenční filtry.

**Fotometrická cela a kyvety** ... Rozložené a upravené záření je přivedeno do cely, kde je umístěna kyveta, obsahující analyzovaný roztok a referenční prostředí, většinou použité rozpouštědlo. Kyvety mohou mít velký vliv na přesnost měření a celkový výsledek práce. Jako první musí být zvolen správný materiál kyvety vhodný pro danou měřenou oblast elektromagnetického záření. Dále je také důležité, aby byla kyveta roztokem dostatečně naplněná [57].

**Detektory a detekční jednotky** ... zaznamenávají intenzity paprsku záření, prošlého kyvetou. Jejich principem je přeměna energie světelného záření na elektrický signál, nejčastěji napětí s následnou transformací na elektrický proud. Nejpoužívanějšími detektory pro UV-/Vis spektrofotometrii jsou fotodiody, fotočlánky, fotonásobiče, detektor CCD, či detektor DAD s diodovým polem [56, 58, 59].

### 1.4.2 IČ spektroskopie

Infračervená spektroskopie zapadá do skupiny nedestruktivních analytických metod, kdy zkoumaný vzorek není analýzou poškozen, a přesto poskytuje informaci o svém složení. Používá se v organické a anorganické chemii k identifikaci různých směsí a k získávání informací o molekulární struktuře látky.

Rozděluje se na 3 oblasti:

- blízká IČ oblast:  $12500\text{--}5000\text{ cm}^{-1}$  (Near Infrared, NIR)

Vzorky, v této oblasti, vyžadují minimální nebo žádnou přípravu. Je možné rychle analyzovat velké množství vzorků bez jejich destrukce.

- střední IČ oblast:  $5000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$  (Mid Infrared, MIR)

Zatímco první zmíněná oblast je vhodná pro identifikaci funkčních skupin (např.  $\text{--OH}$ ,  $\text{C=O}$ ,  $\text{N--H}$ ,  $\text{CH}_3$  aj.), v druhé oblasti jsou pásy, které nelze přidělit funkčním skupinám, ale jsou charakteristické pro molekulu jako celek.

Mezi oblastmi MIR a FIR není jasná hranice.

- vzdálená IČ oblast:  $500\text{--}10\text{ cm}^{-1}$  (Far Infrared, FIR)

Využívá se pro analýzu organických, anorganických a organometalických sloučenin obsahující atomy s hmotnostním číslem větším jak 19 např. pro identifikaci a rozdělení minerálů. Pro tuto

oblast záření je zapotřebí speciálních optických materiálů a zdrojů. Poskytuje informace o uspořádání krystalové mřížky a její dynamiky.

Látky poskytující signál v IR spektru:

- látky, jejichž molekuly obsahují (alespoň slabě) polární vazby,
- molekuly složené z různých atomů,
- organické sloučeniny a anorganické sloučeniny (H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, HCl, soli...).

Velkou výhodou IČ je, že látky mohou být změřené ve stavu plynném, kapalném nebo v pevném [60].

Podstatou infračervené spektroskopie je interakce infračerveného záření se studovanou molekulou, kdy v případě pohlcení fotonu molekulou mluvíme o absorpční infračervené spektroskopii a v případě vyzáření fotonu o emisní infračervené spektroskopii. Energie fotonů tohoto záření je dostatečná ke změně vibračního či rotačního potenciálu molekuly, ale nepostačuje pro excitaci elektronů v molekulových orbitalech. Pro identifikaci a určování chemické struktury látek má největší význam střední infračervená oblast od 4000 do 200 cm<sup>-1</sup>. Kromě základních vibračních módů se ve spektru objevují i další faktory, jako jsou kombinační pásma a vazebné a vibrační rotační pásma [61–63].

#### 1.4.2.1 Instrumentace v IČ spektrometrii

Pro měření absorpčních spekter se používají infračervené spektrometry nebo také spektrofotometry. Nejčastěji používanými přístroji v infračervené spektroskopii je disperzní infračervený spektrometr, FTIR spektrometr s ATR technikou a infračervený spektrometr s Fourierovou transformací.

##### **Disperzní spektrometr**

Jako zdroj záření se používá keramická tyčinka, žhavená na teplotu 1000 až 1400 °C. Může být vyrobena z karbidu křemíku nebo směsi oxidů vzácných zemin – Nernstova tyčinka. Pro oblast blízkou IČ – W nebo W-halogenová žárovka. Pro střední oblast – elektricky ohřívána (1100 °C) tyč ze SiC, lasery CO<sub>2</sub>, PbS. Pro oblast vzdálené IČ – vysokotlaká Hg výbojka. Záření prochází vzorkem, který je umístěn v kyvetě. Důležitý je materiál kyvety, protože musí být propustný pro IČ záření. To poskytují: halogenidy kovů (především alkalických: NaCl, KBr, CsI, CaF<sub>2</sub>, TlI, TlBr). Čím větší propustnost má daný materiál, tím horší rozlišovací schopnost má hranol z něj vyrobený. Za kyvetou se paprsek přivádí na vstupní štěrbinu monochromátoru. Jako detektory se používají dva základní typy: termoelektrický a pyroelektrický detektor [64, 65].

## **FTIR spektrometr s ATR technikou**

Zařízení používané k analýze chemických látek na základě úplného odrazu záření na rozhraní mezi měřeným vzorkem a krystalem s vysokým indexem lomu je FTIR s ATR nástavcem (Attenuated Total Reflectance). Princip měření spočívá v tom, že vzorek je umístěn na ATR krystalu z materiálu o vysokém indexu lomu (ZnSe, AgCl, Si, Ge), kam je nasměrováno infračervené záření. Toto záření proniká do vzorku asi 1–4  $\mu\text{m}$  hluboko a interaguje s molekulami, což způsobí absorpci záření při specifických vlnových délkách, které klesá exponenciálně se vzdáleností od rozhraní. Vzorek způsobuje částečnou reflexi zpět na ATR prizmu, která následně detekuje změnu intenzity záření. Tato změna intenzity se poté používá ke stanovení absorpčního spektra vzorku. Tato technika má malou penetrační hloubku, což umožňuje měření silně absorbujících vodných roztoků bez deformace pásů vody. Vzhledem k tomu, že ATR technika umožňuje měřit vzorky bez nutnosti jejich přípravy a často je používána k analýze pevných materiálů a tekutin, je tato technika velmi užitečná pro mnoho různých aplikací v oblastech jako jsou potravinářský průmysl, lékařství, chemie a materiálové vědy [66, 67].

## **IČ spektrometrie s Fourierovou transformací**

Zdroj záření je stejný jako v disperzním přístroji – keramická tyčinka. Ale na rozdíl od disperzního přístroje tenhle typ nemá monochromátor. Navíc je přidán interferometr, který pracuje na principu Michelsonova interferometru, který zahrnuje: dělič paprsků, pohyblivé a pevné zrcadlo. Rychlost pohybu zrcadla je přizpůsobena časové odezvě detektoru, závislé na typu použitého detektoru. Z jednoho pohybu zrcadla je získán jeden interferogram, který se Fourierovou transformací převádí z časové škály do frekvenční nebo vlnočtové na spektrum odpovídající jednomu skenu. Největší výhody FTIR jsou: současný záznam celého spektra, vyšší citlivost a stabilita, vyšší rozlišovací schopnost [68, 69].

### **1.4.3 Voltametrie**

Voltametrie je elektrochemická technika, založená na vnučování vnějšího, časově řízeného potenciálu, které vyvolá u nakoncentrované látky požadovanou elektrochemickou přeměnu a tím průtok proudu. Konečným výsledkem je záznam závislost proudu na vkládaném potenciálu,  $I(i)$  vs. ER.

Striping voltametrie je unikátní voltametrická metoda pro kvantitativní detekci. Zahrnuje dva hlavní kroky: (i) akumulací krok, jehož úlohou je koncentrovat analyty

na povrchu senzoru; a (ii) krok detekce, během kterého dochází k obrácené reakci prvního kroku. Díky prekoncentračnímu kroku vykazuje stripovací voltametrie vyšší citlivost než přímé metody. Velkou výhodou voltametrie je jednoduchá a finančně dostupná výbava. V současnosti se používají univerzální elektro-chemické analyzátory stavebnicového charakteru, pro kontrolu potenciálu a citlivé měření proudu. Základní analyzátory jsou vybavené:

- funkčním systémem – je to vnitřní systém přístroje,
- řídicím systémem a ovládacím panelem – zde je schovaná jednotka ovládaní modulu a zpracování signálů,
- elektrodovou celou a stojanem.

Typická elektrodová cela je tří-elektrodová. Kde se nachází pracovní elektroda (WE). Zde je zajištěno, že potenciál této elektrody odpovídá vkládanému napětí a tím i příslušné proudové odezvě. Ideálními jsou: visící rtuťová kapková elektroda, rtuťová filmová elektroda, elektroda ze skelného uhlíku nebo platiny. Druhá elektroda je srovnávací / referentní (RE). Její funkce je vytvořit srovnávací prostředí. Ve většině případů se používá chloridostříbrná elektroda nebo tradiční nasycená kalomelová. Poslední elektroda je pomocná (CE). Hlavní úkol – chránit referentní elektrodu před polarizací. Je tvořena platinovým plíškem nebo diskem ze skelného uhlíku, které jsou upevněné ve skleněné trubičce s elektrickým kontaktem.

Neustálý vývoj této oblasti, pro mnohem lepší citlivost, přinesl řadu modifikací, kde potenciál se aplikoval ve formě pulsů s definovanými charakteristikami a měřením proudu v krátkém čase. V současné době je několik komerčně dostupných pulzních voltametrických technik: diferenciální pulzní voltametrie (DPV), squarewave voltametrie (SWV), normální pulzní voltametrie (NPV), diferenciální squarewave voltametrie (DSWV) nebo cyklická squarewave voltametrie (CSWV). Všechny pulzní voltametrické techniky mají různou formu aplikovaných potenciálních pulsů a také se liší v aktuálním vzorkovacím postupu [70, 71].

V současné elektroanalýze jsou pulzní voltametrické techniky středem zájmu kvůli citlivosti a rychlosti měření. Vedoucí technikou je squarewave voltametrie (SWV), kde potenciál vnucovaný na elektrody, tzv. potenciálová rampa, mění se lineárně v čase a zároveň je modulován, jde o pravoúhlý průběh střídavého napětí. Její hlavní výhodou je rychlost, citlivost a identifikace velkého množství dat, což umožňuje více vzorkový aktuální protokol z jediného voltametrického experimentu. Výsledkem měření jsou typické křivky první derivace a jednotlivé analytické signály vypadají jako symetrické píky. S rozvojem SWV tato technika se začala používat pro mechanistickou i kinetickou analýzu elektrodových procesů. Hlavně v případech komplikovaných adsorpčních elektrodových procesů je nepostradatelnou pro kinetickou charakterizaci [72, 73].



#### 1.4.4 ISP/MS

Induktivně vázaná plazmová hmotnostní spektrometrie (ICP-MS) umožňuje rychlé a citlivé stanovení většiny prvků včetně těžkých kovů nebo syntetických drog ve všech oblastech prvkové analýzy. Taky je velmi užitečnou u stanovení základních nebo toxických prvků v různých vzorcích potravin, například pro zeleninu, ořechy, čaje a vína. Její největší výhodou je vysoká univerzálnost, citlivost a možnost stanovení na stopových hladinách koncentrací jednotlivých prvků s minimálními interferencemi. Tak hmotnostní spektra prvků jsou velice jednoduchá a jednoznačná. Ale na druhou stranu vyžaduje vyšší provozní i investiční náklady. ICP– MS se často používá v kombinaci s elektrotermickým vypařováním (ETV) nebo s vysoce účinnými separačními technikami (HPLC, GC, CE).

Pomocí ICP– MS se vzorky ionizují v argonovém plazmatu za vysoké teploty (kolem 6000-10000 K) a jsou analyzovány na základě jejich hmotností a nábojů. ICP-MS zahrnuje čtyři hlavní procesy – zavedení vzorku do zmlžovače, kde vzniká aerosol, vedený k plazmatu. Tam dochází k odpaření rozpouštědla, atomizaci vzorku a ionizaci atomů. Nejpoužívanějším typem analyzátoru, který dělí jednotlivé ionty dle poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ), je analyzátor kvadrupólový. Konečným procesem je detekce, kde je použit iontový násobič [74–77].

#### 1.4.5 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační chromatografická technika založená na principu rozdílné distribuce látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi: mezi fází mobilní (MF) a fází stacionární (SF) kde je nezbytný vznik fázového rozhraní. Při průchodu vzorku přes stacionární fázi dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek mezi oběma fázemi. Jako stacionární fáze mohou být nejčastěji porézní nebo povrchově porézní částice nebo monolit. Silikagel, který lze chemicky modifikovat na potřebnou polaritu, se používá jako nosič. Jako mobilní fáze může být kapalina různé polarity v závislosti na používaném chromatografickém systému například: organické rozpouštědlo, směs rozpouštědel nebo vodné roztoky. Své široké využití tato technika našla ve farmaceutice, biochemii a v analýze organických látek. Existuje rozdělení techniky podle typu fáze, tak jestli polární médium je zakotvený a mobilní fází tvoří nepolární rozpouštědlo hovoříme o chromatografie s normální fází. Naopak jestli nepolární sorbenty vystupují jako stacionární fáze a mobilní fáze je polární rozpouštědlo takový typ se jmenuje – chromatografie na obrácených fázích [78, 79].

Nejrozšířenější technikou kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography). Oproti klasické verze obsahuje vysokotlaké čerpadlo (30–50 MPa), které umožňuje dávkování velmi malých objemů vzorku ( $\mu\text{l}$ ) na zakotvenou SF, kde rozměry částic dosahují velikosti několik mikrometrů. Díky tomu dosahuje HPLC vyšší účinnosti za kratší čas. Dalšími součásti jsou dávkovací ventil, chromatografické kolony, detektor a software pro zpracování dat [78–81]

## 2 Experimentální část

### 2.1 Přístroje a chemikálie

#### 2.1.1 Přístrojové vybavení

- Digitální analytické váhy KERN 220–4M (Kern & Sohn GmbH, Německo),
- pH-metr SCHOTT (SCHOTT AG, Německo),
- Nicolet iS50 FT-IR (Nicolet CZ, ČR),
- UltraScan VIS (HunterLab, USA),
- DATA Logger LOG 32 (DOSTMANN Electronic GmbH, Švýcarsko),
- Spektrofotometr UV-VIS Shimadzu UV–2600 (Shimadzu, Japonsko),
- Kvadrupólový hmotnostní spektrometr Agilent 7900 (Q-ICP-MS, Agilent Technologies, Inc., USA),
- Centrifuga Sorvall ST4 Plus–MD (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mass, USA),
- Běžné laboratorní vybavení.

#### 2.1.2 Použité chemikálie

- Antimon (III)-chlorid, 99,5 % (Acros organics, Geel, Belgie),
- Destilovaná voda (Univerzita Pardubice, ČR),
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR),
- DPPH radikál, 1,1-difenyl-2-(2,4,6-nitrofenyl) hydrazyl (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo),
- Dusičnan strontnatý čistý (Lachema n. p. Brno, ČR),
- Ethanol 96 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR),
- Ferrozin (3-(2-Pyridyl)-5,6-difenyl-1,2,4,-triazin-p,p'-hydrát monosodné soli disulfonové kyseliny) (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo),
- Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo),
- Fosforečnan draselný bezvodý (J.T. Baker, Německo),
- Hydrogen uhličitán sodný (Lachema n. p. Brno, ČR),
- Hydroxid sodný (PENTA, s.r.o., Praha, ČR),
- Chlorid barnatý (Lachema n. p. Brno, ČR),
- Chlorid draselný (PENTA, s.r.o., Praha, ČR),

- Chlorid hlinitý hexahydrát (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR),
- Chlorid hořečnatý hexahydrát (PENTA, s.r.o., Praha, ČR),
- Chlorid manganatý tetrahydrát (Lachema n. p. Brno),
- Chlorid vápenatý bezvodý (PENTA, s.r.o., Praha, ČR),
- Chlorid zinečnatý (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR),
- Komplexon III (PENTA, s.r.o., Praha, ČR),
- Kyselina chlorovodíková 35 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR),
- Kyselina octová 99 % (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR),
- Methanol  $\geq 99,9$  % (Honeywell, Morristown, USA),
- Molybden sodný p.a. (Lachema n. p. Brno, ČR),
- Octan sodný (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo),
- Síran hořečnatý (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo),
- Síran vápenatý (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo),
- Tetrahydrát chloridu železnatého (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo).

## 2.2 Příprava chemických roztoků

### 2.2.1 Příprava pufrů

Na přípravu bylinných nálevů byly použity několik druhů fosfátového pufrů, a to o pH 7,0; 7,5 a 8,0, které byly připravené podle **Tabulky 1**. Dále byla připravena velmi tvrdá voda (VTV), kde na analytických vahách bylo naváženo přesné množství NaHCO<sub>3</sub> (0,384 g.), CaSO<sub>4</sub> (0,24 g.), MgSO<sub>4</sub> (0,24 g.) a KCl (0,016 g.) a rozpuštěno v destilované vodě.

**Tabulka 1** – Množství chemikálii (g/l) na přípravu fosfátových pufrů o různém pH

Fosfátový pufr	Použité chemikálie (g.)	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH 7,0	9,343	6,309
pH 7,5	12,813	3,598
pH 8,0	16,282	0,8878

Taky byl připraven Britton-Robinsonův pufr tak, že do 500 ml odměrné baňky odměřeno 1,16 ml ledové CH<sub>3</sub>COOH (0,04 M), 1,35 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,04 M), 1,2366 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,04 M) a vše bylo doplněno destilovanou vodou po risku a dobře promícháno. Dále byl připraven roztok 0,2 mol/l NaOH. Smícháním vhodných množství Britton-Robinsonova pufru a roztoku NaOH do 250 ml banky byl připraven pufr o pH 8,0. Hodnoty pH byly vždy kontrolovány pomocí pH metru se skleněnou elektrodou.

### 2.2.2 Příprava činidla DPPH a měření antioxidačních vlastností extraktu

Byl připraven metanolický roztok DPPH radikálu navážením 12,5 mg činidla do 500 ml odměrné baňky. Bylo pipetováno 5 ml roztoku radikálu DPPH a 100 μl naředěného vzorku do zkumavky s víčkem. Takto připravená reakční směs byla ponechána 30 minut v temnu při laboratorní teplotě. Po uplynutí reakční doby byla změřena absorbance při 517 nm. Takhle byly 2x proměřené vzorky extraktů v destilované vodě, ve velmi tvrdé vodě, ve fosfátovém pufru o pH 7,0, 7,5, 8,0. Stejným způsobem byly připraveny i slepé pokusy, které místo vzorku obsahovaly destilovanou vodu. Výsledky byly vyjádřeny jako % inhibice vypočítané podle vzorce (14):

$$\text{Inhibice \%} = \frac{A_{sl} - A_v}{A_{sl}} \times 100 \quad (14)$$

A<sub>sl</sub> – absorbance slepého pokusu

A<sub>v</sub> – absorbance vzorku

### 2.2.3 Příprava roztoků EDTA a anorganických solí

Nejdřív byly připravené roztoky EDTA smícháním určitého množství sypké disodné soli EDTA (Chelatonu III) (vždy 0,05 g, 0,1 g, 0,2 g, 0,3 g, 0,5 g, 0,8 g, 1 g) s 20 ml roztoku extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 do skleněných baněk s uzavíratelným víčkem. Pro kontrolu byl připraven i slepý pokus s pouhým roztokem extraktu lopuchu bez přídavku EDTA.

Dále byly připravené roztoky EDTA o koncentraci 0,2 M a 0,1 M do 250 ml baněk. Takhle připravené roztoky byly zředěné destilovanou vodou do potřebných koncentrací (0,05 M, 0,033 M, 0,025 M, 0,05 M, 0,005 M, 0,0005 M), dále 1 ml z každé koncentrací byl smíchán ve skleněné bance s uzavíratelným víčkem s 20 ml extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0. Stejným způsobem byl připraven i slepý pokus, avšak místo roztoku EDTA byla použita destilovaná voda.

Na přípravu roztoků organických solí byly použité chloridy ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sb}^{3+}$ ), sírany ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ),  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  a  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Sírany ( $\text{MgSO}_4$  a  $\text{CaSO}_4$ ) byly přesně naváženy na analytických vahách a převedené do 100ml banky s výslednou koncentrací  $\text{MgSO}_4$  0,5 M a  $\text{CaSO}_4$   $1,84 \times 10^{-2}$  M. Dále postupným ředěním ze zásobního roztoku  $\text{MgSO}_4$  byly připraveny roztoky o koncentraci 0,25 M, 0,33 M, 0,1 M. Stejným způsobem byly připraveny roztoky  $\text{CaSO}_4$  o koncentraci  $9,2 \times 10^{-3}$  M,  $3,07 \times 10^{-3}$  M. U takto připravených anorganických solí byly změřené barva a voltametrické měření pro potvrzení výsledků.

### 2.3 Příprava bylinných nálevů

Jako vzorek byl použit sušený kořen *Arctium lappa L* (BYLINY Mikeš s.r.o., Číčenice, Česká republika). Bylinné nálevy byly připraveny do fosfátových pufrů o pH 7,0; 7,5 a 8,0, BR pufru o pH 8,0 a velmi tvrdé vody. Extrakční roztok byl zahříván k varu a takto byl udržován 1 min. Poté bylo rychle odměřeno 200 ml odměrným válcem, přelit do kádinky a navážka pevného vzorku byla louhována 10 min. Extrakt byl přefiltrován přes skládaný filtr a ochlazen pod proudem studené vody. Nálevy byly uskladněny na tmavém místě při laboratorní teplotě 24 h. Stejným způsobem byl připraven nálev v destilované vodě.

### 2.4 Měření pH

Pomocí předem kalibrované pH měrné skleněné elektrody bylo měřeno pH čistých extrakčních roztoků před a po varu. Stejným způsobem bylo měřeno pH bylinných nálevů.

## 2.5 Spektrometrická měření

### 2.5.1 Měření barevnosti v systému CIELa\*b\* a CIELUV

Pro měření barevnosti zkušebních vzorků byl použit UltraScan VIS s integrační koulí v geometrii  $d/8^\circ$  a standardizovaným osvětlením D65, měření bylo prováděno v rozsahu 480–700 nm po 1,0 nm. Před měřením bylo nutné měřicí přístroj standardizovat. Barva byla měřena v režimu celkové transmitance v kyvetě s optickou dráhou 50 mm. Standardizace byla provedena vždy stejným způsobem podle předepsaného postupu v technických listech. Po standardizaci byla kyveta naplněna vzorkem a následně změřena barevnost roztoku. U všech vzorků byly měřeny parametry barevnosti  $L^*$ ,  $a^*$  a  $b^*$ ,  $C^*$  a  $h^\circ$ , a to jak u čerstvých vzorků, tak u vzorků po uskladnění během 24 hodin. Kromě toho bylo měření barevnosti provedeno v závislosti na čase. Vzorek byl umístěn do kyvety ihned po ochlazení a měření bylo prováděno každých 60 min po dobu 24 h. Výsledky byly zpracovány ve softwaru EasyMatchQC verze 4.96 (HunterLab).

### 2.5.2 Měření absorpčních křivek ve viditelné a UV oblasti

Ke spektrofotometrickému měření byl použit přístroj UV–VIS Shimadzu UV–2600, kdy byly vzorky měřeny ve skleněných kyvetách (10 mm) pro VIS oblast a v křemených kyvetách (10 mm) pro UV oblast. Skenovací rychlost pro obě oblasti byla nastavená na medium. Měřicí interval pro viditelnou oblast byl nastaven na 800–450 nm, UV oblast na 400–210 nm. Měření probíhalo při rychlosti skenu „medium“ s citlivostí 0,1 nm. Byly měřeny jak čerstvě připravené extrakty, tak i extrakty, které byly uchovávány ve tmě po dobu 24 hodin. Spektra ve viditelné oblasti byla také měřena v závislosti na čase, tj. po ochlazení bylo spektrum sejmuto každých 60 min po dobu 24 h. V případě měření spekter v UV oblasti byly vzorky vždy 20x ředěné v daném extrakčním rozpouštědle. Výsledky byly zpracovány pomocí programu UVProbe verze 2.7 (Shimadzu).

### 2.5.3 Měření infračerveného spektra

Infračervené spektrum bylo změřeno u nálevů připravených do vody destilované, do velmi tvrdé vody, do fosfátového pufru o pH 7,0, 7,5, 8,0 a do Britton-Robinsonova pufru. Připravené podle postupu v kapitole 2.3. Z těch nálevů bylo odebráno 15 ml z každého čerstvého roztoku a z roztoků po 24 hodinách. Které byly následně nality na Petriho misku (průměr 100 mm) s výškou hladiny 5,0 mm, vysušeny v liofilizátoru (L4 - 110, Gregor instrum, s.r.o., ČR) při  $-110^\circ\text{C}$  během 24 hodin a následně zeškrabány do uzavíratelných plastových baněk

jako prášek. Měření probíhalo na přístroji Nicolet iS50 FTIRS. Byla nastavena metoda iS50 ATR Lab., spektra byla snímána v rozsahu 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  a to v počtu 64 skenů. Vzorek byl pomocí kopistu nanášen na ATR modul a následně změřen proti vzduchu. Výsledky byli zpracovány ve softwaru OMNIC (Thermo Scientific).

## 2.6 Voltametrická měření nálevů

Voltametrické měření bylo prováděno v tříelektrodevém uspořádání složené z elektrody z uhlíkové pastové elektrody (CPE), kalomelové elektrody a pomocné elektrody z platinového drátu. Zmíněné elektrody byly připojeny k potenciostatu Autolab PGSTAT101 od společnosti METROHM (Praha, Česká Republika).

