

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Veronika Kadlubcová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Obsah chlorofylu v kopřivě dvoudomé a její účinky na zdraví
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika Kadlubcová**
Osobní číslo: **C21188**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Obsah chlorofylu v kopřivě dvoudomé a její účinky na zdraví**
Téma práce anglicky: **Chlorophyll Content in Stinging Nettle and its Effect on Human Health**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na fyziologické účinky kopřivy dvoudomé. Dále se věnujte obsahu chlorofylu v listech kopřivy a jeho analytickému stanovení.
2. Na základě poznatků z literatury vyberte pro experimentální část vhodnou metodu pro stanovení chlorofylu v extraktech připravených z listů kopřivy.
3. Výsledky prezentované v literatuře a experimentálně zjištěné porovnejte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem obsah chlorofylu v kopřivě dvoudomé a její účinky na zdraví 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 28. 6. 2024

Veronika Kadlubcová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D., za veškeré rady, pomoc, čas a vstřícnost při konzultacích a zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým, kteří mě podporovali po celou dobu studia a při zpracovávání práce mi byli velkou oporou.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením obsahu chlorofylu v listech kopřivy dvoudomé pomocí spektrofotometrie v UV a viditelné oblasti. V teoretické části práce se nachází informace o kopřivě, jejím výskytu, použití a účinky na zdraví. Dále je popsána fotosyntéza, fotosyntetické pigmenty (zejména chlorofyly) a analytické metody pro jejich stanovení. Experimentální část práce je zaměřená na extrakci chlorofylu z rostlinného materiálu a určení jeho obsahu v jednotlivých extraktech pomocí spektrofotometrické metody.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kopřiva dvoudomá, fotosyntéza, chlorofyl, fotosyntetické pigmenty, spektrofotometrie

TITLE

Chlorophyll content in stinging nettle and its effect on human health

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the determination of chlorophyll content in nettle leaves by spectrophotometry in the UV and visible region. The theoretical part of the thesis contains information about nettle, its occurrence, uses and health effects. Photosynthesis, photosynthetic pigments (especially chlorophylls) and analytical methods for their determination are also described. The experimental part of the work is focused on the extraction of chlorophyll from plant material and determination