Měření se uskutečňovala ve skleněné voltametrické cele, která obsahovala 16 ml zkoumaného vzorku. Před každým měřením bylo nutné obnovit povrch uhlíkové pastové elektrody leštěním po dobu 10 s pro odstranění případných zbytků produktů různých vod a produktů na povrchu elektrody. Byla zvolena metoda square-wave voltametrie (SWV) s následujícími parametry:

- Počáteční potenciál 0 V.
- Koncový potenciál +1,2 V.
- Potenciálový krok (Estep) 5 mV.
- Rychlost skenu ( $v$ ) 50  $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .
- Frekvence 10 Hz.

Takovým způsobem byly proměřené roztoky extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 s přídavkem různého množství EDTA a anorganických kovů. Během měření byl pro nastavení parametrů metody, zaznamenání a vyhodnocení výsledků použit software Nova verze 1.11. Statistické údaje byly následně zpracovány v programu Excel.

## 2.7 Minerální analýza nálevů

Všechny vzorky byly zmineralizovány v mikrovlnné peci Speedwave XPERT od firmy Berghof, (Eningen, Německo) s výkonem 2000 W.

Rozklad vzorků byl proveden ve třech replikách. Do každé teflonové rozkladné nádoby bylo naváženo přesně okolo 0,1 g vzorku a bylo přidáno 5 ml 16 %  $\text{HNO}_3$  a 2 ml 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Mineralizace proběhla při teplotě 220 °C, která byla držena 35 minut [82].

Analýza vzorků byla provedena pomocí kvadrupólového ICP-MS Agilent 7900 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Spektrometr je vybaven kolizní celou využívající



kolizní plyn He k eliminaci spektrálních interferencí. Podrobnější pracovní podmínky jsou uvedeny v publikaci [82].

## **2.8 Kapalinová chromatografie nálevů lopuchu**

Analýza vzorků pomocí HPLC byla provedena na kapalinovém chromatografu firmy Shimadzu. Kde jako čerpadla A a B mobilní fáze se používal LC-AD 20XR. Jako detektor byl použit spektrofotometrický detektor s diodovým polem SPD-M30A a autosampler SIL 20AC s automatickým dávkováním vzorku (vše vyrobeno Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Separace probíhala na koloně Kinetex C18 Polar (150x3 mm; 2,6  $\mu\text{m}$  částice, Phenomenex, Torrance, Kalifornie, USA). Zpracování dat z UV detektoru a chromatografických píků bylo prováděno pomocí programu LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a výsledné grafické a matematické zpracování v programu Excel (Microsoft, Redmont, Washington, USA).

Měření probíhalo za isokratické eluce 10–100 % (v/v) methanolu za 15 minut s teplotou nastavenou termostatem Column oven LCO 102 (ECOM spol. s r.o., ČR) na 30°C s průtokem mobilní fáze 0,4 ml/min. Dávkovaný objem byl 2  $\mu\text{l}$  s vlnovou délkou v rozsahu 200–700 nm. Vzorky byly připravené standardním způsobem, který byl popsán v kapitole Příprava bylinných nálevů, kde se měřily extrakty připravené v destilované vodě, ve velmi tvrdé vodě, ve fosfátovém pufru pH 8,0 a Britton-Robinsonově pufru pH 8,0. Pro HPLC analýzu byly vzorky filtrované přes stříkačkový PTFE filtr (0.45  $\mu\text{m}$ ).

## **2.9 Zpracování a hodnocení získaných údajů**

Všechna data byla zpracována v programu Microsoft Office Excel. V tomto programu docházelo k vyhodnocování dat. Výsledky byly vyjádřeny jako aritmetický průměr  $\pm$  standardní odchylka. Výsledky minerální analýzy byly zpracovány vícerozměrnou statistickou metodou (analýza hlavních komponent) na hladině pravděpodobnosti  $p=0,05$ .

### 3 Výsledky a diskuse

#### 3.1 Měření pH roztoků

V rámci této studie byly porovnány hodnoty pH extraktů lopuchu připravených v různých typech vody a pufrů.

**Tabulka 2** – Hodnoty pH různých extraktů

Vzorek	Hodnoty pH extraktů	
	čerstvý roztok	po 24 hodinách
<b>Dezo.</b>	6,1	6,3
<b>VTV</b>	7,3	7,4
<b>F. pH 8</b>	8,0	8,0
<b>F. pH 7,5</b>	7,3	7,3
<b>F. pH 7</b>	6,9	6,8
<b>B-R.</b>	8,0	7,7

Dezo. – extrakt lopuchu v deionozované vodě, VTV – extrakt lopuchu ve velmi tvrdé vodě, F. pH 8 – extrakt lopuchu v fosfátovém pufru pH 8, F. pH 7,5 – extrakt lopuchu v fosfátovém pufru pH 7,5, F. pH 7 – extrakt lopuchu v fosfátovém pufru pH 7, B-R. – extrakt lopuchu v Britton-Robinsonově pufru pH 8

V přítomné studii byly sledovány pH hodnoty extraktů lopuchu připravených v různých prostředích (**Tabulka 2**). Výsledky ukazují, že se u některých extraktů liší hodnoty pH čerstvě připravených roztoků a roztoků po 24 hodinách. Konkrétně se jedná o extrakt lopuchu v demineralizované vodě, kde pH hodnota po 24 hodinách stoupla z 6,1 na 6,3, a extrakt lopuchu ve velmi tvrdé vodě, kde pH hodnota po 24 hodinách mírně stoupla z 7,3 na 7,4. Dále se u některých extraktů pH hodnota po 24 hodinách snížila, a to u extraktu lopuchu v Britton-Robinsonově pufru pH 8,0, kde pH hodnota klesla na 7,7, a u extraktu lopuchu v fosfátovém pufru pH 7,0, kde pH hodnota klesla z 6,9 na 6,8. Je možné, že tyto změny pH hodnot po 24 hodinách mohou mít vliv na stabilitu extraktů, a to zejména u extraktů s nestabilním pH. I když je rozdíl v hodnotách pH minimální ( $\Delta$  0,1–0,2), nebylo dosud ověřeno, zda je tento rozdíl zásadní s ohledem na tvorbu zeleného zbarvení. V dalších experimentech (vliv EDTA a iontů kovů) byl proto použit pouze fosfátový pufr (pH 8,0) pro maximální eliminaci výkyvů hodnot pH.

## 3.2 Vlastnosti nálevů v bazickém prostředí

### 3.2.1 Měření barevnosti

Vzorky byly změřeny dvakrát a výsledky byly uvedeny jako aritmetický průměr se standardní odchylkou měření. Písmeno z označují statisticky významný rozdíl studentova t-testu na hladině  $\alpha = 0,05$ . Pokud bylo  $p > 0,05$ , platila nulová hypotéza, a tedy shodnost výsledků v rámci hladiny statistické významnosti  $\alpha = 0,05$ . Pokud by  $p < 0,05$ , platila by alternativní hypotéza, která by vyvracela shodnost v rámci hladiny statistické významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Tabulka 3 – Barevnost připravených nálevů

Vzorek	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*$	$h$ (°)	Barva <sup>1</sup>
Dezo. čerstvý	87,9± 3,4	1,8±0,5	23,9±4,4	87,9±4,4	23,9±1,7	
Dezo. po 24 h.	85,85±1,5	-2,25±0,1	22,5±1,4	85,9±1,4	22,6±0,5	
VTV čerstvý	85,1±2,4	-6±1,4	37,8±1,9	85,1±1,7	38,3±2,4	
VTV po 24 h.	59,9±3,1	-30,5±2,4	23,7±4,3	59,9±1	38,9±7	
F. pH 8,0 čerstvý	76,05±2	-4,5±2,3	48,9±3	76,1±2,9	49,2±2,8	
F. pH 8,0 po 24 h.	65,3±1,1	-14±2,3	42,1±1,4	65,3±1,2	44,4±3,1	
F. pH 7,5 čerstvý	84,3±0,4	-3,9±0,4	34,8±0,1	84,4±0,1	35±0,6	
F. pH 7,5 po 24 h.	81,2±0,4	-5,2±0,7	37,6±0,4	81,2±0,9	38±1,2	
F. pH 7,0 čerstvý	82,9±1,3	-2,2±0,5	35,7±2,2	82,9±2,2	35,8±1,1	
F. pH 7,0 po 24 h.	83,5±2,1	-0,9±0,8	40,1±3	83,5±3	40,1±1,3	
B-R. čerstvý	81,9±3,5	-4,6± 0,7	32,6 ±1,6	32,9 ±1,5	98,1± 1,6	
B-R. po 24 h.	71± 9,4	0,1± 2,7	36,4± 1,8	36,4 ±1,8	89,7 ±4,3	

Dezo. – extrakt lopuchu v deionizované vodě, VTV – extrakt lopuchu ve velmi tvrdé vodě, F. pH 8 – extrakt lopuchu v fosfátovém pufru pH 8,0, F. pH 7,5 – extrakt lopuchu v fosfátovém pufru pH 7,5, F. pH 7 – extrakt lopuchu v fosfátovém pufru pH 7,0, B-R. – extrakt lopuchu v Britton-Robinsonově pufru pH 8,0

1 – skutečná barva vzorku zjištěna podle parametrů  $L^*a^*b^*$  [83]

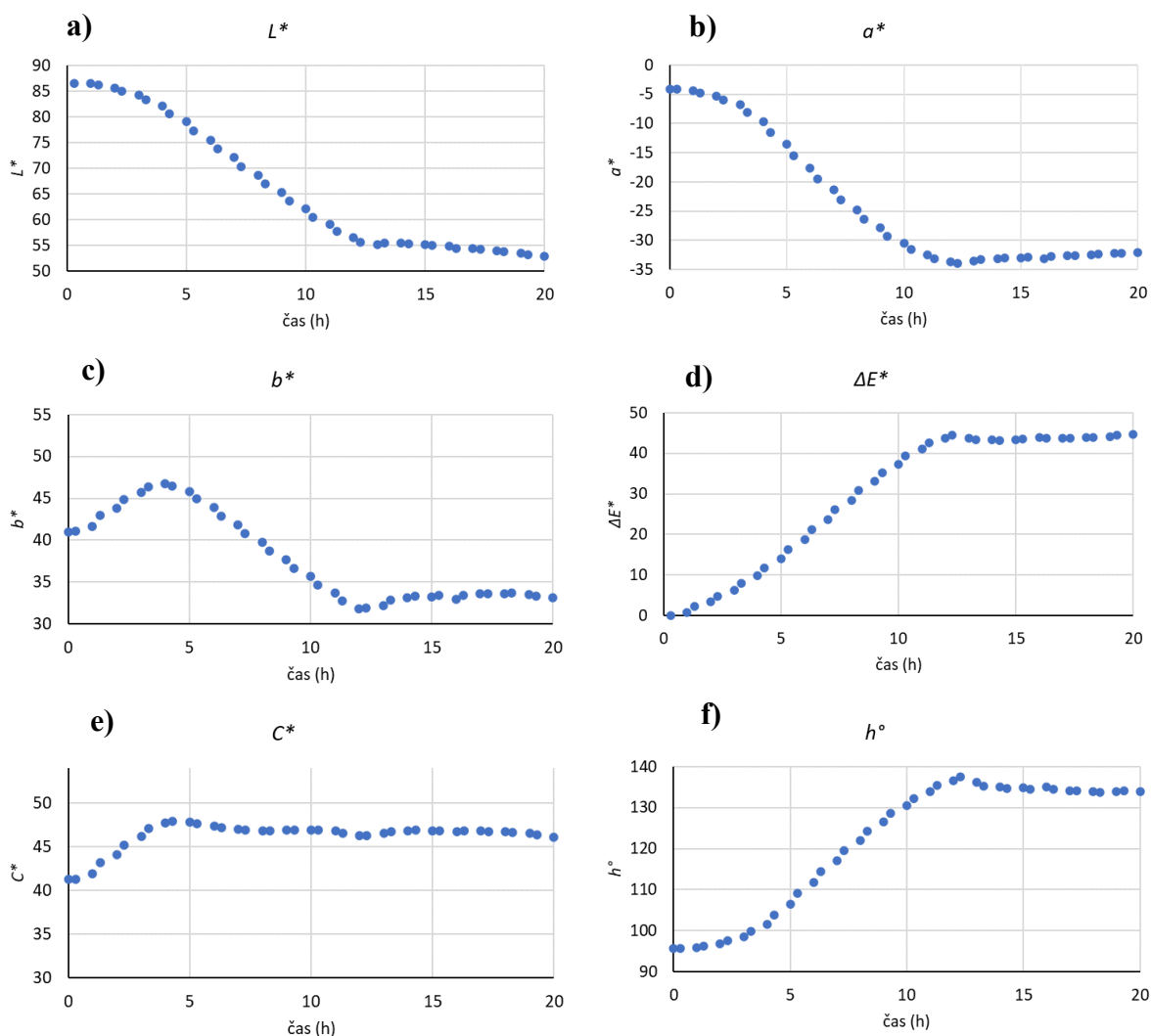
Jedná se o aritmetický průměr ± standardní odchylka (N=počet měření)

V **Tabulce 3** jsou uvedeny parametry barevnosti různých nálevů, kde hodnota  $L^*$  se pohybuje v rozmezí 59,9 až 87,9. Vzorek extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru s pH 8,0

vykazoval výrazně tmavší barvu ( $L^* = 76,05$ ). Po 24 hodinách došlo k výraznému poklesu hodnoty  $L^*$  u extraktu ve velmi tvrdé vodě (pokles o přibližně 25 jednotek) a u extraktu v fosfátovém pufru pH 8,0 a Britton-Robinsonově pufru pH 8,0 byl pokles o 10 jednotek. Extrakt lopuchu ve VTV s hodnotou 59,9 a extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8 s hodnotou 65,3 se výrazně liší a jsou blíže středu škály. Parametr  $a^*$  (přechod mezi zelenou a červenou barvou) byl kladný u čerstvě připraveného roztoku kořene lopuchu v deionizované vodě, zatímco ostatní čerstvé extrakty byly více zelené. Po 24 hodinách došlo ke snížení hodnoty  $a^*$  a vzorky byly více zelené. Největší změna se projevila u extraktu ve VTV (změna o 25 jednotek) a u extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0 (změna o 10 jednotek). Parametr  $b^*$  (přechod mezi žlutou a modrou barvou) byl u všech vzorků v kladném kvadrantu prostorového diagramu, kde ve vzorcích převládala žlutá barva. Z tabulky je patrné, že vzorky ve VTV a fosfátovém pufru pH 8,0 byly více žluté než ostatní vzorky. Po 24 hodinách byla hodnota parametru  $b^*$  u těchto vzorků nižší (méně žlutá). Podle parametru  $C^*$  se všechny vzorky, kromě extraktu v Britton-Robinsonově pufru, blíží hodnotě 100, což ukazuje na malé zastoupení šedé barvy a velkou sytost. Poloha na standardním barevném kole, vyjádřená hodnotou  $h^\circ$ , se většinou pohybuje mezi 22,9 a 49,2. Extrakt v Britton-Robinsonově pufru pH 8,0 se nachází ve zcela odlišné oblasti (89,7 až 98,1). Hodnota  $h^\circ$  byla nejvyšší pro čerstvě připravený B-R. pufr pH 8,0 s časem se snižovala o 10 stupňů.

Nejvíce se lišily extrakty lopuchu připravené ve VTV a fosfátovém pufru o pH 8,0 ve srovnání s ostatními vzorky jejich hodnoty výrazně klesali. Docházelo ke změně parametru  $a^*$  (vzorky více zelené) od žluté se úplně změnila na zelenou. Jelikož největší barevné změny se vyskytovaly u extraktu lopuchu ve VTV a fosfátovém pufru pH 8,0, lze přepokládat vliv pH u těchto vzorků. Proto byl dále v experimentech použit sledující vliv přídavku EDTA a iontů kovů. Extrakt v Britton-Robinsonově pufru o pH 8,0 a extrakt v destilované vodě byly rovněž dále zařazené do výzkumu pro porovnání.

V rámci experimentu měření barevnosti byla sledovaná souvislost mezi hodnotami parametrů barevnosti a časem, jak je vidět z **Obrázku 2**.

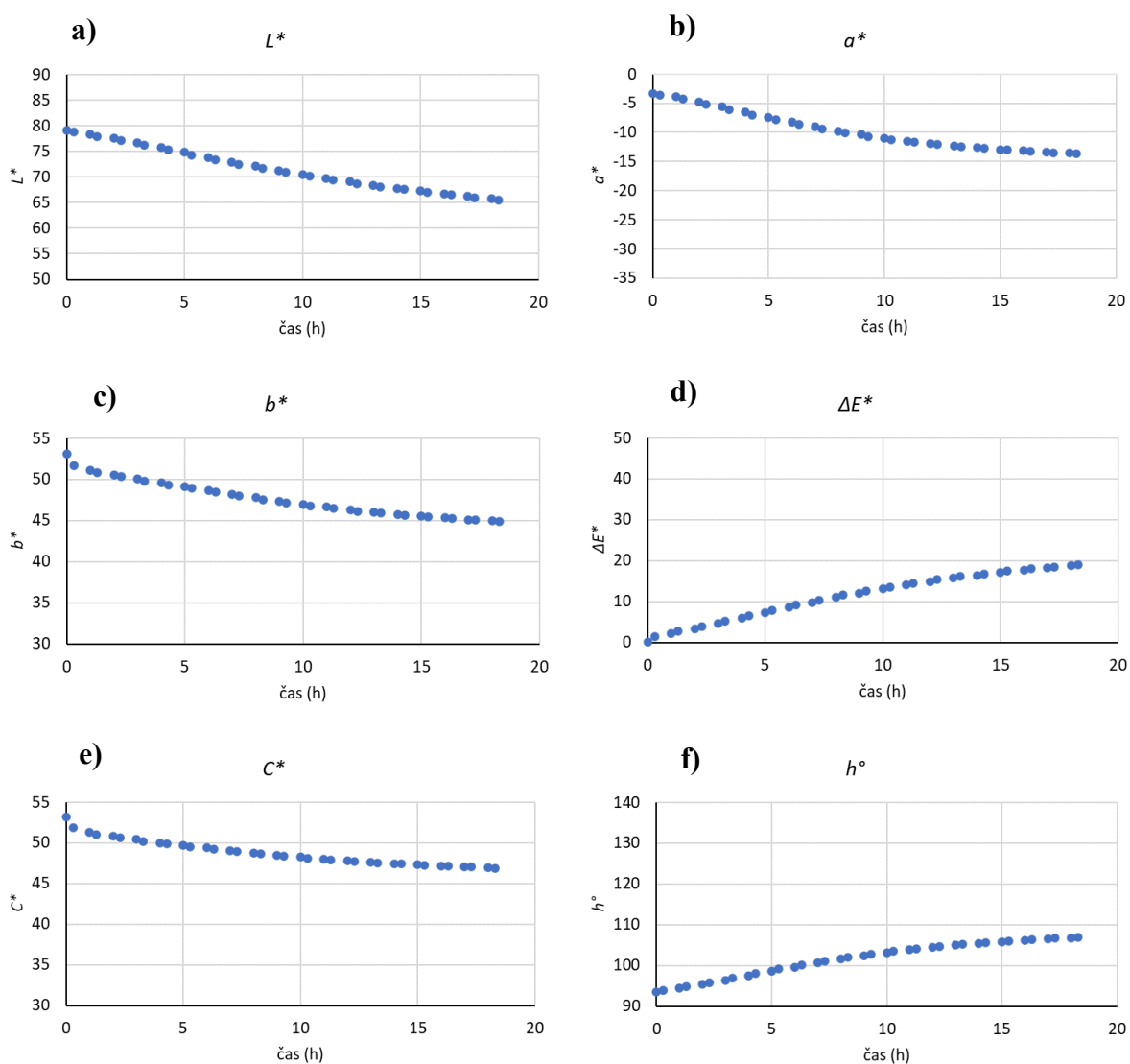


**Obrázek 2** – Parametry barevnosti extraktu ve velmi tvrdé vodě

Při porovnání parametru  $L^*$  v průběhu času (viz **Obrázek 2a**) je patrné, že hodnoty se během 12 hodin od přípravy nálevu snížily z počátečních 86,55 na 55,62. Barva vzorku se postupně přesouvala od světlé části směrem ke středu barevné koule (viz **Obrázek 1**), tedy blíže ke tmavším odstínům. Následně se ustálily hodnoty, kde změna parametru byla pouze o 3 jednotky. Parametr  $a^*$  (viz **Obrázek 2b**) vykazoval podobně strmý pokles během 12 hodin od přípravy, kdy se hodnoty snížily z -4,14 na -33,65, což ukazuje na větší přítomnost zelených odstínů. Následně se ustálila rovnováha a změna byla pouze o 1 jednotku. Parametr  $b^*$  (viz **Obrázek 2c**) během 4 hodin od přípravy vzrostl o 5 jednotek a přiblížil se k žlutým odstínům, následně ale rychle klesl z maxima 46,74 na 31,79, kdy se přiblížil k modrým odstínům.

Rovnováha se ustálila po 12 hodinách od přípravy extraktu. Rozdíl barev  $\Delta E$  (viz **Obrázek 2d**) vypočtený podle rovnice (č. 5) vzrostl z 0 na 44,4 během 12 hodin od přípravy extraktu, ale dále už nebyl viditelný pro lidské oko, neboť hodnota  $\Delta E = 1$  je minimální hodnotou, kterou lidské oko dokáže rozlišit [44]. Parametr  $C^*$  (viz **Obrázek 2e**) vzrostl o téměř 7 jednotek během 4 hodin a sytost barvy se zvýšila na maximum 47,89. Následně se tento parametr už téměř neměnil po celou dobu měření. Poloha na standardní barevné kouli  $h^\circ$  (viz **Obrázek 2f**) vzrostla během 12 hodin od přípravy extraktu z 95,78 na 137,54. Poté se ustálila a pohybovala se v oblasti hodnoty 134.

Dále byl proveden stejný experiment, kde byla sledována souvislost mezi hodnotami parametrů barevnosti a časem u extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 (**Obrázek 3**).



**Obrázek 3** – Parametry barevnosti pro extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

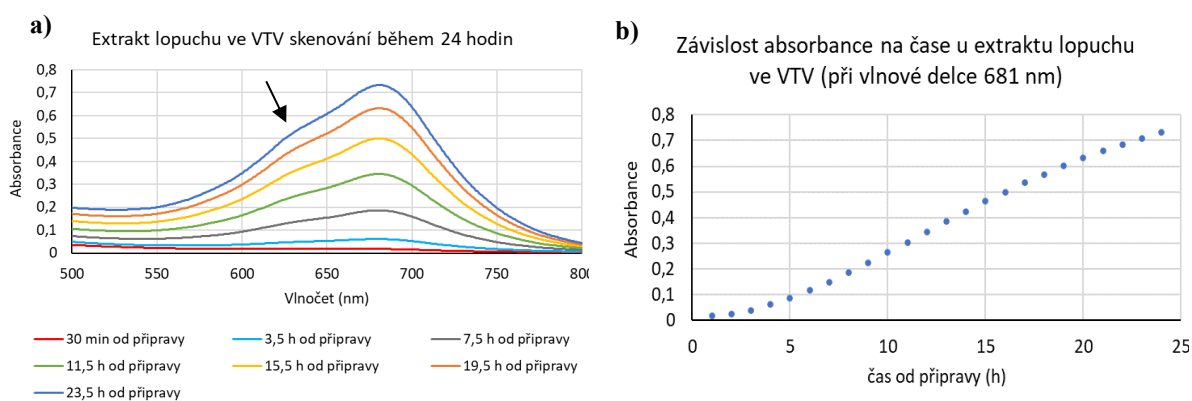
U parametru  $L^*$  (**Obrázek 3a**), je pozorována přímá úměra, kde hodnoty klesají od 79,14 do 65,54 během celého času skenování a barva ztrácí světlost a přibližuje se středu na barevné kouli. Podobnou úměru lze pozorovat u parametrů  $a^*$  a  $b^*$ . Parametr  $a^*$  (**Obrázek 3b**) zaznamenal celkový pokles hodnot z -3,29 na -13,65 a barva se postupně přesunula do zelenější oblasti. U parametru  $b^*$  (**Obrázek 3c**) poklesl byl z 53,05 na 44,87 a vzorek se přibližoval modré oblasti. Rozdíl barev  $\Delta E$  (na **Obrázku 3d**) rostl z 0 na 18,99 během celého měření. Parametr  $C^*$  (na **Obrázku 3e**) klesal z 53,15 na 46,9, což znamená, že vzorek ztrácel čistotu barvy. Poloha na standardním barevném kouli  $h^\circ$  (na **Obrázku 3f**) se zvýšila z 93,55 na 106,92.

I když vzorky ve VTV a fosfátového pufru pH 8,0 byly po 24 h zelené ze získaných výsledků je patrné, že změna barevnosti podléhá kinetické závislosti. Tato závislost je pro oba vzorky různá u fosfátového pufru je závislost parametru barevnosti na čase skoro lineární, u vzorku dochází ke kontinuální změně všech sledovaných parametrů po dobu 24 hodin. Na druhé straně vzorek ve VTV vykazoval odlišné závislosti parametru na čase.

Závislost parametrů barevnosti na čase v B-R pufru pH 8,0 se měnila minimálně (viz **Příloha 1**).

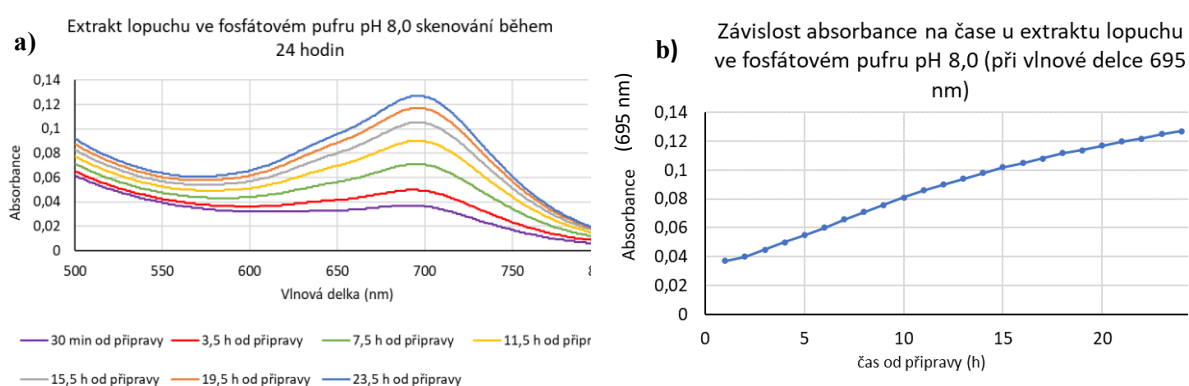
### 3.2.2 Měření v UV-VIS oblasti

Bylo provedeno měření spekter extraktu lopuchu v destilované vodě, velmi tvrdé vodě, fosfátovém pufru s pH 7,0, 7,5 a 8,0, a v Britton-Robinsonově pufru o pH 8,0 v oblasti viditelného spektra 450–800 nm po dobu 24 hodin. Z každého druhu extraktu byla vybrána pouze několik měření, aby byly grafy přehledné a nepřekrývaly se. Pro každý typ extraktu byla zaznamenána závislost absorbance na čase.



**Obrázek 4** – a) Skenování extraktu lopuchu ve VTV během 24 h, b) Závislost absorbance na čase u extraktu lopuchu ve VTV

Výsledky měření extraktu lopuchu připraveného ve velmi tvrdé vodě ukázaly výrazný nárůst absorbance během 24hodinového skenování (**Obrázek 4a**) v oblasti 680-684 nm. Na začátku měření byla absorbance této oblasti 0,018 a dosáhla maximální hodnoty 0,73. Tento nárůst byl oproti extraktům ve fosfátovém pufru pH 7,0, 7,5, 8,0 pozorován v jiné oblasti spektra a posunul se na oblast 680-684 nm. V oblasti 620-639 nm byl pozorován nárůst absorpce od 7,5 hodiny po přípravě extraktu, což bylo pozorováno také u extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0, avšak v menší intenzitě. Souvislost se změnou barevnost je zde zřejmá, dochází k nárůstu absorbancí (**Obrázek 4b**) s maximem při vlnové délce 681 nm (zjištěno pomocí UVProbe verze 2.7).



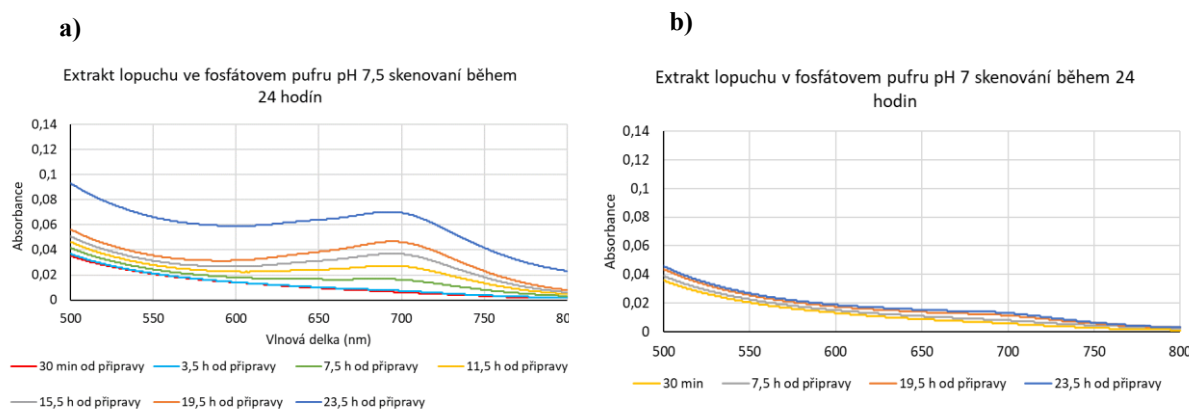
**Obrázek 5 – a)** Skenování extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 během 24 h, **b)** Závislost absorbance na čase u extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

Na **Obrázku 5b** je zobrazena časová závislost absorbance extraktu lopuchu, který byl připraven v fosfátovém pufru pH 8,0 a skenován ve viditelné oblasti během 24 hodin (**Obrázek 5a**). V této oblasti byl pozorován významný nárůst absorbance, přičemž maximální hodnota absorbance byla 0,127. Tento nárůst byl pozorován v oblasti vlnových délek 694-705 nm, což bylo důkazem tvorby barevného komplexu, který způsobuje přechod barvy ze žluté na zelenou. Celkový nárůst absorbance se pohyboval v rozmezí 0,037 až 0,127. Dále byla pozorována přímá úměra mezi časem a absorbancí. Tento fakt může ukazovat na to, že tvorba případného komplexu vykazuje parametry kinetické reakce. V tomto případě maximum absorbance při vlnové délce bylo 695 nm, které bylo změřené pomocí softwaru UVProbe verze 2.7 (Shimadzu). Táto vlnová délka v maximu je odlišná od té, která byla změřená u extraktu z kořene lopuchu ve VTV. U extraktu ve VTV má křivka spíše sigmoidní tvar, u extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0 je spíše konkávní. Určení kinetických parametrů vzniku zeleného



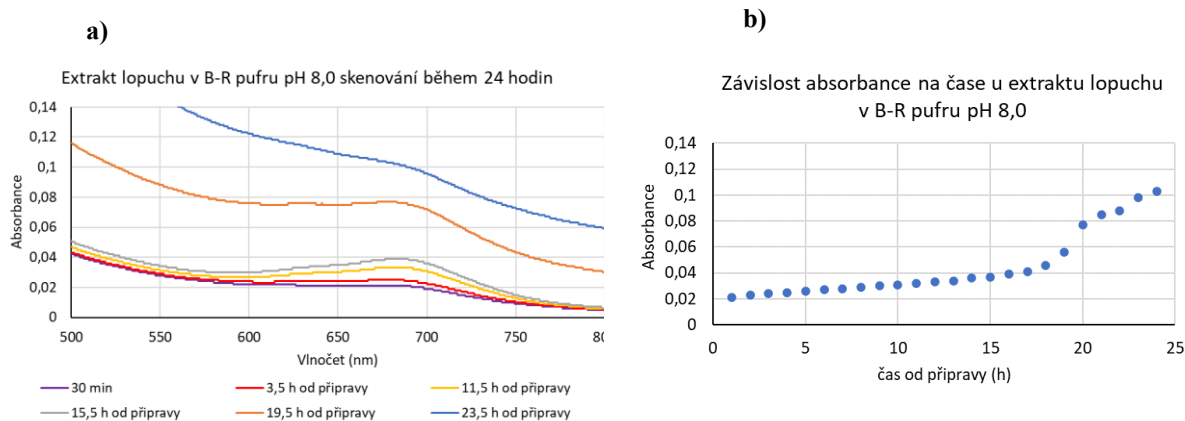
zabarvení (vznik komplexu) si vyžaduje detailnější studii, pro kterou je nutné stabilizovat podmínky vzniku takto zbarveného extraktu.

U skenování extraktu lopuchu v destilované vodě během 24 hodin nebyl zaznamenán významný nárůst absorpance během celého měření (**Příloha 2**).



**Obrázek 6 – a)** Skenování extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 7,5 během 24 h, **b)** Závislost absorpance na čase u extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 7,0

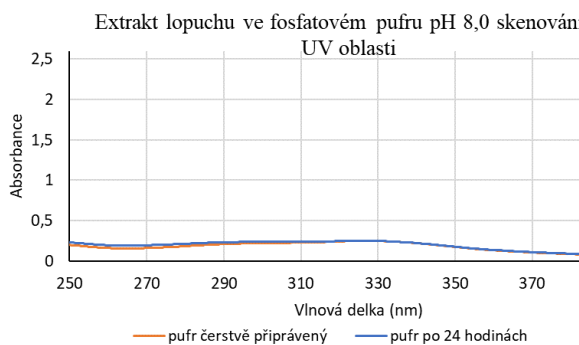
Extrakt lopuchu, připravený ve fosfátovém pufru pH 7,5 a skenovaný v oblasti viditelného spektra (**Obrázek 6a**), vykazuje výrazný nárůst absorpance během 24 hodin, přičemž maximum absorpance bylo zaznamenáno na úrovni 0,07 s celkovým nárůstem absorpance od 0,007 na 0,07. Maximum absorpance při vlnové délce bylo 692 nm, což se liší od hodnoty extraktu ve VTV a ve fosfátovém pufru pH 8,0. Nicméně, od 19,5 hodiny od přípravy extraktu až do konce měření, byl pozorován významný posun absorpance v oblasti 500 nm, který byl způsoben zakalením extraktu a změnou jeho čirosti a barvy. Časová závislost absorpance vykazuje lineární stoupaní hodnot, ale srovnání s grafem extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0 ukazuje, že nárůst absorpance u extraktu ve fosfátovém pufru pH 7,5 byl menší, což odpovídá měření barevnosti. U extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 7,0 (**Obrázek 6b**) nedošlo ke zvýšení absorpance.



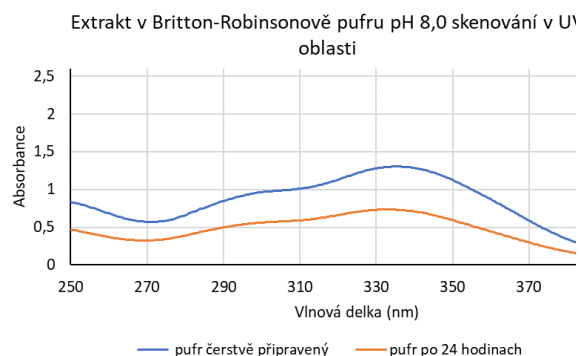
**Obrázek 7 – a)** Skenování extraktu lopuchu v Britton-Robinsonově pufru pH 8,0 během 24 hodin, **b)** Závislost absorbance na čase u extraktu lopuchu v Britton-Robinsonově pufru pH 8,0

Při srovnání absorbance extraktu lopuchu v Britton-Robinsonově pufru pH 8,0 je patrné, že hodnoty se v průběhu 24 hodin mění (**Obrázek 7a**). Maximální hodnota dosáhla 0,102 a celkový nárůst byl z 0,024 na 0,102. Tyto hodnoty byly získány při vlnových délkách 682-694 nm, což se může lišit od předchozích měření vzhledem k rozdílnému složení použitého pufru. Nárůst absorbance může svědčit o změně barvy, nicméně v oblasti 500 nm dochází od 15,5 hodiny od přípravy ke značnému zvýšení absorbance a pozadí reaguje až na hodnotu maxima 0,186. Toto zvýšení může být způsobeno zakalením vzorku, kdy se zvyšuje jeho opalescence, což mohlo zabránit změně barvy vzorku na zelenou. Časový průběh absorbance potvrzuje tento jev (**Obrázek 7b**).

Pro porovnání vlivu pH na extrakt lopuchu byly použity dva různé pufrы: fosfátový pufr s pH 8,0 a Britton-Robinsonův pufr pH 8,0. Tyto pufrы vykazovaly největší rozdíly v oblasti viditelného spektra, takže byly prozkoumány také v oblasti UV spektra v rozmezí 250–400 nm, zda nebudou zaznamenány změny v absorbanci, které by mohly mít souvislost se změnou koncentrace některých organických látek vstupujících do reakce s ionty kovů. Pro měření byly použity roztoky s ředěním 20x odpovídajícím pufrém. U extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 7 a 7,5 nebyl zaznamenán žádný významný rozdíl mezi čerstvě připraveným vzorkem a vzorkem po 24 hodinách, a to ani během skenování. Grafy těchto extraktů byly podobné extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0, proto nebyly zahrnuty do výsledků.



**Obrázek 8** – Skenování extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 v UV oblasti



**Obrázek 9** – Skenování extraktu lopuchu v Britton-Robinsonově pufru pH 8,0 v UV oblasti

Absorbance extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru (**Obrázek 8**) se téměř neměnila v rozmezí 320-330 nm mezi čerstvě připraveným vzorkem a vzorkem po 24 hodinách a držela se na hodnotě 0,25. V kontrastu s tím, u extraktu v Britton-Robinsonově pufru (**Obrázek 9**) vykazoval čerstvě připravený vzorek vyšší intenzitu absorbance, s maximem ( $A = 1,3$ ) při 337 nm. Během 24 hodin se tato hodnota snížila na 0,723 při 337 nm. Kromě toho byla pozorována v oblasti 300 nm vlna s  $A = 0,96$  která během skladování klesla na 0,561. Tento jev však mohl být způsoben opalescencí vzorku po 15 hodinách od přípravy, což bylo potvrzeno v oblasti viditelného spektra.

Je třeba poznamenat, že všechna měření byla prováděna na roztocích s ředěním 20x odpovídajícím použitému pufróvému systému, aby nedošlo ke změně pH ředěním. Výsledky měření ukázaly, že extrakt lopuchu, který byl připraven ve VTV a ve fosfátovém pufru s pH 8,0, vykazuje největší nárůsty absorbance v oblasti viditelného spektra během 24 hodin. Tento výsledek je v souladu s předchozím měřením barevnosti extraktů lopuchu. S ohledem na výše uvedené skutečnosti byl pro další měření použit pouze extrakt lopuchu připravený ve fosfátovém pufru, a to z důvodu jeho lepší stability a schopnosti kontrolovat stálé pH po celou dobu měření.

### 3.2.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

V této práci byly provedeny experimenty k posouzení antioxidační aktivity extraktů lopuchu, připravených v různých prostředích a po různých dobách stání. Tyto extrakty byly testovány pomocí DPPH testu, jeho výsledky poskytují užitečné informace o kapacitě antioxidantů k poskytování vodíkových atomů a redukční kapacitě reakce, což umožňuje zhodnotit jejich účinnost při inhibici DPPH radikálů. Tento test také umožňuje posoudit

mechanismy interakce mezi volnými radikály a antioxidanty. Jde o jednoduchý test, který vyžaduje pouze DPPH radikálové činidlo a antioxidant a lze provádět za mírných experimentálních podmínek, což je výhodné v porovnání s tradičními testy na antioxidanty, které často vyžadují dodatečné úpravy vzorku a činidel, vysoké teploty nebo přísun kyslíku [16].

V této studii jsme se zaměřili na stanovení antioxidační aktivity extraktu lopuchu připraveného v různých prostředích.

**Tabulka 4** – % inhibice pro různé vzorky

Vzorek	% inhibice	
	Průměr	Směrodatná odchylka
Dezo. čerstvý	15,7	2,7
Dezo. 24 h	18,6	3,7
VTV čerstvý	39,1	3,3
VTV 24 h	54,3	3,3
F. pH 7,0 čerstvý	16,1	3,4
F. pH 7,0 24 h	20,6	3,0
F. pH 7,5 čerstvý	7,1	1,1
F. pH 7,5 24 h	15,4	2,3
F. pH 8,0 čerstvý	9,2	1,4
F. pH 8,0 24 h	8,6	1,8

Dezo č. – extrakt lopuchu v demineralizované vodě čerstvě připravený, VTV č.– extrakt lopuchu ve velmi tvrdé vodě čerstvě připravený, F. pH 8,0 č. – extrakt lopuchu v fosfátovém pufru pH 8,0 čerstvě připravený, F. pH 7,5 č. – extrakt lopuchu v fosfátovém pufru pH 7,5 čerstvě připravený, F. pH 7,0 č. – extrakt lopuchu v fosfátovém pufru pH 7,0 čerstvě připravený.

Výsledky (v **Tabulce 4**) měření ukazují, že extrakt lopuchu čerstvě připravený ve VTV vykazoval vyšší antioxidační aktivitu v procentech inhibice (39,1 %) než extrakt připravený v destilované vodě (15,7 %). U extraktu ve fosfátovém pufru s klesajícím pH se aktivita zvyšovala po 24 hodinách skladování. Došlo také k nárůstu antioxidační aktivity ve VTV extraktu (54,3 % inhibic.) Extrakt ve fosfátovém pufru pH 8,0 vykazoval podobné antioxidační vlastnosti jako na začátku, na druhé straně pufru pH 7,0 a 7,5 vykazovaly vyšší antioxidační aktivitu po 24 hodinách. Je zajímavé, že i když ke změně dochází u extraktu ve VTV a fosfátovém pufru pH 8,0 antioxidační aktivita měřena s použitím DPPH radikálů byla rozdílná. Pokud se zaměříme na směrodatné odchylky, lze pozorovat, že většina vzorků vykazuje podobnou hodnotu, s výjimkou extraktu připraveného v destilované vodě po 24 hodinách, který má výrazně vyšší směrodatnou odchylku než ostatní vzorky. To může být způsobeno vlivem stárnutí extraktu v destilované vodě.

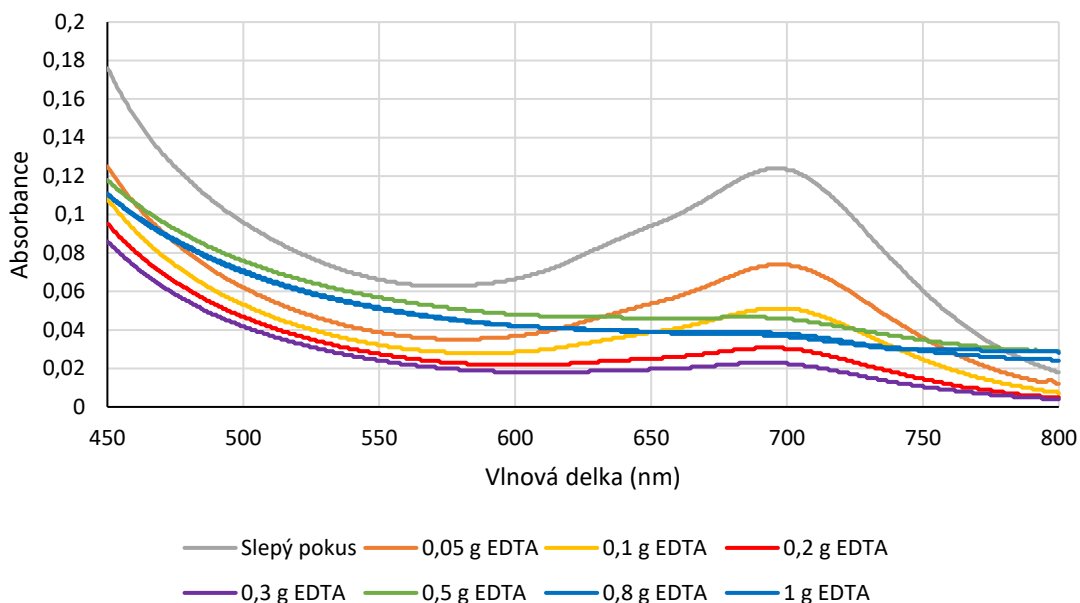
### 3.3 Vliv přídavku EDTA na barevnost extraktu lopuchu

Změnu barevnosti a spektrálních vlastností extraktu lopuchu ve VTV a ve fosfátovém pufru pH 8,0 mohou způsobovat tvorba komplexu fenolických látek s nějakými minerálními látkami.

Ve článku Abdelatty Mohameda Radalla, který se zaměřuje na studium trojkomplexů obsahujících některé ionty přechodných kovů, kyselinu gallovou a alifatické dikarboxylové kyseliny v roztocích vody, autor uvádí, že vlivem různých faktorů (jako je pH a koncentrace jednotlivých složek) může být ovlivněna tvorba výsledných komplexů [84]. Také autoři Franjo Frešer a kol. se zabývali závislostí konstanty tvorby koordinačního komplexu Fe(II)-gallová kyselina na pH. Výsledkem studie bylo zjištění, že tvorba tohoto koordinačního komplexu závisí na pH a že v kyselém prostředí je tvorba komplexu nižší než v neutrálním nebo alkalickém prostředí [85].

Za předpokladu, že změny v barvě extraktu z lopuchu jsou způsobeny přítomností komplexu, lze očekávat, že přidání chelatačního činidla může tento komplex rozložit a vést k ztrátě zelené barvy. Tento předpoklad platí v případě, že stabilita komplexu přítomného v extraktu kořene lopuchu je menší než stabilita komplexu minerálních látek s EDTA. V prvním experimentu byla různá množství EDTA přidána do čerstvě připravených extraktů z kořene lopuchu ve fosfátovém pufru s pH 8,0.

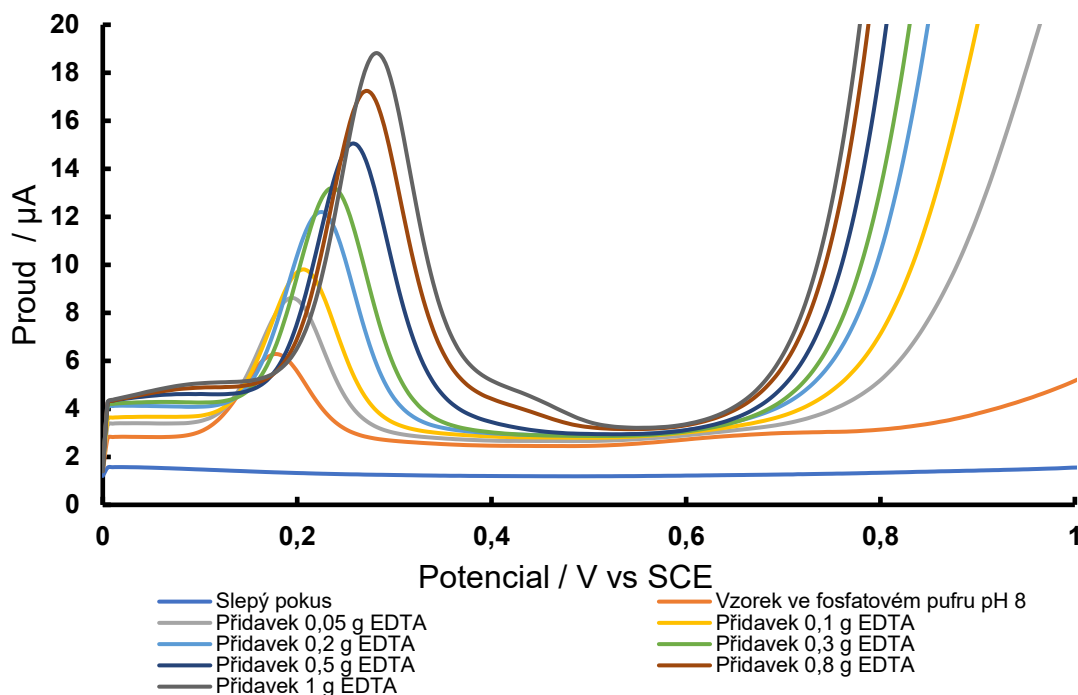
### Vliv přidavku EDTA v g.



**Obrázek 10** – Vliv přidavku různého množství EDTA (g/20 ml) na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

Na přiloženém **Obrázku 10** lze pozorovat, že hodnota intenzity slepého pokusu je nejvyšší ze všech vzorků. S rostoucím množstvím přidaného EDTA (g/20 ml) klesá absorbance, jak je patrné u vzorku s hodnotou 0,124 v oblasti 695-700 nm a u vzorku s přidavkem 0,05 g EDTA s hodnotou 0,074 v téže oblasti. Postupné přidávání EDTA dále způsobuje pokles absorbance až na hodnotu 0,023 u vzorku s přidavkem 0,3 g EDTA v téže oblasti. U dalších přidávků se absorbance pohybuje v rozmezí 0,037-0,046. Měření pH takto připravené směsi bohužel ukázalo, že vysoké přidavky EDTA zásadním způsobem mění kyselost vzorku roztoku. Nelze tedy prokázat, že ke změně absorbance (barevnosti) docházelo vlivem tvorby komplexu EDTA s ionty kovů nebo byla důsledkem změny pH. Vliv pH na barevnost extraktů byla prokázána v předešlých experimentech. Tyto výsledky nedokazují, že disodná sůl (Chelaton III) tvoří komplexy s nějakou minerální látkou, případně kovem v extraktu lopuchu [86]. Z důvodu změny pH přidavkem EDTA byly v dalších experimentech použity nižší koncentrace roztoku EDTA.

Dále bylo ověřeno, zda se projeví na voltametrickém měření s použitím metody SWV stejná závislost vlivu přidavku různého množství EDTA na elektrochemické vlastnosti extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0.

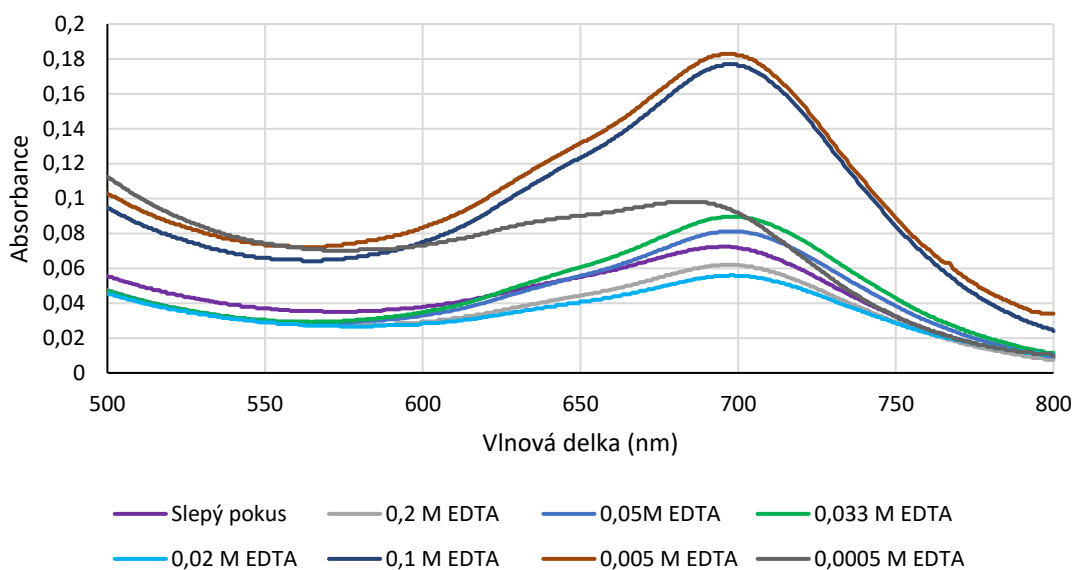


**Obrázek 11** – Voltametrické měření vlivu přidavku různého množství EDTA (g/20 ml) na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

Kontrolní vzorek extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru (pH 8,0) byl charakterizován oxidací při potenciálu 0,18 V (**Obrázek 11**). Přidavkem EDTA došlo k posunu oxidační vlny směrem k vyšším hodnotám potenciálu s jednoznačným nárůstem proudového výtěžku. Je vidět, že čím větší navážka EDTA se používala tím větší byl proud a posun potenciálů. Tak potenciál roste z 0,18 do 0,29 V a proud z 6,01 do 18,67 µA. K posunu potenciálu dochází v důsledku změny pH v roztocích.

Bylo nutné vyzkoušet měření s menšími koncentracemi EDTA tak, aby se eliminoval vliv různé hodnoty pH.

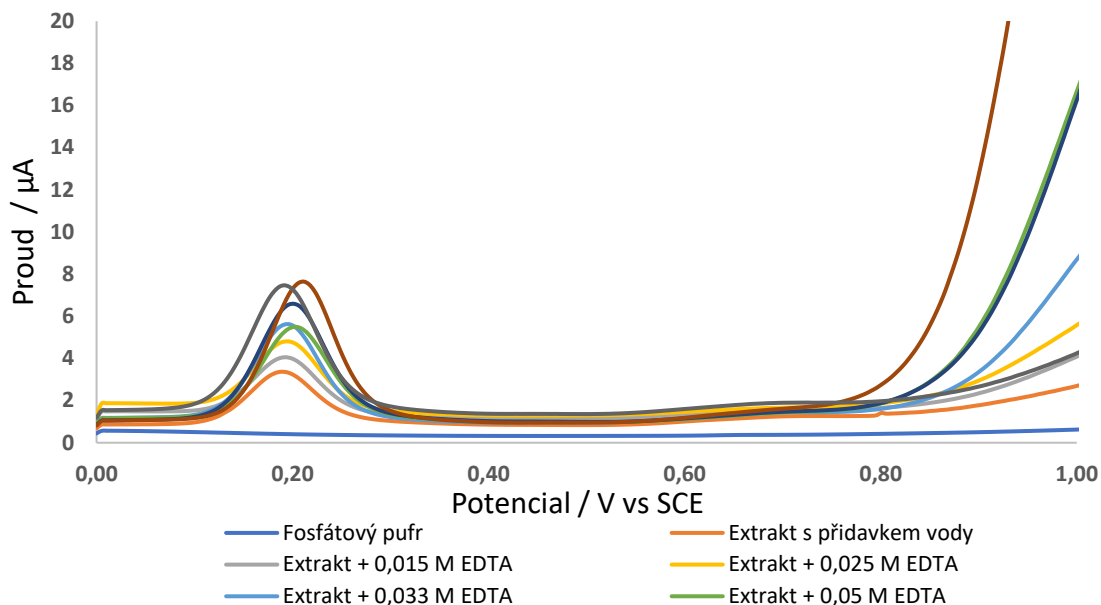
## Vliv přidavku EDTA



**Obrázek 12** – Vliv přidavku roztoků EDTA o různé koncentrací na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

Nejprve byly připraveny různé koncentrace EDTA (0,2 M, 0,1 M, 0,05 M, 0,033 M a 0,02 M). Do čerstvě připravených extraktů z kořene lopuchu bylo přidáno vždy 1 ml od každé koncentrace EDTA. Po přidavku roztoků EDTA (**Obrázek 12**) došlo ke snížení absorbance při vlnové délce 699 nm, což indikuje možnost, že původní neznámý komplex byl rozrušen a vytvořen nový komplex s EDTA. Bohužel nebyla prokázána přímá závislost na koncentraci EDTA. Při přidání roztoku 0,0005 M EDTA na litr došlo k poklesu absorbance na hodnotu 0,098, zatímco při vyšší koncentraci EDTA (0,005 M) byla tato absorbance vyšší ( $A = 0,183$ ). Původně se očekávala jasná souvislost mezi koncentrací EDTA a změnou absorbance (čím vyšší koncentrace, tím větší změna), tato zásadní nesrovnalost naznačuje, že případná tvorba komplexu v extraktu z kořene lopuchu nemusí souviset pouze s koncentrací přítomných minerálních a organických látek. Je možné, že k tvorbě barev komplexu dochází v souvislosti s dalšími neznámými faktory, jako je například koncentrace kyslíku, oxidu uhličitého atd.

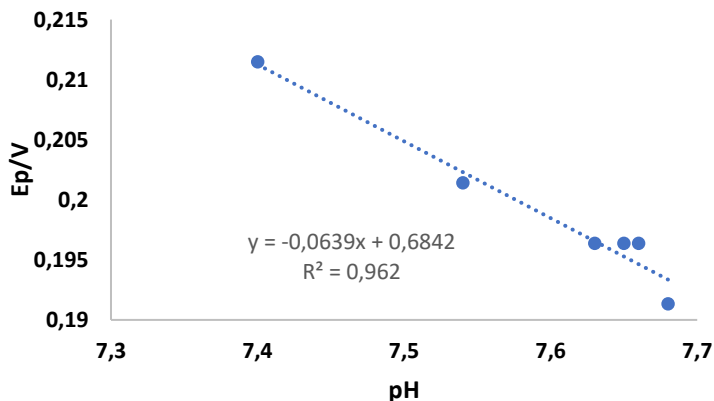




**Obrázek 13** – Voltametrické měření vlivu přidavku roztoků EDTA o různé koncentrací na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

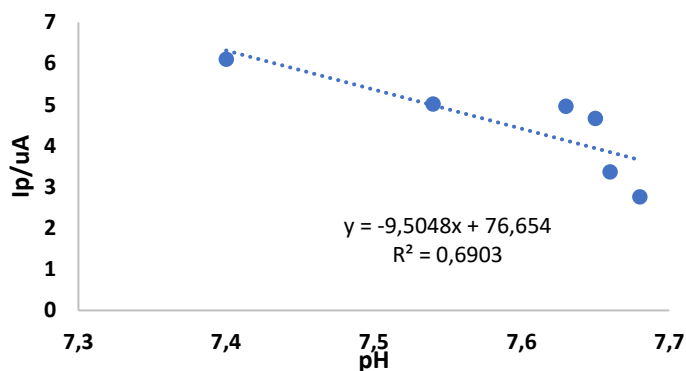
Byla provedena další série voltametrických měření (viz **Obrázek 13**) s přidavkem nižších koncentrací EDTA než v předchozích experimentech. Namísto sypkého EDTA byl použit roztok. Všechny extrakty s přidavkem roztoku EDTA vykazovaly vyšší proudové výtěžky při potenciálu 0,2 V ve srovnání s extraktem v destilované vodě. S klesající koncentrací EDTA klesala i hodnota proudu. Nejvyšší proud byl naměřen u extraktu s přidavkem 0,2 M EDTA (7,64  $\mu\text{A}$ ), nejnižší proud byl naměřen u extraktu s přidavkem vody (3,31  $\mu\text{A}$ ). Při potenciálu 0,20 V nebyl téměř žádný výrazný posun zaznamenán. Hodnoty pH roztoku se pohyb od 7,4 do 7,68.

Před samotným měřením taky bylo změřeno pH všech vzorků a provedena závislost potenciálů na pH vzorků.



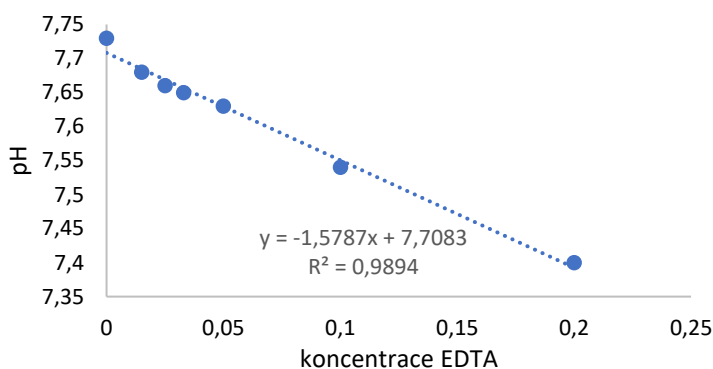
**Obrázek 14** – Závislost potenciálu na pH vzorků

Můžeme říct, že vrcholový potenciál u nejkonzentrovanejšího vzorku klesá se zvyšováním pH (viz **Obrázek 14**). I když šlo o změny pH v rozsahu tří desetín, byl zaznamenán trend, kdy s rostoucím pH docházelo k poklesu potenciálu. Vrcholový potenciál ( $E_p$ ) vůči pH vykazuje posun k menší hodnotě.



**Obrázek 15** – Závislost proudu na pH roztoků

U stejného měření byla pozorovaná závislost proudu na pH roztoků (na **Obrázku 15**), ale vzhledem k koeficientu determinace  $R^2 = 0,69$  nelze tuto změnu brát jako významnou.



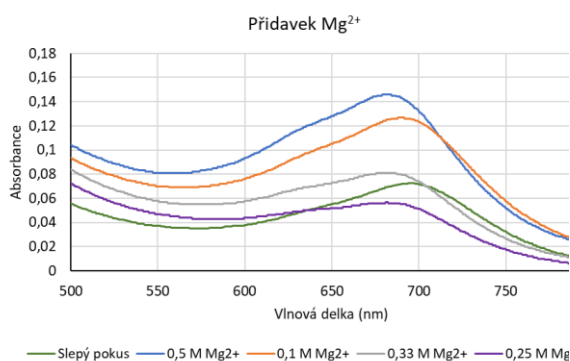
**Obrázek 16** – Závislost koncentrace přidaného EDTA na pH roztoků

Na **Obrázku 16** je celková závislost koncentrace přidaného EDTA na pH roztoků a výsledkem je, že čím větší koncentraci EDTA měl extrakt tím víc klesalo pH od původních 8,0 do 7,4 u extraktu s 0,2 M EDTA a čím menší byl přídavek tím stálější pH (8,0) měl konečný extrakt lopuchu. I když se může zdát, že je tento rozdíl zanedbatelný, předchozí experimenty prokázaly, že pouhá změna pH extraktu z 8,0 na 7,5 měla za následek výraznou změnu barevnosti.

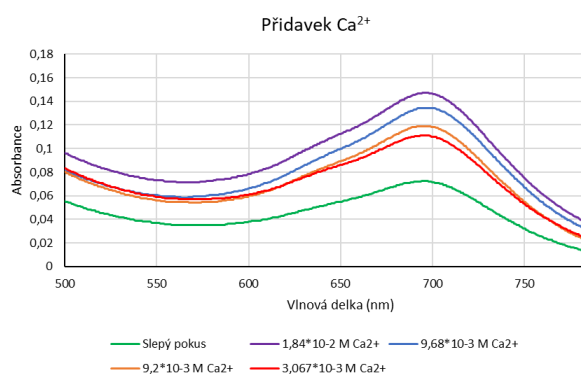
Voltametrickým měřením extraktů s nižšími koncentrací nebyly získané žádné vysvětlující výsledky.

### 3.4 Vliv anorganických iontů na absorbanci a elektrochemické vlastnosti nálevu lopuchu v bazickém prostředí

Hypotéza, která předpokládá tvorbu komplexu organická látka-iont v extraktu z kořene lopuchu v bazickém prostředí, byla dále experimentálně ověřena. Byl testován vliv přidavku různých iontů na změnu v barevnosti (absorbance) a související elektrochemické vlastnosti vzorků.



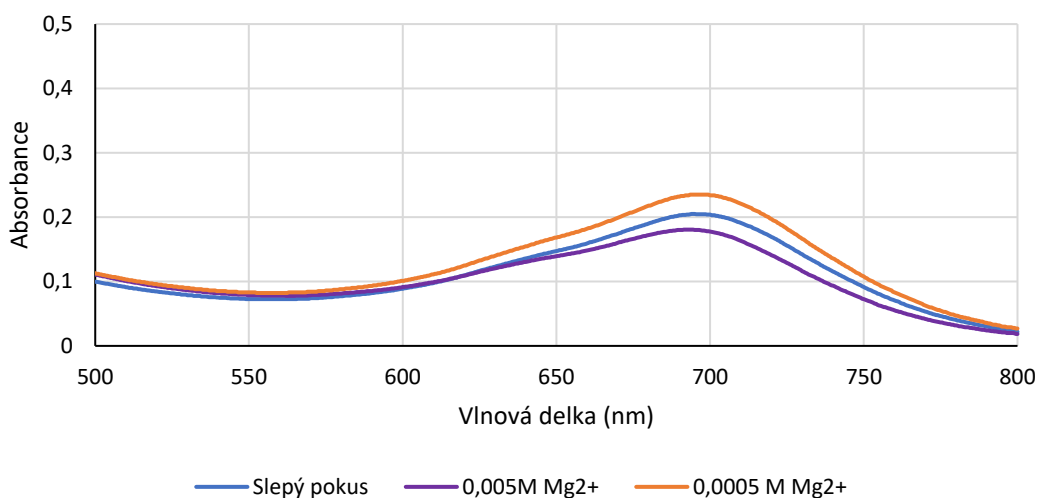
**Obrázek 17** – Vliv přidavku roztoku  $MgSO_4$  o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0



**Obrázek 18** – Vliv přidavku roztoku  $CaSO_4$  o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

Nejprve byly použity roztoky  $MgSO_4$  a  $CaSO_4$  k testování jejich vlivu na extrakt. Experimentálně bylo zjištěno, že kationty  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$  mají vliv na extrakt. Jak je vidět na **Obrázků 17 a 18**, všechny přidavky různých koncentrací kationtů způsobily zvýšení absorbance ve srovnání se slepým pokusem. I v tomto případě však nebyly potvrzeny souvislosti s rostoucí koncentrací, např. 0,1 a 0,5 M vs. 0,25 s 0,33 M  $MgCl_2$ . V dalších experimentech byly použity další ionty, které zahrnoval stejné kationty v podobě chloridů ( $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sb^{3+}$ ), aby bylo zjištěno, zda mají nějaký vliv. Z výsledků experimentu bylo patrné, že pouze  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  a  $MnCl_2$  mají skutečný vliv na barvu extraktu, takže byly vybrány pro další zkoumání. Při stejných koncentracích jako u síranů bylo zjištěno, že po přidavku těchto kationtů vzniká sediment. Proto byly koncentrace upraveny na 0,005 M a 0,0005 M, při kterých byly roztoky čiré a průhledné. Pro porovnání byla zvolena viditelná oblast spektra v rozmezí 500 až 800 nm.

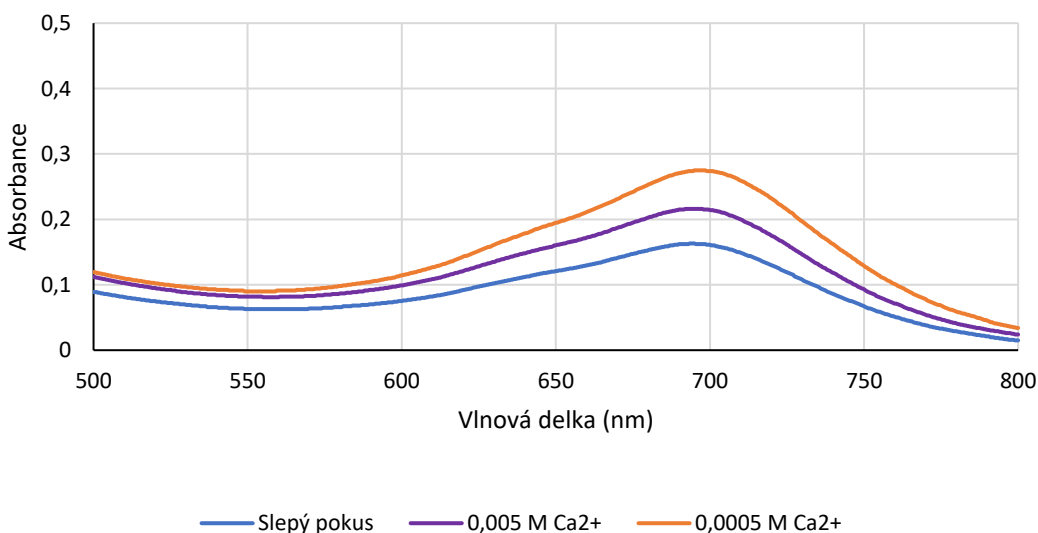
### Přidavek $Mg^{2+}$ Vis oblast



**Obrázek 19** – Vliv přidavku roztoku  $MgCl_2$  o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

Na **Obrázku 19** je vidět, že absorbance slepého pokuse se nachází mezi absorbancemi pro koncentrace 0,005 M a 0,0005 M v oblasti 695-698 nm. To znamená, že  $Mg^{2+}$  může mít vliv na tvorbu barevného komplexu v extraktu. I v tomto případě přidavek roztoku o nižší koncentraci způsobil zvýšení absorbance na 0,234.

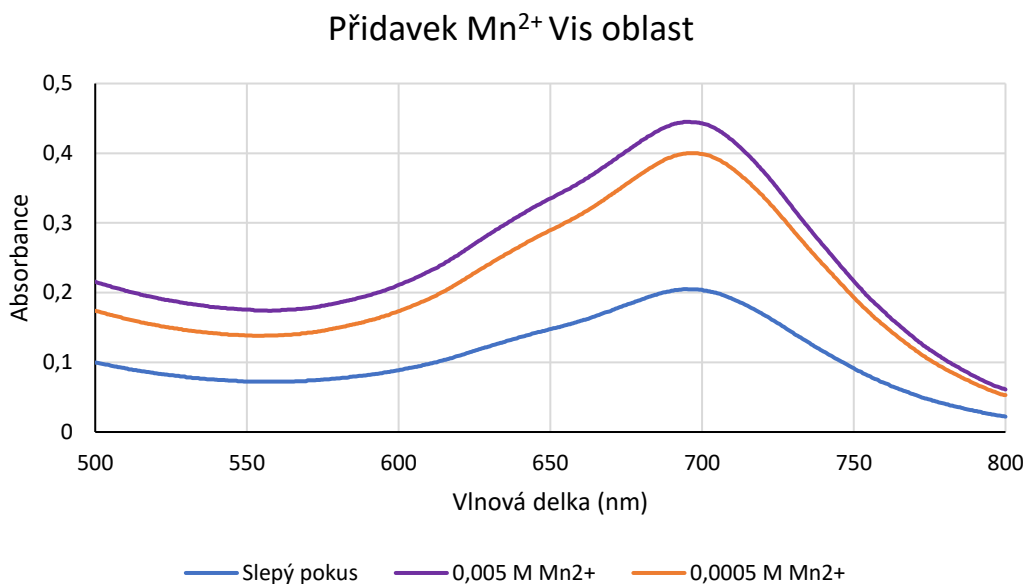
### Přidavek $Ca^{2+}$ Vis oblast



**Obrázek 20** – Vliv přidavku roztoku  $CaCl_2$  o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

Z **Obrázku 20** je vidět, že přidavek o koncentraci 0,005 M měl za výsledek zvýšení absorbance z 0,162 na 0,215 v oblasti 695-698. A přidavek o koncentraci 0,0005 M zvýšil

absorbance na hodnotu 0,274 ve stejné oblasti. I v tomto případě použitím roztoku o nižší koncentrací došlo k vyššímu nárůstu absorbance.



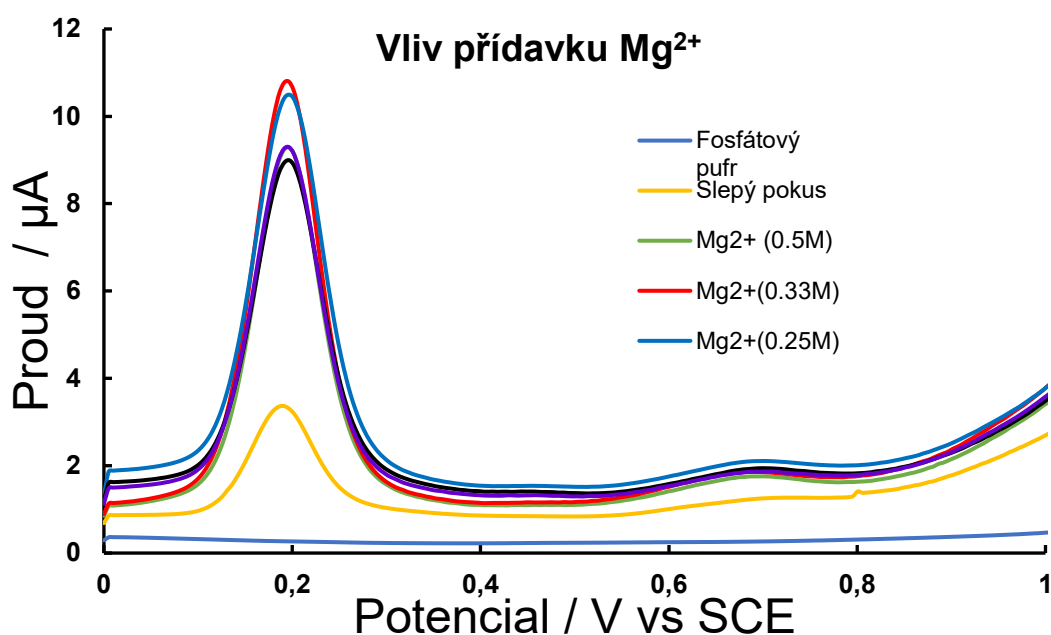
**Obrázek 21** – Vliv přidavku roztoku MnCl<sub>2</sub> o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

Na přiloženém **Obrázku 21** je patrné, že obě testované koncentrace (0,005 M a 0,0005 M) projevily vyšší absorbanci než slepý pokus. Absorbance se zvyšuje z hodnoty 0,205 u slepého pokusu na hodnotu 0,4 u 0,005 M, přičemž maximum se nachází na hodnotě 0,44 u nejnižší koncentrace 0,0005 M v oblasti vlnových délek 695-698 nm.

Z toho plyne, že nejvýraznější nárůst absorbance byl pozorován u kationtu Mn<sup>2+</sup>, u kterého bylo dosaženo maxima o hodnotě 0,44. Následuje kationt Ca<sup>2+</sup> s maximem na hodnotě 0,275. Nejmenší nárůst absorbance byl pozorován u kationtu Mg<sup>2+</sup> s maximem na hodnotě 0,235 v oblasti vlnových délek 695-698 nm. Tato pozorování potvrzují domněnku, že změnu barevnosti extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru (pH = 8,0) mohou způsobit komplexy s některými dvojmocnými ionty.

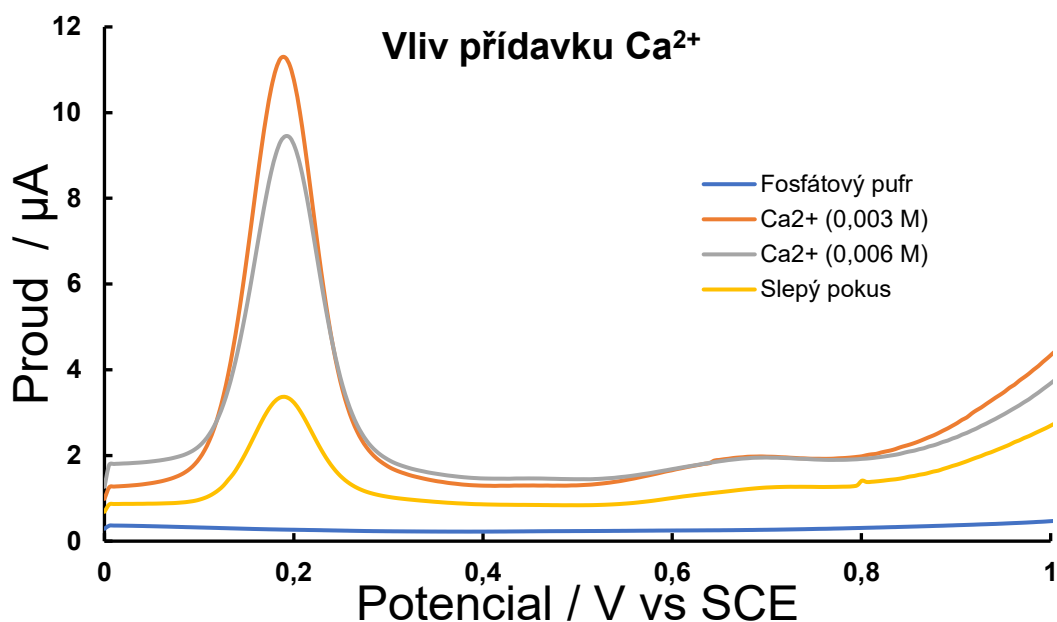
V UV oblasti 250-400 nm nebyly zaznamenány žádné rozdíly mezi testovanými koncentracemi (0,005 M a 0,0005 M) ani mezi různými kationty. Slepý pokus vykázal v této oblasti výrazně vyšší absorbanci než extrakt s přidavkem kationtů. Přiložená grafická **Příloha 3 (a, b, c)** zachycuje zmíněné jevy.

Pro potvrzení výsledků poskytnutých pomocí UV-Vis měření extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 bylo provedeno další voltametrické měření SWV metodou, a to roztoků  $\text{MgSO}_4$  a  $\text{CaSO}_4$  o různých koncentracích.



**Obrázek 22** – Voltametrické měření vlivu přidavku roztoku  $\text{MgSO}_4$  o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

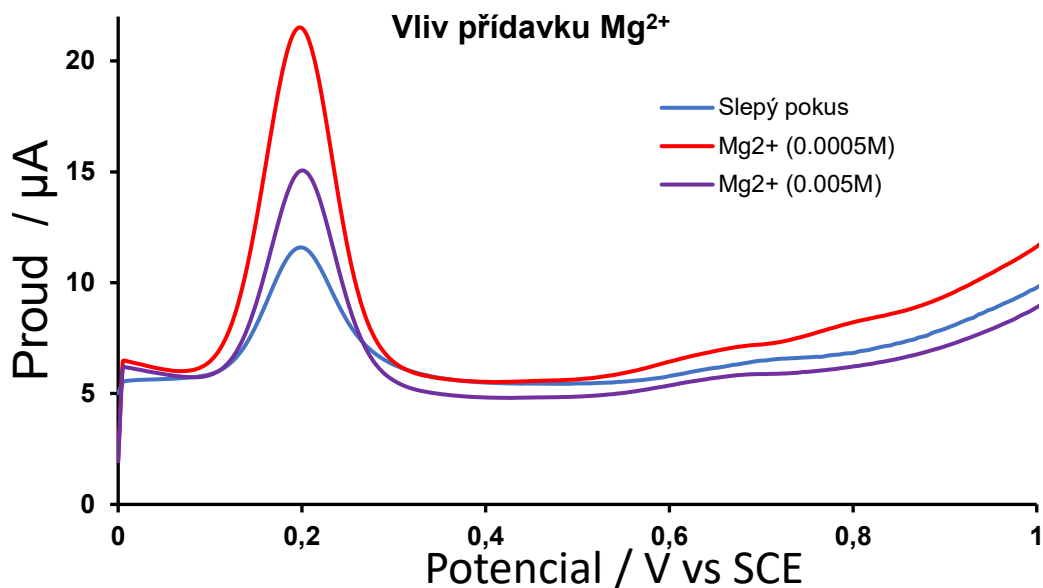
V následujícím **Obrázku 22** je znázorněn vliv přidavku kationtu  $\text{Mg}^{2+}$  na vlastnosti roztoku. Bylo pozorováno, že přidání jakékoli koncentrace  $\text{Mg}^{2+}$  do extraktu lopuchu mělo vliv na proudovou odezvu. Hodnota proudové odezvy v slepém pokusu byla  $3,31 \mu\text{A}$ , zatímco po při přidání  $0,25 \text{ M Mg}^{2+}$  dosáhla hodnoty  $10,77 \mu\text{A}$ . Nebyla prokázána lineární závislost mezi koncentrací přidaného  $\text{Mg}^{2+}$  a proudovou odezvou. Během měření zůstal oxidační potenciál stabilní na hodnotě  $0,19 \text{ V}$ .



**Obrázek 23** – Voltametrické měření vlivu přídavku roztoku CaSO<sub>4</sub> o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

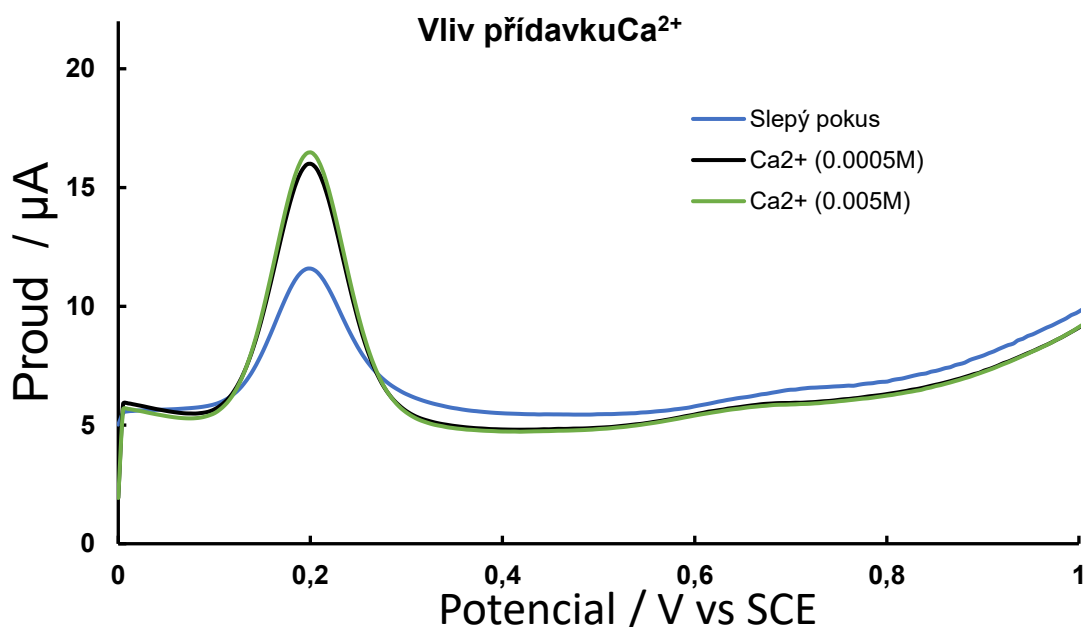
Na **Obrázku 23** je zobrazen vliv přídavku Ca<sup>2+</sup> kationtu na elektrochemické vlastnosti roztoků. Bylo pozorováno, že oba přídavky Ca<sup>2+</sup> kationtu do extraktu lopuchu zvýšili proudový výtěžek. Hodnota slepého pokusu byla 3,37 µA oproti 9,4 µA u 0,006 M a 11,07 µA u 0,003 M Ca<sup>2+</sup>. Potenciál se v průběhu měření byl stabilní na hodnotě 0,18 V.

Po srovnání celkového vlivu přídavku iontů Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup> bylo zjištěno, že nejvýraznější vliv měly koncentrace 0,003 M Ca<sup>2+</sup> a 0,25 M Mg<sup>2+</sup>. Proto bylo rozhodnuto provést další experimenty s přídavkem iontů, tentokrát s použitím chloridů namísto síranů, aby se zabránilo srážení roztoků po přidání kationtů.



**Obrázek 24** – Voltametrické měření vlivu přidavku roztoku MnCl<sub>2</sub> o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

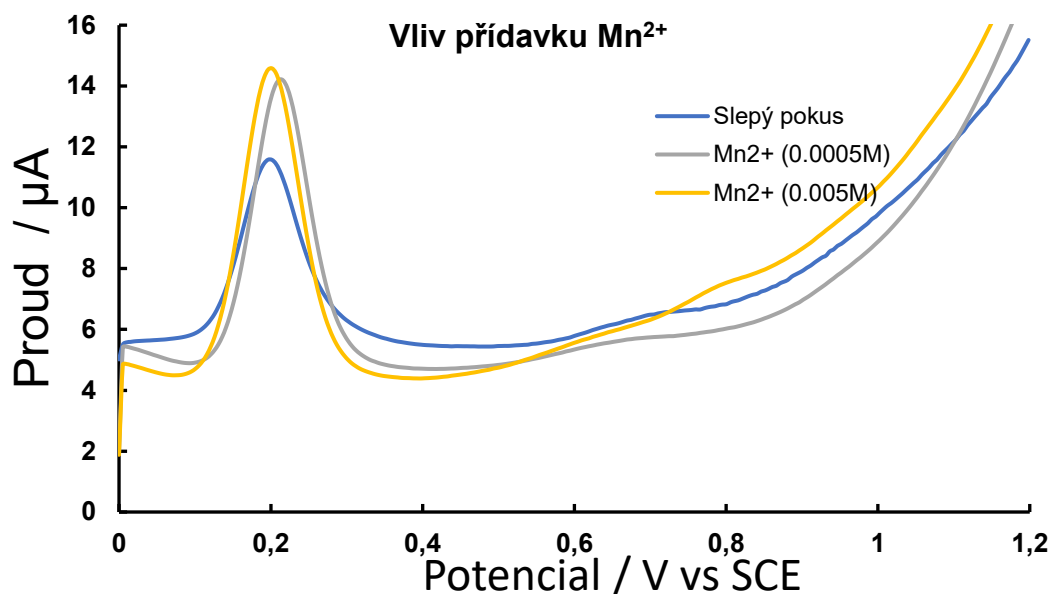
Na **Obrázku 24** je patrný jednoznačný vliv proudové odezvy na koncentraci kationtu. Hodnot proudů u slepého pokusu je 11,57 μA oproti 14,92 μA u 0,005 M a 21,43 μA u 0,0005 M Mg<sup>2+</sup>. I v tomto případě bylo potvrzeno, že nižší koncentrace iontu má větší vliv na změny ve voltamogramu extraktu. Potenciál je stabilní na hodnotě 0,21 V.



**Obrázek 25** – Voltametrické měření vlivu přidavku roztoku CaCl<sub>2</sub> o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0



Na **Obrázku 25** je vidět velký vliv obou koncentrací kationtu  $\text{Ca}^{2+}$ . Hodnot proudu u slepého pokusu je  $11,57 \mu\text{A}$  oproti  $16,25 \mu\text{A}$  u  $0,0005 \text{ M}$  a  $16,26 \mu\text{A}$  u  $0,005 \text{ M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Potenciál se nachází na hodnotě  $0,2 \text{ V}$ . Rozdíly v proudovém výtěžku nejsou významné.



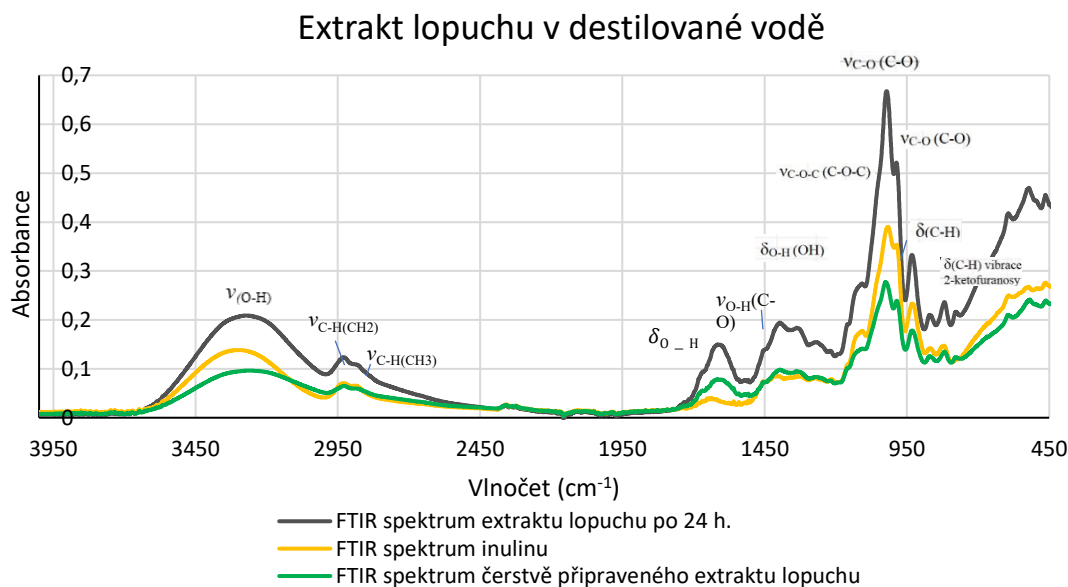
**Obrázek 26** – Voltametrické měření vlivu přidavku roztoku  $\text{MnCl}_2$  o různých koncentracích na extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

Tak hodnot proudu u slepého pokusu je  $11,82 \mu\text{A}$  oproti  $14,11 \mu\text{A}$  u  $0,0005 \text{ M}$  a  $14,44 \mu\text{A}$  u  $0,005 \text{ M}$   $\text{Mn}^{2+}$  (**Obrázek 26**). Potenciál se nachází na hodnotách  $0,2-0,21 \text{ V}$ . Velikost proudového výtěžku nijak nesouvisí s koncentrací  $\text{Mn}^{2+}$ .

Tento experiment byl proveden jako doplněk k UV-Vis měření extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 s cílem ověřit výsledky tohoto měření a získat další informace o elektrochemickém chování iontů v roztoku. Bylo pozorováno, že přidání jakékoli koncentrace  $\text{Mg}^{2+}$  do extraktu lopuchu mělo vliv na proudovou odezvu, ale lineární závislost mezi koncentrací přidaného  $\text{Mg}^{2+}$  a proudovou odezvou nebyla prokázána. Přidání iontů  $\text{Ca}^{2+}$  mělo pozitivní vliv na proudový výtěžek a nejvýraznější vliv měly koncentrace  $0,003 \text{ M}$   $\text{Ca}^{2+}$  a  $0,25 \text{ M}$   $\text{Mg}^{2+}$ . V druhé fázi experimentu byly použity chloridy  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  a  $\text{MnCl}_2$ . Bylo zjištěno, že koncentrace  $0,0005 \text{ M}$   $\text{Mg}^{2+}$  měla největší vliv na extrakt lopuchu. Potenciál zůstal stabilní v celém rozsahu koncentrací a pro každý iont se pohyboval v rozmezí  $0,18-0,21 \text{ V}$ . Dalším cílem bylo měření pomocí infračervené spektroskopie pro nalezení odlišnosti ve složení různých pufrů a vod.

### 3.5 Infračervená spektroskopie použitých pufrů a vod

V této části experimentu byly porovnány mezi sebou infračervená spektra extraktů kořene lopuchu připravené ve fosfátových pufrách o pH 8,0; 7,5 a 7,0; v Britton-Robinsonově pufru o pH 8,0, ve velmi tvrdé vodě a s extraktem lopuchu v destilované vodě. Navíc do porovnání s extraktem lopuchu v destilované vodě byl přidán spektrum inulinu pro ověření schody.



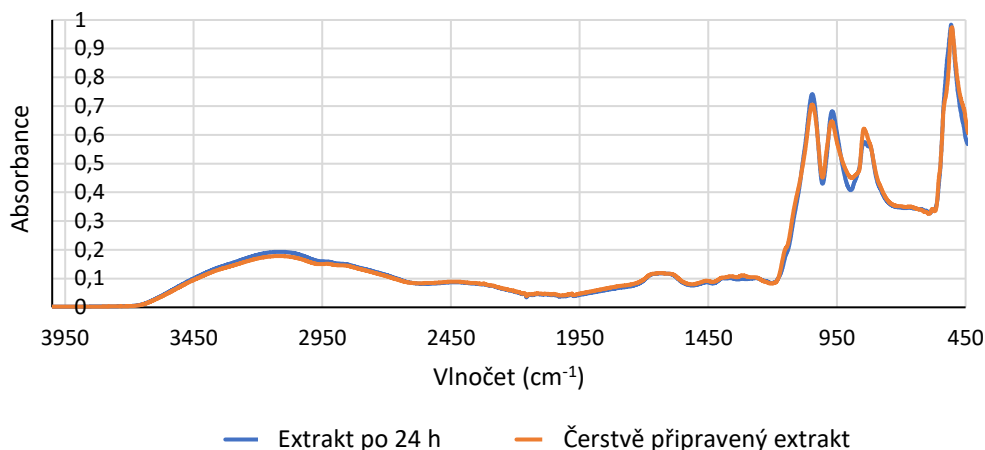
**Obrázek 27** – Infračervená spektra extraktu lopuchu v destilované vodě

Extrakt byly analyzovány jako lyofilizát metodou FTIR/ATR. Na **Obrázku 27** v oblasti  $3400\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$  se vyskytuje několik typických absorpčních pásů:  $3292\text{ cm}^{-1}$  odpovídá váleční vibrace O-H skupiny,  $2946\text{ cm}^{-1}$  způsobené vazbou C-H ve skupině  $\text{CH}_2$ ,  $2892\text{ cm}^{-1}$  způsobené vazbou C-H ve skupině  $\text{CH}_3$ . Které jsou dobře pozorované u inulinu a extraktu v destilované vodě po 24 hodinách, v čerstvém nálevu se pasy skreslují. Široký pás s intenzitou při  $1600\text{ cm}^{-1}$ , který není specifický pro inulin, ale je dobře vidět u čerstvě připraveného roztoku. Ten během 24 hodin narůstá, může to být způsobeno vznikem deformační vibrace ( $\delta$ ) vazby O-H, kdy dochází k absorpci vody.

V oblasti „otisku prstu“ pozorujeme dominantní komplexní sekvence pásů mezi  $1220$  a  $900\text{ cm}^{-1}$  díky přítomnosti vazeb C-C, C-O, C-O-C a C-O-H. V tomto rozmezí vlnočtu absorbance značně narůstá během 24 hodin. Nejintenzivnější pásy u  $1015$  a  $985\text{ cm}^{-1}$  jsou způsobeny vibracemi  $\nu$  (valenční vibrace) (C-C) a  $\nu$  (C-O). V oblasti při  $927\text{ cm}^{-1}$  je naznačena přítomnost  $\alpha$ -glukopyranosylového zbytku. Nakonec pásy při  $881$  a  $810\text{ cm}^{-1}$  ukazují na  $\text{CH}_2$  kruhovou vibraci  $\beta$ -anomeru a strukturu 2-ketofuranózy.

Oblast pod  $600\text{ cm}^{-1}$  vykazuje různé široké spektrální pásy. Tato oblast může obsahovat slabé pásy vznikající vibrací aromatických kruhů aminokyselin fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu, ale nelze je přesně určit [87].

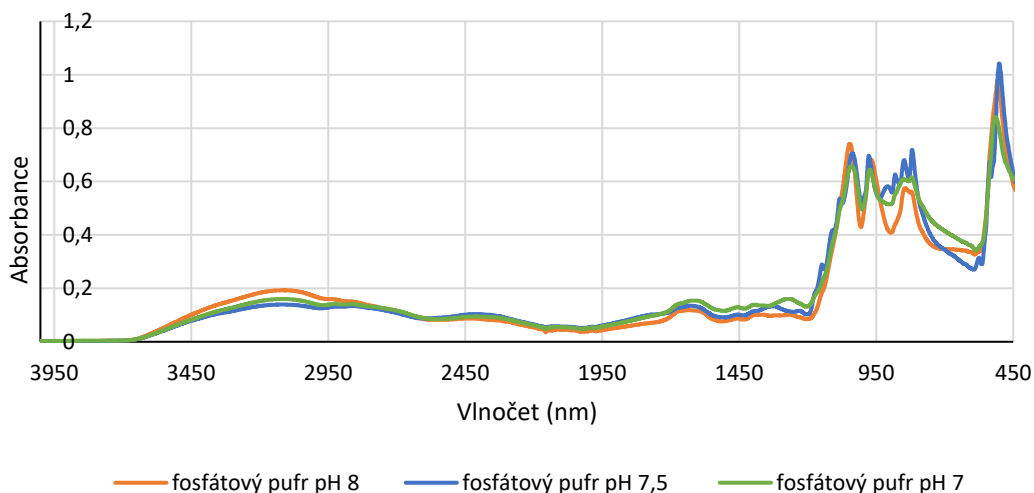
### Extrakt v fosfátovém pufru pH 8,0



**Obrázek 28** – Infračervená spektra extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

Jak je vidět z **Obrázku 28** absorbance čerstvě připraveného roztoku a absorbance po 24 hodinách jsou podobné, proto v dalších vyhodnocení se používá jen měření absorbance u vzorků po 24 hodinách.

### Extrakt ve fosfatových pufrch po 24 h

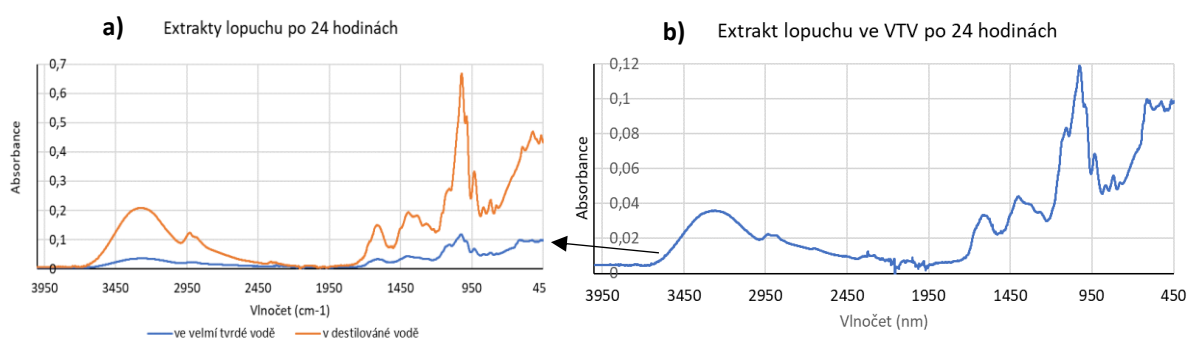


**Obrázek 29** – Infračervená spektra extraktu lopuchu ve fosfátovém pufrů o různém pH

Na **Obrázku 29** jsou infračervená spektra extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0, 7,5 a 7,0. Je vidět shodnost všech třech pufrů mezi sebou v oblasti  $3400\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$ , kde  $3113\text{ cm}^{-1}$  odpovídá váleční vibrace O-H skupiny, které jsou největší u pufru o pH 8,0. Zvýšená intenzita absorbance u  $2899\text{ cm}^{-1}$  naznačuje vazbu C-H ve skupině  $\text{CH}_2$ . Pás s intenzitou

při  $1622\text{ cm}^{-1}$ , který je dobře pozorovaný u extraktu ve vodě, u fosfátových pufrů má menší intenzitu, projevuje se vznik deformační vibrace ( $\delta$ ) vazby O–H, kde dochází k absorpci vody a nejvyšší intenzitu má pufr pH 7,0. V oblasti „otisku prstu“ pozorujeme komplexní sekvence pásů mezi  $1220$  a  $700\text{ cm}^{-1}$ . Tato oblast přináší informací o odlišnosti pufrů mezi sebou. Extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 má velmi výrazné tři intenzivní pasy při  $1044\text{ cm}^{-1}$ ,  $1016\text{ cm}^{-1}$  s intenzitou absorbance 0,6–0,7 pod vlivem vibraci  $\nu$  (valenční vibrace) (C–C) a  $\nu$  (C–O) a dlouhý nerozdělený pas od  $848$ – $813\text{ cm}^{-1}$ . Tento tvar spektra se bohužel podobá s IČ spektrem hydrogenfosforečnanu draselného (**Příloha 4**).

U extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 7,5 tyto pasy se objevují v oblasti  $1025\text{ cm}^{-1}$ ,  $1011\text{ cm}^{-1}$  s intenzitou 0,7 a poslední pás se rozpadá na několik malých:  $882\text{ cm}^{-1}$ ,  $843\text{ cm}^{-1}$  a  $815\text{ cm}^{-1}$ . U extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 7,0 při absorbanci 0,63 se objevují piky:  $1025\text{ cm}^{-1}$ ,  $1012\text{ cm}^{-1}$  a poslední je dlouhý nerozdělený pik od  $840$ – $809\text{ cm}^{-1}$  [88].



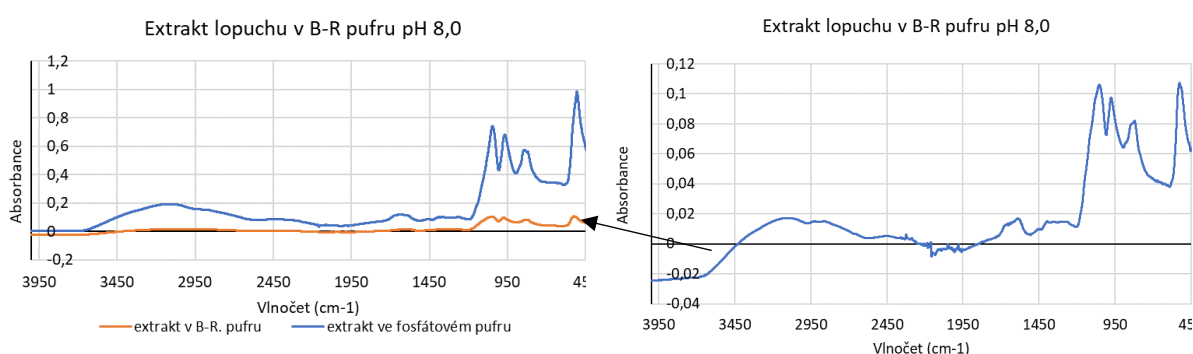
**Obrázek 30** — **a)** Infračervená spektra (FTIR/ATR) extraktu lopuchu ve VTV oproti extraktu v destilované vodě, **b)** Infračervená spektra extraktu lopuchu ve VTV

Při popisů **Obrázku 30b** byl přidán navíc **Obrázek 30a** obsahující extrakt lopuchu v destilované vodě, kvůli jejich velké shodě. Navíc obrázky jsou v různých měřítkách absorbance z důvodů lepší čitelnosti spektra extraktu lopuchu ve velmi tvrdé vodě.

V oblasti  $3400$ – $2700\text{ cm}^{-1}$  se vyskytuje několik typických absorpčních pásů:  $3292\text{ cm}^{-1}$  odpovídá váleční vibrace O–H skupiny u obou extraktů,  $2946\text{ cm}^{-1}$  u lopuchu v destilované vodě a  $2916\text{ cm}^{-1}$  u lopuchu ve VTV, způsobené vazbou C–H ve skupině  $\text{CH}_2$ ,  $2892\text{ cm}^{-1}$  způsobené vazbou C–H ve skupině  $\text{CH}_3$  u extraktu v destilované vodě a  $2872\text{ cm}^{-1}$  u extraktu ve VTV. Tyto pasy jsou dobře pozorované i u inulinu. Široký pás s intenzitou při  $1600\text{ cm}^{-1}$  může být způsoben vznikem deformační vibrace ( $\delta$ ) vazby O–H, kdy dochází k absorpci vody. V oblasti „otisku prstu“ je sekvence pásů mezi  $1200$  a  $900\text{ cm}^{-1}$ , díky vazbám C–C, C–O, C–O–C a C–

O–H. Nejintenzivnější pásy o 1015 a 985  $\text{cm}^{-1}$  jsou způsobeny vibracemi v (valenční vibrace) (C–C) a v (C–O). V oblasti při 927  $\text{cm}^{-1}$  je naznačena přítomnost  $\alpha$ -glukopyranosylového zbytku. Nakonec pásy při 881 a 810  $\text{cm}^{-1}$  ukazují na  $\text{CH}_2$  kruhovou vibraci  $\beta$ -anomeru a strukturu 2-ketofuranózy. Jestli se podíváme na **Obrázek 30b**, kde jsou znázorněny extrakt ve VTV a v destilované vodě je vidět, že mají velmi podobné píky, jenom absorbance extraktu v destilované vodě je vyšší, tak maxim nejvyššího píku je na 0,65 oproti 0,12 u stejného píku ve VTV.

Podle získaných výsledku můžeme říct, že extrakt z kořene lopuchu ve velmi tvrdé vodě svojí strukturou a tvarem pásů se shoduje s fruktanem inulinového typu.



**Obrázek 31-** FTIR/ATR spektrum extraktu kořene lopuchu v Britton-Robinsonově (B-R) a fosfátovém pufru (pH 8,0). Šipkou je označeno pouze spektrum v B-R pufru.

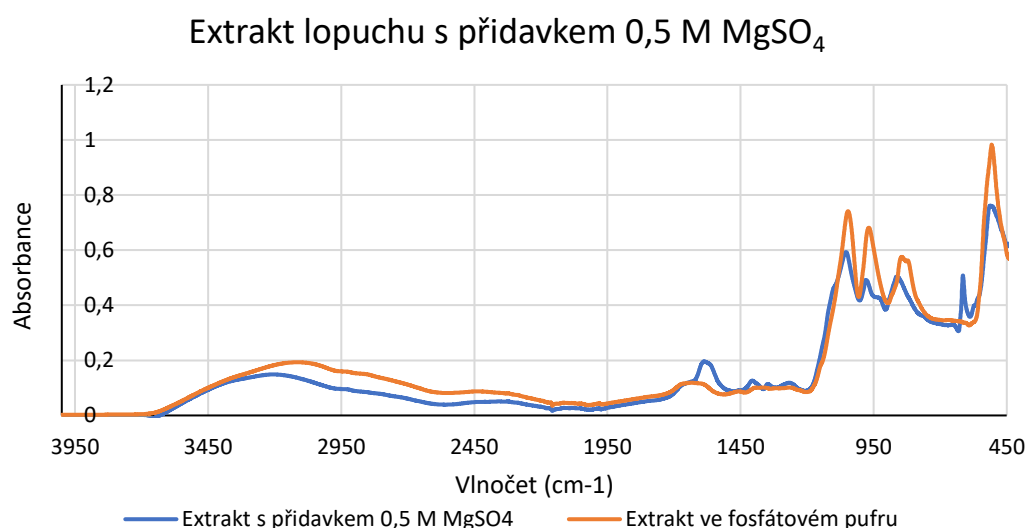
Pro lepší porovnání byl použit **Obrázek 31** extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0 s jiným měřítkem. V oblasti 3400-2700  $\text{cm}^{-1}$  u extraktu v B-R. pufru hodnota 3112  $\text{cm}^{-1}$  odpovídá váleční vibrace O–H skupiny, které jsou největší u pufru o pH 8,0. Malý hrb u 2831  $\text{cm}^{-1}$  naznačuje vazbu C–H ve skupině  $\text{CH}_2$ . Pás s intenzitou při 1561  $\text{cm}^{-1}$  má menší intenzitu než u fosfátového pufru, ale v tomto pufru se začíná dělit na několik pásů, tak se projevuje vznik deformační vibrace ( $\delta$ ) vazby O–H, kdy dochází k absorpci. V oblasti „otisku prstu“ pozorujeme komplexní sekvence pásů mezi 1220 a 700  $\text{cm}^{-1}$ . Která se shoduje s extraktem ve fosfátovém pufru, a tedy i s hydrogenfosforečnanem draselným. Extrakt lopuchu v B-R. pufru má velmi výrazné tři pásy při absorbanci 0,08–01: 1044  $\text{cm}^{-1}$ , 966  $\text{cm}^{-1}$ , 811  $\text{cm}^{-1}$  [88].

Byla provedena analýza změn v spektru extraktu z kořene lopuchu v destilované vodě během 24 hodin stání. Výsledky ukázaly, že intenzita pásů postupně roste a tvar pásu se shoduje s fruktanem inulinového typu, což potvrzuje silný vliv inulinu obsaženého v extraktu lopuchu. Extrakt lopuchu připravený ve fosfátovém pufru o pH 8,0, 7,5 a 7,0 má shodné spektrální

charakteristiky s hydrogenfosforečnanem draselným (**Příloha 4**), což svědčí o vysokém vlivu použitých chemikálií pro přípravu fosfátového pufru na obsah látek v extraktu. Extrakt lopuchu připravený ve velmi tvrdé vodě vykazoval nižší intenzitu absorbance než ostatní extrakty, ale spektrogramy byly velmi podobné extraktu připravenému v destilované vodě, což také naznačuje silný vliv inulinu. Nakonec, extrakt připravený v Britton-Robinsonově pufru má spektrální charakteristiky shodné s extraktem lopuchu připraveným ve fosfátovém pufru o pH 8,0.

### 3.5.1 Infračervená spektroskopie extraktů s přísady vybraných anorganických iontů

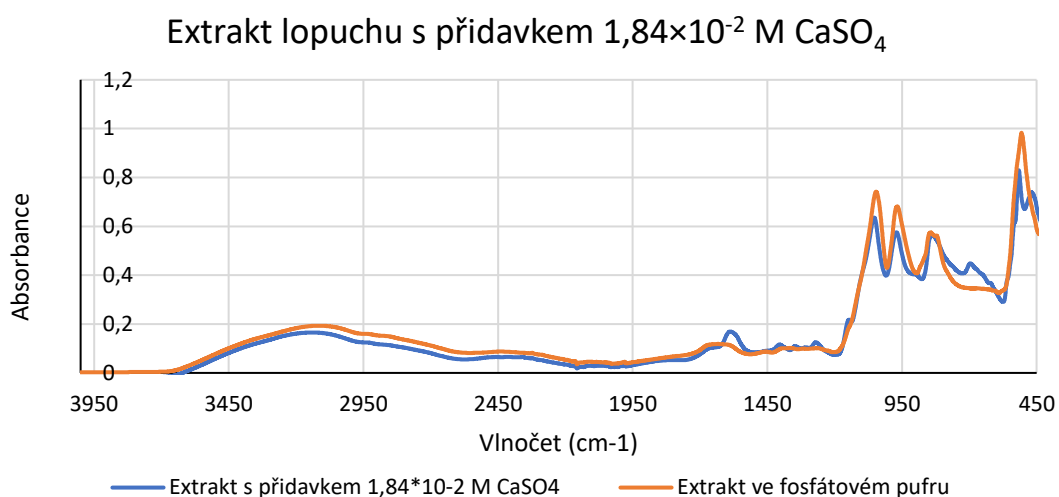
Při dalším zkoumání byly porovnány piky extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0 a přísady různé koncentraci vybraných kationtů pro zjištění, zda je viditelný nějaký rozdíl.



**Obrázek 32** – Infračervená spektra přísady 0,5 M MgSO<sub>4</sub> do extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

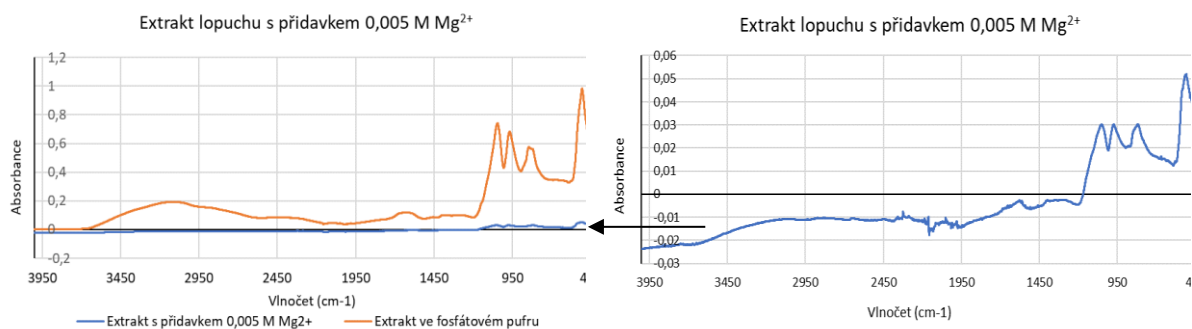
Na **Obrázku 32** je porovnání extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 a ve stejném pufru s přísadou 0,5 M MgSO<sub>4</sub> mezi sebou. Je vidět, že po přísadu kationtu absorbance se snížila, ale samotný obrázek pásů zůstal stejný. V oblasti 3600–2700 cm<sup>-1</sup> se vyskytuje několik typických absorpčních pásů: 3236 cm<sup>-1</sup> a 3079 cm<sup>-1</sup> odpovídá válečné vibrace O-H skupiny u obou extraktů, 2898 cm<sup>-1</sup> u lopuchu s přísadou Mg<sup>2+</sup> a 2904 cm<sup>-1</sup> u lopuchu ve fosfátovém pufru, způsobené vazbou C–H ve skupině CH<sub>2</sub>. Široký pás s intenzitou při 1560 cm<sup>-1</sup> u extraktu s přísadou kationtu může být způsoben vznikem deformační vibrace (δ) vazby O–H, kdy dochází k absorpci vody, ale ve samotném extraktu ve fosfátovém pufru tento pás je při 1607 cm<sup>-1</sup>.

V oblasti „otisku prstu“ je sekvence pásů mezi 1200 a 900  $\text{cm}^{-1}$ , díky vazbám C–C, C–O, C–O–C a C–O–H. Nejintenzivnější pásy – klky o 1023  $\text{cm}^{-1}$  996  $\text{cm}^{-1}$  a širší 862  $\text{cm}^{-1}$  při intenzitě 0,5-0,6, které se shodují se spektry hydrogenfosforečnanu draselného, popsaného výše. Také v oblasti 613  $\text{cm}^{-1}$  se objevuje nový pas u extraktu s přídavkem, který není vidět u extraktu v samotném pufru, který může svědčit o píkách ohybu C-H mimo rovinu [6].



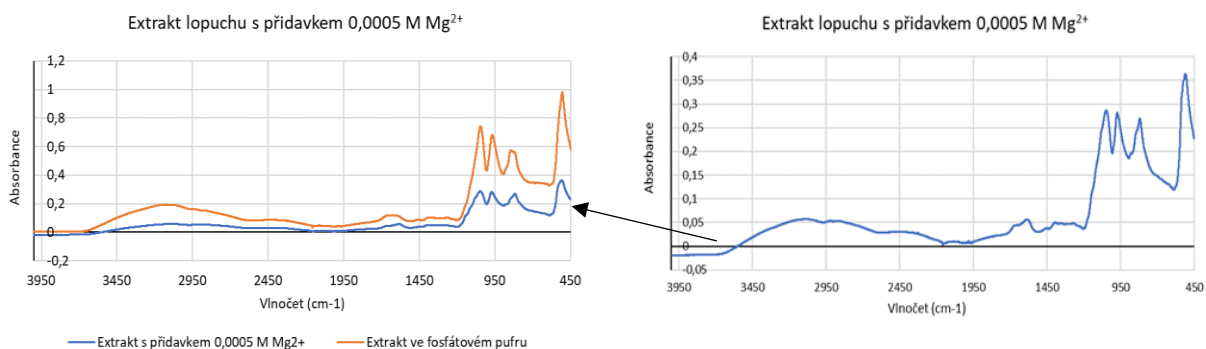
**Obrázek 33** – Infračervená spektra přídavku  $1,84 \times 10^{-2}$  M  $\text{CaSO}_4$  do extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 v porovnání s extraktem bez kationtu

Na **Obrázku 33** je porovnání extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 a ve stejném pufru s přídavkem  $1,84 \times 10^{-2}$  M  $\text{CaSO}_4$  mezi sebou. S přídavkem kationtu absorbance se snižuje, ale samotný obrázek pásy zůstává stejný. Kromě oblasti 1200–1450  $\text{cm}^{-1}$ , kde se objevují několik malých pásů, neviditelných v extraktu ve fosfátovém pufru. A taky pás 618  $\text{cm}^{-1}$ , který může svědčit o píkách ohybu C–H mimo rovinu.



**Obrázek 34-** FTIR/ATR spektrum extraktu kořene lopuchu ve fosfátovém pufru (pH 8,0) s přidavkem 0,005 M  $MgCl_2$  oproti čistému extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0. Šipkou je označeno pouze spektrum extraktu s přidavkem 0,005 M  $MgCl_2$ .

Na **Obrázku 34** jsou zobrazeny extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 a extrakt ve stejném pufru s přidavkem 0,005 M  $Mg^{2+}$  (z důvodu lepší čitelnosti obrázky mají různou intenzitu absorbance). S přidavkem kationtu absorbance se silně snižuje z 1 do 0,05 v maximu u extraktu ve fosfátovém pufru oproti extraktu s přidavkem kationtu, ale samotný obrázek pásy zůstává stejný. Kromě oblasti  $4000-1100\text{ cm}^{-1}$ , kde z neznámého důvodu absorbance se nachází v záporné oblasti. Forma pásů v oblasti  $1095-775\text{ cm}^{-1}$  taky se mění: jestli u extraktu ve fosfátovém pufru pásy se postupně snižují intenzitu absorbance u extraktu s přidavkem kationtu oni se nachází na stejné úrovni.

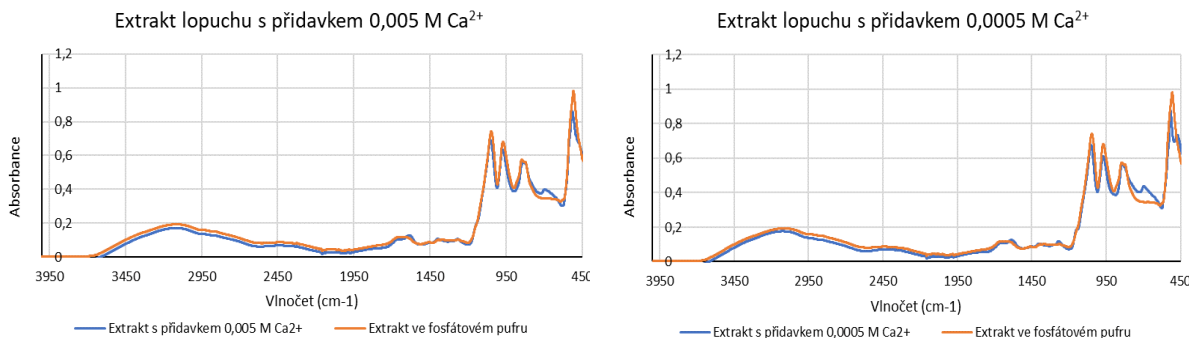


**Obrázek 35-** FTIR/ATR spektrum extraktu kořene lopuchu ve fosfátovém pufru (pH 8,0) s přidavkem 0,0005 M  $MgCl_2$  oproti čistému extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0. Šipkou je označeno pouze spektrum extraktu s přidavkem 0,0005 M  $MgCl_2$ .

Na **Obrázku 35** jsou zobrazeny extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 a extrakt ve stejném pufru s přidavkem 0,0005 M  $Mg^{2+}$  (z důvodu lepší čitelnosti obrázky mají různou

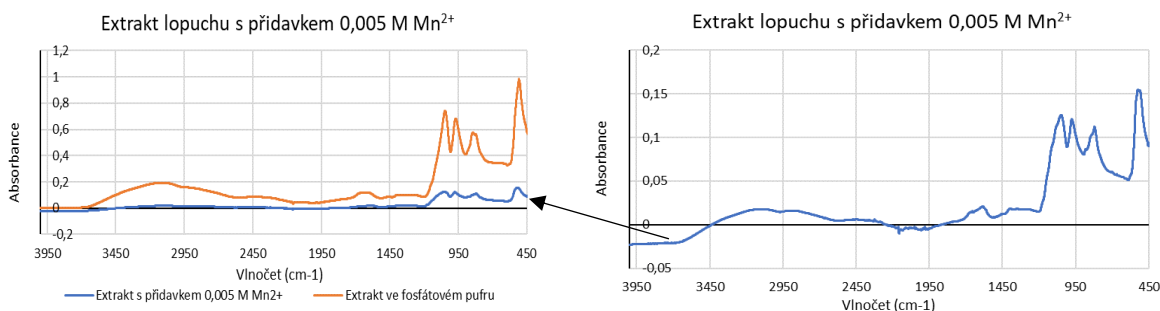


intenzitu absorpance). S přidavkem kationtu absorpance se silně snižuje z 1 do 0,36 v maximu u extraktu ve fosfátovém pufru oproti extraktu s přidavkem kationtu, ale samotný obrázek pásu zůstává stejný. Kromě oblasti  $4000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ , kde z neznámého důvodu absorpance se nachází v záporné oblasti.



**Obrázek 36** – FTIR/ATR spektrum extraktu kořene lopuchu ve fosfátovém pufru (pH 8,0) s přidavkem  $0,005\text{ M CaCl}_2$  a  $0,0005\text{ M CaCl}_2$  oproti čistému extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0.

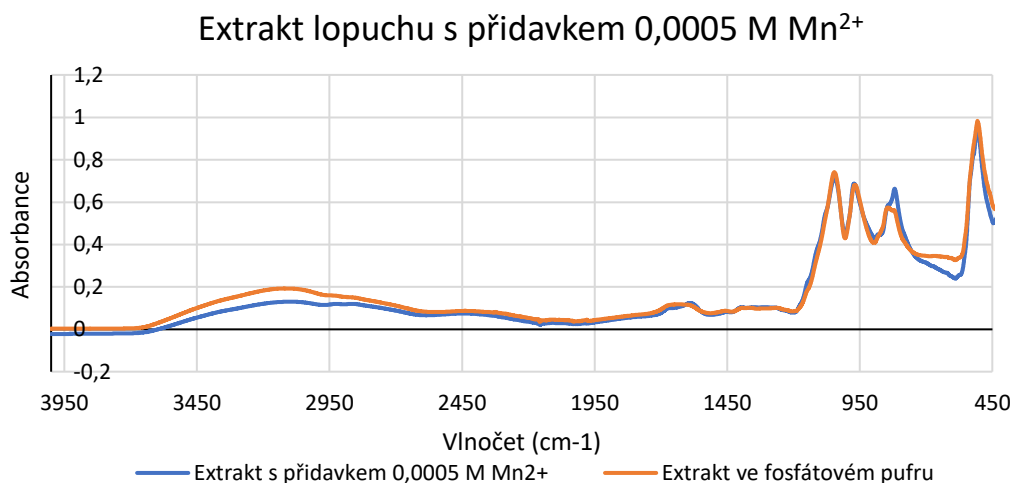
Na **Obrázku 36** je porovnání extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 a ve stejném pufru s přidavkem  $0,005\text{ M}$  a  $0,0005\text{ M Ca}^{2+}$  mezi sebou. S přidavkem kationtu absorpance se nepatrně snižuje, ale samotný obrázek pásu zůstává stejný. Kromě nového pásu  $673\text{ cm}^{-1}$ , který začíná být viditelný u extraktu s přidavkem  $0,005\text{ M Ca}^{2+}$  a vzrůstá v intenzitě a se posouvá na  $685\text{ cm}^{-1}$  u extraktu s přidavkem  $0,0005\text{ M}$ , což může svědčit o píkách ohybu C-H mimo rovinu.



**Obrázek 37** – FTIR/ATR spektrum extraktu kořene lopuchu ve fosfátovém pufru (pH 8,0) s přidavkem  $0,005\text{ M MnCl}_2$  oproti čistému extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0. Šipkou je označeno pouze spektrum extraktu s přidavkem  $0,005\text{ M MnCl}_2$

Na **Obrázku 37** jsou zobrazeny extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 a extrakt ve stejném pufru s přidavkem  $0,005\text{ M Mn}^{2+}$  (z důvodu lepší čitelnosti obrázky mají různou intenzitu absorpance). S přidavkem kationtu absorpance se silně snižuje z 1 do 0,153 v maximu u extraktu ve fosfátovém pufru oproti extraktu s přidavkem kationtu, ale samotný obrázek pásů

zůstává stejný. Kromě oblasti  $4000\text{--}3450\text{ cm}^{-1}$ , kde z neznámého důvodu absorbance se nachází v záporné oblasti.



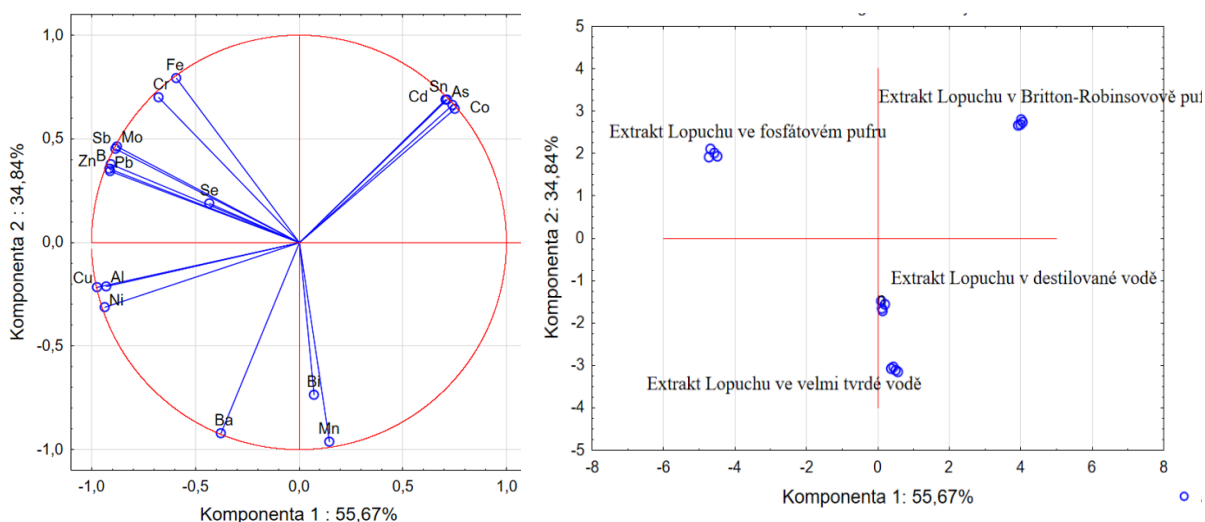
**Obrázek 38** – Infračervená spektra extraktů lopuchu s přidavkem  $0,0005\text{ M MnCl}_2$  oproti extraktu ve fosfátovém pufru pH 8,0

Na **Obrázku 38** jsou zobrazeny extrakt lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 a extrakt ve stejném pufru s přidavkem  $0,0005\text{ M Mn}^{2+}$ . S přidavkem kationtu do extraktu absorbance je nepatrně nižší, ale samotný obrázek pásů zůstává stejný.

V této části bylo provedeno porovnání extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0 a ve stejném pufru s přidavkem kationtů ( $0,5\text{ M MgSO}_4$  nebo  $1,84 \times 10^{-2}\text{ M CaSO}_4$ ). Na základě analýzy infračervené spektroskopie bylo zjištěno, že u extraktů s přidavkem kationtů byl pozorován nový pás při  $613\text{ cm}^{-1}$ , který není vidět u extraktu v samotném pufru. Při porovnání extraktu ve fosfátovém pufru s přidavkem roztoků  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  a  $\text{MnCl}_2$  byly pozorovány rozdíly v absorbanci v oblasti  $1200\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$  a píku  $618\text{ cm}^{-1}$ . V oblasti  $4000\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$  u extraktu s  $\text{MgCl}_2$  byla absorbance v záporné oblasti, což není známo proč. Forma pásů v oblasti  $1095\text{--}775\text{ cm}^{-1}$  byla také odlišná. Objevilo, že ič-spektrum extraktu s přidavkem kationtů, z neznámého důvodu, s menší koncentrací  $0,0005\text{ M}$  sice má sníženou absorbanci oproti extraktu ve fosfátovém pufru, ale ta je větší než u extraktu s přidavkem  $0,005\text{ M}$ . Tenhle objev potvrzuje dřívější zkoumání UV-Vis spekter se stejným výsledkem. Celkově lze tedy říci, že přidavek kationtů do fosfátového pufru má určitý vliv na spektrum extraktu lopuchu, což může mít dopad na jeho vlastnosti a účinnost.

### 3.6 ISP/MS

Byly vypočítané průměrné obsahy minerálních látek ve slepých vzorcích (pufrech) a byly následně odečtené od každé naměřené hodnoty vzorku. Pak byla provedena analýza hlavních komponent pro obsah minerálů, analýza proběhla se standardizovanými daty. Celkově byly naměřené 47 prvků: B, Al, V, Cr, Fe, Ni, Zn, As, Se, Zr, Sn, Cs, La, Pr, Sm, Gd, Dy, Er, Lu, Hf, Ta, Re, Bi, Th, U, Mn, Co, Cu, As, Rb, Y, Mo, Cd, Sb, Ba, Ce, Nd, Eu, Tb, Ho, Yb, Hf, W, Pt, Pb, Th. Nevíce zastoupené prvky ve všech vzorcích byly: B, Al, Mn, Co, Cu, Rb, Mo, Ba, Cd, Sb, Pb, Bi, Sn, As, Fe, Cr, Zn, Se, Ni.



**Obrázek 39** – Graf projekce a) proměnných a b) případů do faktorové roviny

Graf projekce proměnných (**Obrázek 39a**) ukázal závislost hodnoty na počtu komponent vysvětlující variabilitu v datech. Z tohoto grafu je patrné, že první dvě komponenty jsou dostačující ( $y < 1$ ) pro popis variability (90,5 %). První dvě komponenty jsou větší než 1, proto můžeme říct, že plně vysvětlují variabilitu v datech (90,5 %), a další analýza zahrnuje jenom je (viz graf v **Příloze 5**). První komponenta koreluje s obsahy Zn, Sb, Mo, Pb, B, Cu, Al a Ni, a vysvětluje 55,7% variability v datech, ne tak velký vliv má i Se (krátký vektor). Druhá komponenta – osa y 34,84 % ukazuje na velkou roli Mn, Bi a Ba.

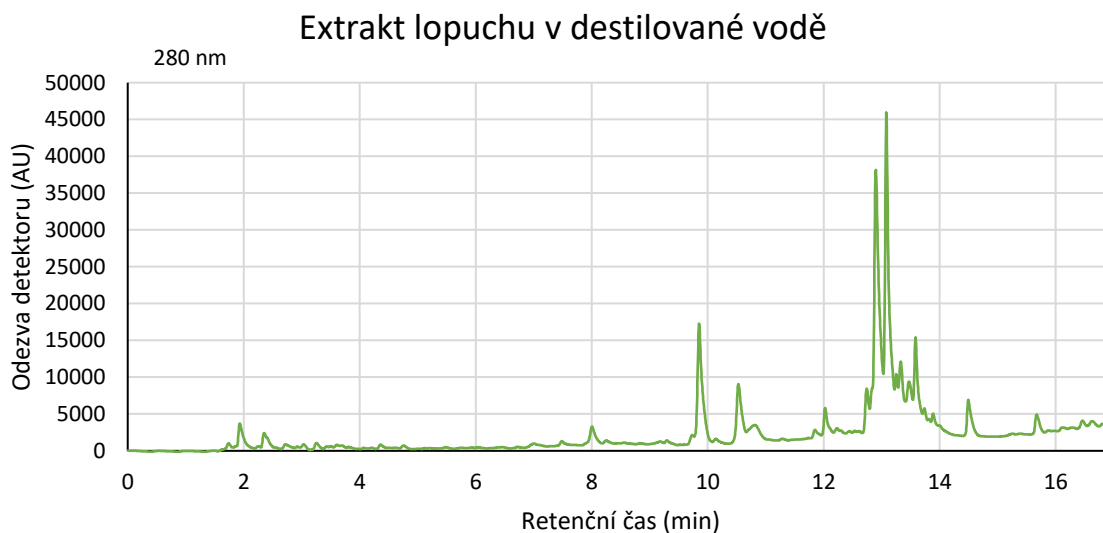
Při porovnání dalšího grafu případů do faktorové roviny (**Obrázek 39b**) můžeme říct, že každý z použitých roztoků byly rozdělené do jednotlivých skupin, které se nachází na různých místech osy x a y. To znamená že každá s těchto skupin má odlišný obsah minerálu a za vznik zelené barvy roztoků můžou odpovídat rozdílné kationty ve složení. V BR pufru, který se nachází v pravém horním kvadrantu grafu, hlavními minerálními látky jsou Cd, Sn, As a Co. Oproti Fosfátovému pufru, který je v levém horním kvadrantu grafu, kde jsou dominantní

ionty: Fe, Cr, Sb, Mo, Pb, Zn, B, Se. Destilovaná voda a VTV jsou blízko sobě na grafu dole uprostřed, ale mají rozdíly ve složení, protože VTV je posunuto bliž k pravému dolnímu kvadrantu. Hlavními složkami obou roztoku jsou Mn, a B, B má menší vliv. Tak na 1 faktor má vliv Fosfátový pufr, faktor 2 ovlivňuje destilovaná voda a VTV.

Jako výsledek z toho můžeme říct, že celkově minerální analýza a analýza hlavních komponent neodhalila, proč v B-R. pufru se zelená barva netvořila, předpokládáme ve složení výskyt ještě nějaké organické látky, která se extrahuje do pufru, proto bylo nutno udělat kapalinovou chromatografii pro ověření rozdílů.

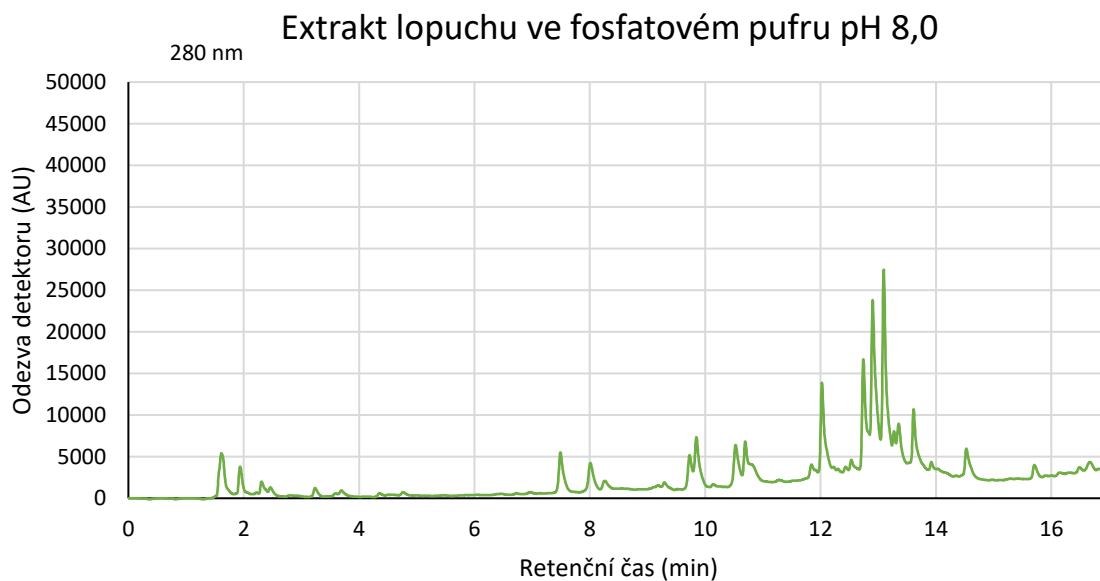
### 3.7 Kvalita extraktů metodou HPLC

Identifikace vrcholů byla provedena porovnáním časů retence ( $t_R$ ) s referenčními standardy a literárními daty.



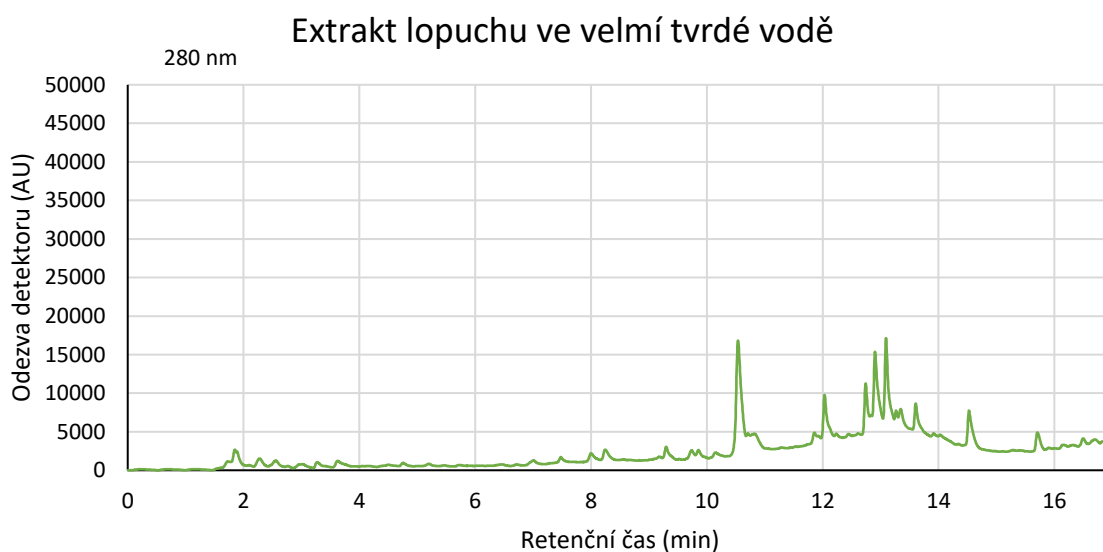
**Obrázek 40** – Měření pomocí kapalinové chromatografii extraktu lopuchu v destilované vodě

Počet piků u extraktu lopuchu v destilované vodě na **Obrázku 40** byl 80 piků a celková plocha piků tvořila 1289. Maximum nejvyššího piků je 45,97 mAU na 13,08 minutě.



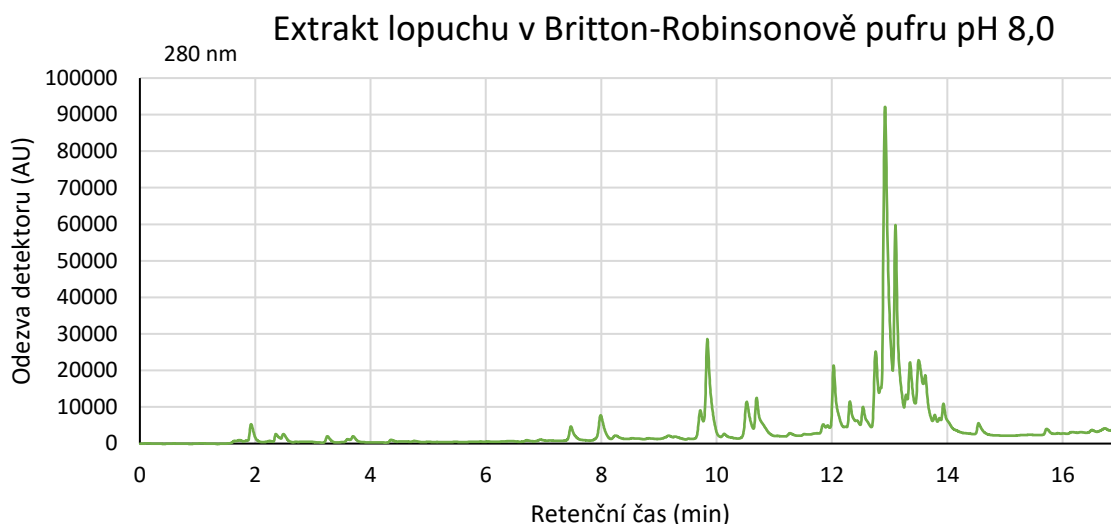
**Obrázek 41** – Měření pomocí kapalinové chromatografie extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru pH 8,0

Počet píků u extraktu lopuchu ve fosfátovém pufru na **Obrázku 41** byl 58 píků a celková plocha píků tvořila 1120. Maximum nejvyššího píků je 27,08 mAU na 13,09 minutě.



**Obrázek 42** – Měření pomocí kapalinové chromatografie extraktu lopuchu ve velmi tvrdé vodě

Počet píků u extraktu lopuchu ve velmi tvrdé vodě na **Obrázku 42** byl 65 píků a celková plocha píků tvořila 1055. Maximum nejvyššího píků je 17,11 mAU na 13,09 minutě.



**Obrázek 43** – Měření pomocí kapalinové chromatografie extraktu lopuchu v Britton-Robinsonově pufru pH 8,0

Počet píků u extraktu lopuchu v Britton-Robinsonově pufru na **Obrázku 43** byl 69 píků a celková plocha píků tvořila 2516. Je vidět, že i při poměrně podobném počtu píků, celková plocha u extraktu v B-R. pufru je největší, maximum nejvyššího píků je 90,62 mAU na 12,92 minutě. Další velký pik na podobném čase vykazuje i extrakt lopuchu v destilované vodě v hodnotě 45,97 mAU. Extrakty lopuchu ve VTV a fosfátovém pufru pH 8 mají při stejném čase podobný pik jen v menší amplitudě.

Pro lepší čitelnost grafů **Obrázky 40-42** byly zarovnaný na stejnou hodnotu odezvy detektoru do (50 mAU), **Obrázek 43** obsahoval příliš velké hodnoty odezvy (do 100 mAU), proto zarovnání na stejná čísla by zhoršila čitelnost ostatních grafu.

Podle studia Yuxia Tang a kol., které stanovovaly chemické složení v extraktu lopuchu pomocí UPLC–PAD při 280 nm, ukazují, že při jejich výzkumu postupně eluují kyselina kávová tR -3.13, kyselina p-kumarová tR-3.75, kverticin tR- 5.44 a luteolin tR-6.19 [90].

Další studia Lou, ZX a kol., kde byl zkoumán chromatogram frakce listu lopuchu pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) s fotodiodovým polem a detekcí hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem. Ukázalo se, že pik tR 7,62 byl identifikován jako kyselina chlorogenová, pik 2 s tR 8,25 byl identifikován jako kyselina kávová, další pik 3 při tR 10,90 odpovídal kyselině p-kumarové, pik 4 identifikován jako kyselina benzoová s tR 12,04. Pátý pik odpovídal rutinu, sedmý pik s tR 13,67 byl identifikován jako krocín. Pik 8 byl identifikován jako kvercetin s tR 14,82, pik 9 s tR 15,75 byl přiřazen luteolinu. Bylo zjištěno, že charakteristiky všech identifikovaných sloučenin jsou totožné s charakteristikami standardních sloučenin [91].

Ishii, T a kolegové, u oleje ze semen lopuchu metodou HPLC, že při tR 9,63 eluuje arktiin a při tR 11,93 – arktigenin [92].

Zhang, XX a kolegové v svojí práci zkoumaly extrakt z prášku z kořene lopuchu pomocí UPLC (280 nm) a stanovily, že pik při tR 0,43 odpovídá kyselině chnové, pik 2- tR 0,53 kyselině citronové, při tR 2,175 je kyselina p-kumarová. Pik tR 2,836 byl přiřazen kyselině chlorogenové, další pik tR 6,826 odpovídal kvercetin a pik tR 8,597 je příslušný kyselině kavové [10].

Všechny studia mají různé retenční časy pro stejné fenolické látky z důvodu různého rozpouštědla pro extrakt lopuchu, kde obsazené látky mohli eluovat s posunem, a použití odlišných detektorů, což taky může mít vliv na výsledky. Nicméně díky těmhle výzkumům máme potvrzení velké rozmanitosti fenolytických látek v extraktu lopuchu.

## 4 ZÁVĚR

Během experimentu byly připraveny extrakty kořenné lopuchu ve fosfátovém pufru pH 7,0, 7,5, 8,0, v Britton-Robinsonově pufru pH 8,0, ve velmi tvrdé vodě a v destilované vodě, u kterých bylo změřeno pH, barevnost (měřeny parametry  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^\circ$ ), antioxidační aktivity s roztokem DPPH a vliv přídavku EDTA, infračervená spektra, provedeno voltametrické měření, minerální analýza a analýza pomocí kapalinové chromatografie. Z výzkumu lze vyvodit, že barevnost extraktů souvisí s výslednou hodnotou pH, v bazickém prostředí (pH 8,0) u barevnosti převládá výrazná zelená složka barvy.

DPPH test ukázal, že extrakt lopuchu připravený ve VTV vykazoval nejvyšší antioxidační aktivitu.

Experimenty ukázaly, že přídavek EDTA způsoboval snížení absorpce barvy extraktu v oblasti 680–690 nm (odpovědná za zelenou barvu), což souviselo spíše se změnou hodnoty pH při vysokých koncentracích EDTA (posun do neutrální oblasti). Elektrochemické vlastnosti extraktů kořene lopuchu se lišily posunem oxidačního potenciálu a nárůstem oxidačního proudu. Tento efekt je spíše důsledkem změny pH roztoku. V této části výzkumu nelze jednoznačně tvrdit, že EDTA měla vliv na tvorbu komplexu mezi ionty kovů a fenolickými látkami přítomnými v extraktu lopuchu.

V rámci zkoumání byly přidány vybrané kationty a byl vyhodnocen jejich vliv na spektrální vlastnosti extraktů. Experimentálně bylo zjištěno, že pouze  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  a  $Mn^{2+}$  mají skutečný vliv na barevnost extraktu. Nejvýraznější nárůst absorpce byl pozorován u kationtu  $Mn^{2+}$ , následuje kationt  $Ca^{2+}$  a nejmenší nárůst absorpce byl pozorován u kationtu  $Mg^{2+}$ . Nejzajímavějším zjištěním bylo, že koncentrace 0,0005 M přidaných kationtů měla největší vliv na barevnost extrakt lopuchu, tj. zvyšovala intenzitu absorpce v oblasti vlnových délek odpovídajících za zelený vzhled extraktu.

U infračervené spektrometrie bylo měřením potvrzeno, že jako hlavní složka extraktu z kořene lopuchu je fruktan inulinového typu. Bylo zjištěno, že přídavek kationtů způsobuje snížení intenzity absorpčních pásů. Nevýhodou této metody je výrazná interference solí, které tvořily roztoky pro extrakci, zejména fosforečnanový pufr.

Pomocí ICP/MS byly nalezeny nejvíce zastoupené prvky ve všech roztocích. Těmi jsou: B, Al, Mn, Co, Cu, Rb, Mo, Ba, Cd, Sb, Pb, Bi, Sn, As, Fe, Cr, Zn, Se a Ni. Výsledky analýz nevysvětlily, proč se v extraktu v B-R pufru pH 8,0 netvořila zelená barva, což může být způsobeno přítomností neznámé organické látky, která se extrahuje pouze do tohoto pufru.



Kapalinová chromatografie potvrdila velký kvalitativní rozdíl mezi extraktem v B-R pufru pH 8,0 a ve fosfátovém pufru pH 8,0.

Celý experiment byl provázen přílišnou variabilitou vývoje barevnosti v čase, která mohla být způsobena různou velikostí částic vzorku. Určitou roli zde mohla také sehrát různá koncentrace kyslíku, kterou je nutné vyloučit/potvrdit v dalších experimentech.

## POŽITÁ LITERATURA

- [1] ŠAROUNOVÁ T. *České názvy některých léčivých rostlin používaných ve farmacii* [online]. Brno, 2015 [cit. 2022-10-09]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/frhw6/>. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Filozofická fakulta. Vedoucí práce Pavla VALČÁKOVÁ.
- [2] SKOWROŃSKA W., GRANICA S., Dziedzic M., a kol. *Arctium lappa and Arctium tomentosum, Sources of Arctii radix: Comparison of Anti-Lipoxygenase and Antioxidant Activity as well as the Chemical Composition of Extracts from Aerial Parts and from Roots. Plants*, 2021, **10**(78). Dostupné z: [doi.org/10.3390/plants10010078](https://doi.org/10.3390/plants10010078)
- [3] YOUNGAE J., MIYOUNG H. a JUEUN L. *Metabolite Profiling of the Response of Burdock Roots to Copper Stress. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, **63**(4), 1309–1317. Dostupné z: [doi: 10.1021/jf503193c](https://doi.org/10.1021/jf503193c)
- [4] CHEN FA., WU AB., CHEN CY. *The influence of different treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active compounds. Food Chemistry*, 2004, **86**, 479–484. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodchem.2003.09.020](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.020)
- [5] FERRACANE R., GRAZIANI G., GALLO M., a kol. *Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (Arctium lappa) seeds, roots and leaves [online] Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, **51**(2), 399–404. Dostupné z: [doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.018](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.018)
- [6] PETKOVA N., HAMBARLYISKA I., TUMBARSKI Y. a kol. *Phytochemical composition and antimicrobial properties of burdock (Arctium lappa L.) roots extracts. Biointerface Research in Applied Chemistry*, 2022, **12**(3), 2826–2842. Dostupné z: [doi.org/10.33263/BRIAC123.28262842](https://doi.org/10.33263/BRIAC123.28262842)
- [7] NABESHIMA E.H., MORO Th.M.A., CAMPELO P.H. a kol. *Tubers and roots as a source of prebiotic fibers. In Advances in Food and Nutrition Research*, 2020, **94**, 267–293, Dostupné z: [doi.org/10.1016/bs.afnr.2020.06.005](https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2020.06.005).
- [8] LEE S., MOON H.K., KIM I.D., a kol. *Physicochemical characteristics of different parts of burdock. (Arctium sp.). Current Research on Agriculture and Life Science*, 2014, **32**, 75–78, Dostupné z: <http://www.koreascience.or.kr/article/JAKO201424566319422.pdf>.
- [9] CHAN Y.S., CHENG L.N., WU J. H. a kol. *A review of the pharmacological effects of Arctium lappa (burdock). Inflammopharmacology*, 2011, **19**, 245–254, Dostupné z: [doi.org/10.1007/s10787-010-0062-4](https://doi.org/10.1007/s10787-010-0062-4).

- [10] ZHANG X., HERRERA-BALANDRANO D.D., HUANG a kol. Comparison of nutritional and nutraceutical properties of burdock roots cultivated in Fengxian and Peixian of China. *Foods*, 2021, **10**, 2095. Dostupné z: [doi.org/10.3390/foods10092095](https://doi.org/10.3390/foods10092095)
- [11] KAUR N. and GUPTA A K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, 2002, **27**, 703–714. Dostupné z: [doi:10.1007/BF02708379](https://doi.org/10.1007/BF02708379)
- [12] KOSASIH W., PUDJIRAHARTI S., RATNANINGRUM D., a kol. Preparation of Inulin from Dahlia Tubers. *Procedia Chemistry*, 2015, **16**, 190–194 Dostupné z: [doi:10.1016/j.proche.2015.12.035](https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.035)
- [13] SHOAIB M., SHEHZAD A. a OMAR M. ad. Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydrate Polymers*, 2016, **147**, 444–454. Dostupné z: [doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.020](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.020)
- [14] LOGINOVA K.V., SHYNKARYK M.V., LEBOVKA N.I. a kol. Acceleration of soluble matter extraction from chicory with pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 2010, **96**(3), 374–379. Dostupné z: [doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.009](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.009)
- [15] FERREIRA-SANTOS P., GENISHEVA Z., BOTELHO C., a kol. Valorization of natural antioxidants for nutritional and health applications. In: *Antioxidants – Benefits, Sources, Mechanisms of Action*. Waisundara V. (Ed.), IntechOpen 2021. Dostupné z: [doi.org/10.5772/intechopen.96111](https://doi.org/10.5772/intechopen.96111)
- [16] SIRIVIBULKOVIT K., NOUANHAVONG S., a SAMEENOI Y. Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Analytical Sciences*, 2018, **34**(7), 795–800. Dostupné z: [doi:10.2116/analsci.18P014](https://doi.org/10.2116/analsci.18P014)
- [17] VLAĐKOVÁ T., GEORGIEVA N., STANEVA A., a kol. Recent advances in antioxidant active substances from marine biota. *Antioxidants*, 2022, **11**, 439. Dostupné z: [doi.org/10.3390/antiox11030439](https://doi.org/10.3390/antiox11030439)
- [18] PAULOVÁ H., BOCHOŘÁKOVÁ H., TÁBORSKÁ E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*, 2004, **98**(4), 174–179. ISSN 0009-2770. Dostupné z: [https://lcms.cz/labrulez-bucket-strapih3hsga3/2004\\_04\\_03\\_2c70a53f2f/2004\\_04\\_03.pdf](https://lcms.cz/labrulez-bucket-strapih3hsga3/2004_04_03_2c70a53f2f/2004_04_03.pdf)
- [19] ZHENG YH., WU MY., XU YT. a kol. Electrochemical Determination of Antioxidant activity of different bee products. *International Journal of Electrochemical Science*, 2019, **14**(4), 3663–3672. Dostupné z: [doi:10.20964/2019.04.09](https://doi.org/10.20964/2019.04.09)

- [20] FLIEGER J., FLIEGER M. The [DPPH●/DPPH-H] -HPLC-DAD Method on tracking the antioxidant activity of pure antioxidants and goutweed (*Aegopodium podagraria* L.) hydroalcoholic extracts. *Molecules*, 2020, **25**(24), 6005. Dostupné z: [doi.org/10.3390/molecules25246005](https://doi.org/10.3390/molecules25246005)
- [21] KUMAR N., GOEL N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications, *Biotechnology Reports*, 2019, **24**. Dostupné z: [doi10.1016/j.btre.2019.e00370](https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370)
- [22] KLÍŽOVÁ, L. *Fenolické kyseliny v rostlinách*. Hradec Králové, 2021. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky. Vedoucí práce Karlíčková, Jana.
- [23] Bibliografické citace. Informační centrum bezpečnosti potravin. *Polyfenoly v ovoci a zelenině*. [online]. 2022. [cit 2022-11-20]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/polyfenoly-v-ovoci-a-zelenine.aspx>
- [24] HUSAROVÁ, T. *Polyfenoly a antioxidanty u povijnice batátové (Ipomoea batatas)*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2021, 56 s. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/47361>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí práce Adámková, Anna.
- [25] PANDEY, K. B., RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2009, **2**(5), 270–278  
Dostupné z: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835915/pdf/omcl0205\\_0270.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835915/pdf/omcl0205_0270.pdf)
- [26] SAXENA M., SAXENA J., PRADHAN A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review*, 2012, **16**(2), 130–134. Dostupné z: <https://www.globalresearchonline.net/journalcontents/v16-2/28.pdf>
- [27] MARGREET R., OLTHOF P., HOLLMAN C., a kol. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition*, 2001, **131**(1), 66–71. Dostupné z: [doi.org/10.1093/jn/131.1.66](https://doi.org/10.1093/jn/131.1.66)
- [28] NAVEED M., HEJAZI V., ABBAS M. a ALIKAMBOH A. a kol. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, **97**, 67–74. Dostupné z: [doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064)

- [29] OLTHOF MR, HOLLMAN PC, KATAN MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed at human. *The Journal of Nutrition*, 2001, **131**(1), 66–71. Dostupné z: [doi.org/10.1093/jn/131.1.66](https://doi.org/10.1093/jn/131.1.66)
- [30] MICHALÍKOVÁ A. *Flavonoidy a další biologicky aktivní látky v rakytníku*. 2014. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. Vedoucí práce Hudeček, Jiří.
- [31] PIETTA P.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 2000, **63**, 1035–1042. Dostupné z: [doi.org/10.1021/np9904509](https://doi.org/10.1021/np9904509)
- [32] BALATKA Š. *Interakce střevní mikroflóry s vybranými flavonoidy*. 2019. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. Vedoucí práce Hodek, Petr.
- [33] HOFMANN P., a kol. 1965. *Jednotné metody chemického rozboru vod*. Praha, Státní nakladatelství technické literatury.
- [34] PITTER P. *Hydrochemie*. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2009. ISBN 978-80-7080-701-9. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_isbn-978-80-7080-701-9/pages-img/01.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-701-9/pages-img/01.html)
- [35] ČAMBORKOVÁ, L. *Stanovení tvrdosti vody a celkové vodivosti pitné vody*. Praha, 2015. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta, Katedra chemie a didaktiky chemie. Vedoucí práce Kučková, Štěpánka.
- [36] MURUGESAN P., VENKATESWARAN G., a SHANMUGA SELVAN V. A. Effect of water hardness and free residual chlorine on black tea brew. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 2016, **119**(11), 721–724. Dostupné z: [doi:10.5281/zenodo.1127623](https://doi.org/10.5281/zenodo.1127623)
- [37] MAHMOOD S., ALI S., QAMAR M. A., a kol. Hard water and dyeing properties: effect of pre – and post-mordanting on dyeing using *Eucalyptus globulus* and *Curcuma longa* extracts. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2017, **26**(2), 747–753. Dostupné z: [doi:10.15244/pjoes/65156](https://doi.org/10.15244/pjoes/65156).
- [38] CABRERA M., TAHER F., LLANTADA A. a kol. Effect of water hardness on catechin and caffeine content in green tea infusions. *Molecules*, 2021, **26**(12), 3485. Dostupné z: [doi:10.3390/molecules26123485](https://doi.org/10.3390/molecules26123485)

- [39] MARKOVÁ, A. *Používání barev v marketingové komunikaci na základě jejich vnímání odlišnými kulturami*. Praha, 2020. 104 s. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Fakulta sociálních věd, Institut komunikačních studií a žurnalistiky. Katedra marketingové komunikace a public relations. Vedoucí diplomové práce Ing. Mgr. Jana Rosenfeldová.
- [40] JANÍK D. *Zdroje světla*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2014. 80 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Marie Havlíková, Ph.D.
- [41] DUŠEK L. *Organické pigmenty*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2004. ISBN 80-719-4635-4.
- [42] RAUNER K. *Fyzika kolem nás*. Václav Kohout1, *Nakladatelství Fraus*, s.r.o., Plzeň. Historie a elementární základy teorie barev III. Katedra matematiky, fyziky a technické výchovy Fakulty pedagogické Západočeské univerzity v Plzni ve spolupráci s ústřední komisí FO, dalšími fakultami připravujícími učitele fyziky a Českou nukleární společností pod patronací Jednoty českých matematiků a fyziků, 29. července 2013, č.2, str.40–42. ISSN 1211-1511.
- [43] CORTEZ R., LUNA-VITAL D. A., a kol. Natural pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2016, **16**(1), 180–198. Dostupné z: [doi.org/10.1111/1541-4337.12244](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12244).
- [44] SNĚHOTA P. *Prostorové rozložení jasu a barev*. Časopis Světlo, 2009, **12**(4), 46–49. ISSN 1212-0812.
- [45] ATODIRESEI G. V., SANDU I. G. Chromatic characterization in cielab system for natural dyed materials, Prior Activation in Atmospheric Plasma Type DBD. *Revista de Chimie*, 2013, **64**(2), 165–169. Dostupné z: <http://bch.ro/pdfRC/ATODIRESEI%20G.pdf%202%2013.pdf>.
- [46] MOYANO M.J., MELÉNDEZ-MARTÍNEZ A. J., ALBA J. a kol. A comprehensive study on the colour of virgin olive oils and its relationship with their chlorophylls and carotenoids indexes (II): CIELUV and CIELAB uniform colour spaces. *Food Research International*, 2008, **41**(5), 513–521. Dostupné z: [doi.org/10.1016/j.foodres.2008.03.006](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.03.006)
- [47] VISCARRA ROSSEL R.A., MINASNY B., ROUDIER P a kol. Colour space models for soil science. *Geoderma*, 2006, **133**(3-4), 320–337. Dostupné z: [doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.07.017](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.07.017)

- [48] MAHY M., VAN EYCKEN L. and OOSTERLINCK A. Evaluation of uniform color spaces developed after the adoption of CIELAB and CIELUV. *Color Research & Application*, 1994, **19**, 105–121. Dostupné z: [doi.org/10.1111/j.1520-6378.1994.tb00070.x](https://doi.org/10.1111/j.1520-6378.1994.tb00070.x)
- [49] BAŞ S., DAĞDEVIREN B. a R. GÜRKAN. Selective extraction and enrichment of 5-hydroxymethylfurfural from honey, molasses, jam and vinegar samples prior to sensitive determination by micro-volume UV-vis spectrophotometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2021, **95**, 103664. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jfca.2020.103664](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103664)
- [50] MATVEEVA I. *Změny barevnosti u pečiva z netradičních rostlinných prášků* [online]. 2021 [cit. 2022-12-27]. Dostupné z: <https://hdl.handle.net/10195/78329>. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.
- [51] KONICA M. Comparing colorimeters and spectrophotometers. [online]. 2014 [cit. 2022-12-27]. Dostupné z: <https://www.konicaminolta.com/instruments/knowledge/color/part3/01.html>
- [52] Světlo: Elektromagnetické vlnění, spektrum a fotony: Vlastnosti elektromagnetického záření a fotonů [online]. [cit. 2022-04-03]. Dostupné z: <https://cs.khanacademy.org/science/obecnachemie/xfed2aace53b0e2de:atomy-a-jejich-vlastnosti/xfed2aace53b0e2de:fotoelektronovaspektroskopie/a/light-and-the-electromagnetic-spectrum>
- [53] ZÁRUBA K. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-951-8.
- [54] MAJER J. *Analytická chemia: učebnica pre farmaceutické fakulty*. 1. vyd. Martin: Osveta [Martin], 1989. 363 s.
- [55] HOLZBECHER Z., Churáček, Jaroslav a kol., *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987. 663 s.
- [56] NĚMCOVÁ I., ČERMÁKOVÁ L., RYCHLOVSKÝ P. *Spektrometrické analytické metody I*. Nakladatelství Karolinum Praha, 2004, (2), 166 s., ISBN 80-246-0776-X
- [57] BERČÍK J. a BUSTIN D. *Fyzikálne a fyzikálno-chemické analytické metódy*. 1. vyd. Bratislava: ALFA, vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, 1977. 502 s.
- [58] FIŠEROVÁ G. *Spektrofotometr – metodika a možnosti praktického využití* [online]. Brno, 2013 [cit. 2022-12-28]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/j15yww/>. Bakalářská práce. Masaryková Univerzita, Medicinská fakulta. Vedoucí práce MUDr. Lenka Forýtková, CSc.

- [59] DUDASHVILI G. *Uv-vis spektrofotometr pro analýzu tekutin* [online]. 2020 [cit. 2022-12-28]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10467/89981>. Bakalářská práce. České vysoké učení technické v Praze. Vedoucí práce Ing. Adam Bouřa, Ph.D.
- [60] OZAKI Y. Infrared Spectroscopy-Mid-infrared, Near-infrared, and Far-infrared/Terahertz Spectroscopy. *Analytical Sciences* [online]. 2021, **37**, 1193–1212, [cit. 2023-02-09]. Dostupné z: doi:10.2116/analsci.20R008
- [61] DVOŘÁK L., ŠUSTOVÁ K., & MLČEK J. Blízká infračervená spektroskopie jako pomocník při kontrole kvality potravin. *Chemické Listy*, 2016, **110**(12), 868–873. Dostupné z: <http://ww-w.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/121>
- [62] LESTER D., HILL G., DOPPMANN G. et al. CoolSpec: A Near-Infrared Long-Slit Spectrometer for McDonald Observatory, *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*, 2000, **112**(769), 384. Dostupné z: doi:10.1086/316542
- [63] KOŠTÁL P. *Aplikace infračervené spektroskopie v elektrotechnice* [online]. Plzeň, 2012 [cit. 2023-02-06]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/os4aa8/>. Diplomová práce. Západočeská univerzita v Plzni, Fakulta elektrotechnická. Vedoucí práce Ing. Pavel Prosr, Ph.D.
- [64] ALTHOBAITI M a AL-NAIB I. Recent developments in instrumentation of functional near-infrared spectroscopy systems. *Applied Sciences-Basel*, 2020, **10**, 6522. Dostupné z: doi:10.3390/app10186522
- [65] WANG X., LIU W., XIONG S. a kol. Near-infrared spectroscopy for food quality evaluation. In *Evaluation Technologies for Food Quality* [online]. Elsevier, 2019, 105–118, [cit. 2023-02-09]. ISBN 9780128142172. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814217-2.00007-X
- [66] VAVŘINOVÁ D. a MATĚJKA P. Možnosti využití technik povrchem zesílené vibrační spektroskopie při analýze přípravku *Chamomilla vulgaris*. *Chemické Listy*, 2013, **107**, 245–249. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/750/750>
- [67] KESHAVARZI Z., BANADKOKI SB., FAIZI M. a kol. Comparison of transmission FTIR and ATR spectra for discrimination between beef and chicken meat and quantification of chicken in beef meat mixture using ATR-FTIR combined with chemometrics. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 2019, **57**(4), 1430–1438. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-019-04178-7

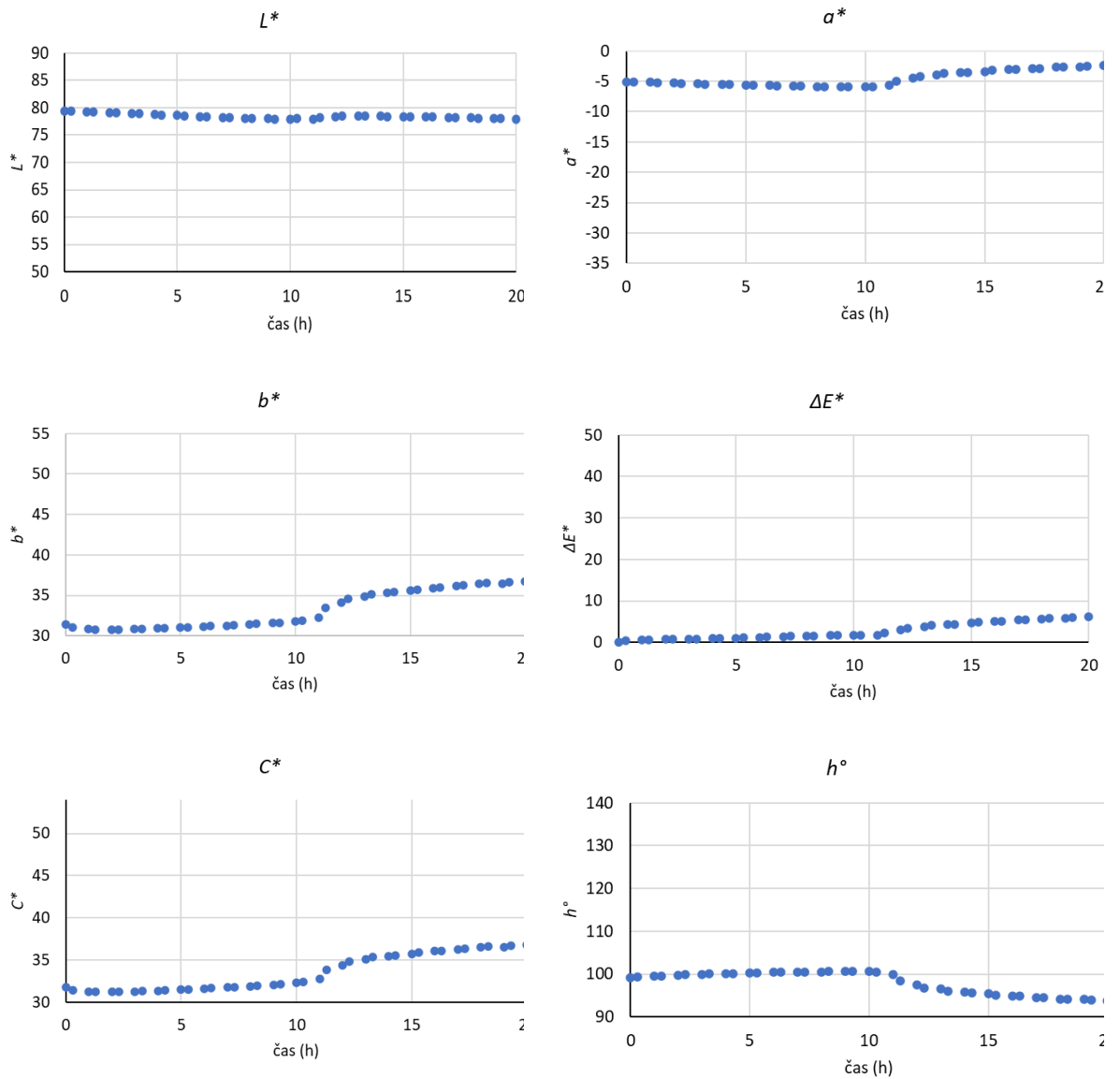


- [68] CURK M., PELEDAN F., HUBERT J.C. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, **123**(3), 241–248. Dostupné z: [doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07231.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07231.x)
- [69] LILO T., MORAIS C.L.M., ASHTON K.M., a kol. Spectrochemical differentiation of meningioma tumours based on attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical chemistry*, 2020, **412**, 1077–1086. Dostupné z: [doi.org/10.1007/s00216-019-02332-w](https://doi.org/10.1007/s00216-019-02332-w)
- [70] GULABOSKI R. The future of voltammetry. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 2022, **41**, 151–162. Dostupné z: [doi:10.20450/mjce.2022.2555](https://doi.org/10.20450/mjce.2022.2555)
- [71] BAN ZY., KATELHON E., a COMPTON RG. Voltammetry of porous layers: Staircase vs analog voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2016, **776**, 25–33. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jelechem.2016.06.003](https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.06.003)
- [72] MIRCESKI V., STOJANOV L. a GULABOSKI R. Double-sampled differential square-wave voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2020, **872**, 114384. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jelechem.2020.114384](https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114384)
- [73] QI W., WU D., XU G. a kol. Aptasensors based on stripping voltammetry. *Chemosensors*, 2016, **4**, 12. Dostupné z: [doi:10.3390/chemosensors4030012](https://doi.org/10.3390/chemosensors4030012)
- [74] GSCHWIND S., MONTES A., a kol. Comparison of sp-ICP-MS and MDG-ICP-MS for the determination of particle number concentration. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, **407**, 4035–4044. Dostupné z: [doi.org/10.1007/s00216-015-8620-7](https://doi.org/10.1007/s00216-015-8620-7)
- [75] LUYKX M.A.M. a M. VAN RUTH. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 2008, **107**(2), 897–911. Dostupné z: [doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.038](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.038)
- [76] ICP-MS Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Primer. *Agilent Technologies*. 2005, 5989-3526EN
- [77] PLUHÁČEK T., MAIER V.: Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem – analýza jediné buňky. *Chemické listy*, 2000, **114**(3), 239–243.
- [78] NOVÁKOVÁ L. a DOUŠA M. Moderní HPLC separace v teorii a praxi 1. 1. Klatovy: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3
- [79] CHURÁČEK J. a JANDERA P. Separace látek: Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie. 1. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1981. ISBN 541 183 (075 8).

- [80] PACHECO S., BORGUINI RG., SANTIAGO MCPA. A kol. History of Liquid Chromatography. *Revista Virtual de Química*, 2015, **7**(4), 1225–1271. Dostupné z: doi:10.5935/1984-6835.20150069
- [81] PIROK BWJ., GARGANO AFG. a SCHOENMAKERS PJ. Optimizing separations in online comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 2018, **41**(1), 68–98. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201700863
- [82] KOVÁČIK J., HUSÁKOVÁ L., GRAZIANI G. a kol. Nickel uptake in hydroponics and elemental profile in relation to cultivation reveal variability in three *Hypericum* species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, **185**, 357–367. Dostupné z: doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.06.009
- [83] Bibliografické citace. *Colorizer* [online]. [cit. 2023-04-25]. Dostupné z: <https://colorizer.org/>
- [84] ABDELATY M. RADALLA. Potentiometric studies on ternary complexes involving some divalent transition metal ions, gallic acid and biologically abundant aliphatic dicarboxylic acids in aqueous solutions. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 2015, **4**(2), 174–182. Dostupné z: doi.org/10.1016/j.bjbas.2015.05.012
- [85] FREŠER, F., HOSTNIK, G., TOŠOVIĆ, J. a kol. Dependence of the Fe(II)-Gallic Acid Coordination Compound Formation Constant on the pH. *Foods*, 2021, **10**, 2689. Dostupné z: doi.org/10.3390/foods10112689
- [86] NOVÁKOVÁ, J. Zinek-chelatační aktivita vybraných nových chelátorů ze skupiny 4-acylpyrazol-5-onů [online]. 2020 [cit. 2023-04-14]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/123346/150049902.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Rigorózní práce. Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.
- [87] GRUBE, M., BEKERS M., UPITE D., a kol. Infrared spectra of some fructans. *Spectroscopy* [online]. 2002, **16**(3-4), 289-296. ISSN 0712-4813. Dostupné z: doi:10.1155/2002/637587
- [88] Bibliografické citace. Potassium phosphate, dibasic. *NLST* [online]. [cit. 2023-04-14]. Dostupné z: <https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=B6000579&Mask=80>

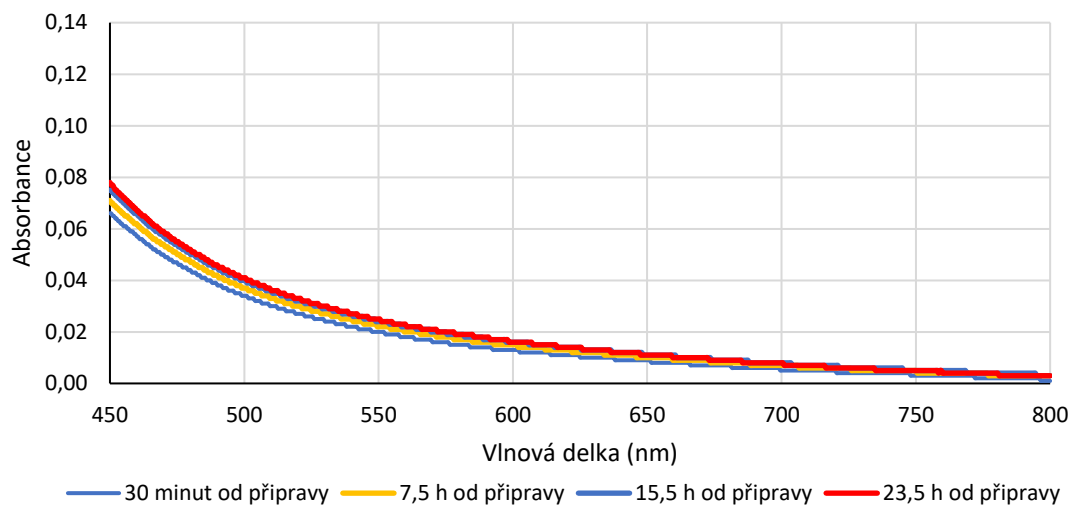
- [89] MUTHUKUMARAN B., SANTHANAM V. a PARAIMALA P. Growth and characterization of pure and magnesium sulphate doped potassium hydrogen phthalate crystals. *International Journal of Advanced Research in Science, Engineering and Technology*, 2018, **5**(6), 6200–6204. Dostupné z: [http://www.ijarset.com/upload/2018/june/27-IJARSET-\\_muthukumaran.pdf](http://www.ijarset.com/upload/2018/june/27-IJARSET-_muthukumaran.pdf)
- [90] TANG YX., LOU ZX., RAHMAN MRT. a kol. Chemical composition and anti-biofilm activity of burdock (*Arctium lappa* L. *Asteraceae*) leaf fractions against *Staphylococcus aureus*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2014, **13**(11), 1933–1939. Dostupné z: [doi.10.4314/tjpr.v13i11.23](https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i11.23)
- [91] LOU ZX., TANG YX., SONG XY. a kol. Metabolomics-based screening of biofilm-inhibitory compounds against *Pseudomonas aeruginosa* from burdock leaf. *Molecules*, 2015, **20**(9), 16266–16277. Dostupné z: [doi.10.3390/molecules200916266](https://doi.org/10.3390/molecules200916266)
- [92] SHII T., SHIMIZU T., IMAI M. a kol. Arctigenin-enriched burdock seed oil (ABS0): A new skin brightening botanical extract. *Cosmetics*, 2023, **10**(1), 10. Dostupné z: [doi.org/10.3390/cosmetics10010010](https://doi.org/10.3390/cosmetics10010010)

# Příloha

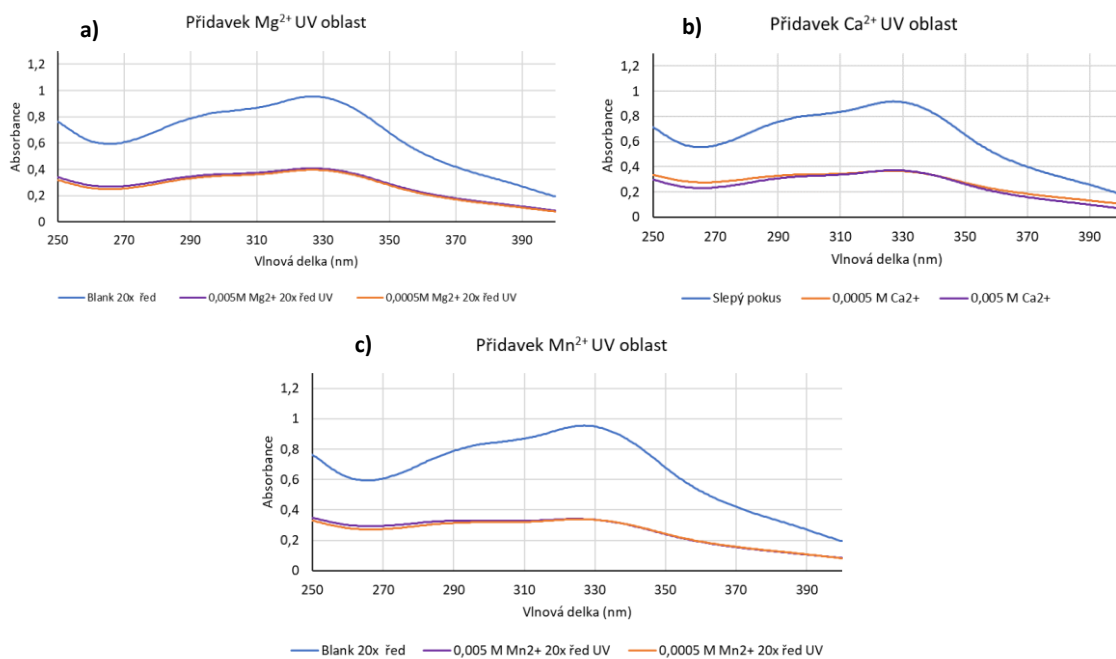


**Příloha 1** – Parametry barevnosti extraktu v Britton-Robinsonově pufru pH 8,0

### Extrakt lopuchu v destilované vodě skenování během 24 h

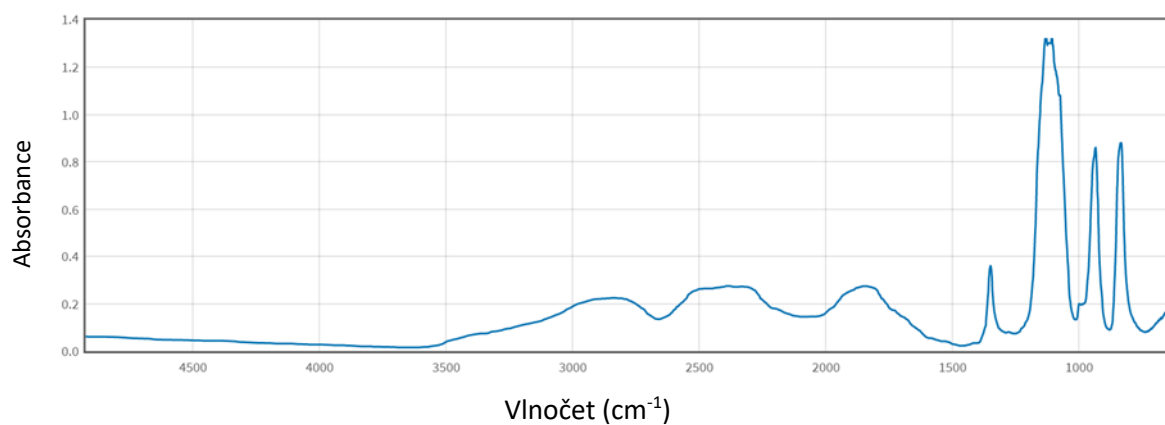


### Příloha 2 – Skenování extraktu lopuchu v destilované vodě během 24 h

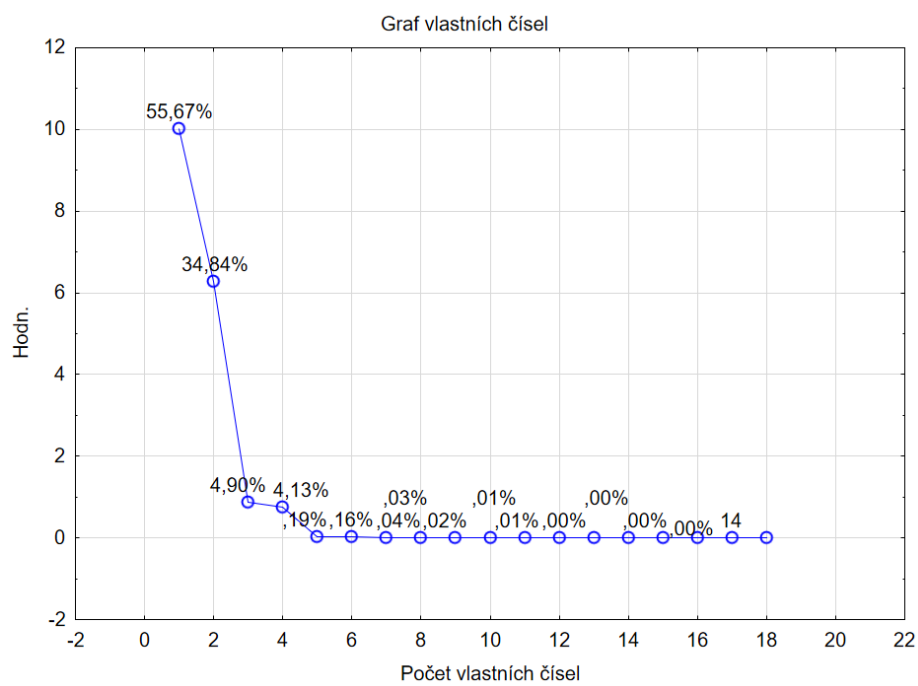


### Příloha 3 – Skenování UV oblasti extraktu lopuchu po přidavku $MgCl_2$ , $CaCl_2$ , $MnCl_2$

## Hydrogenfosforečnan draselný



**Příloha 4** – Infračervená spektra hydrogenfosforečnanů draselného [88]



**Příloha 5** – Graf vlastních čísel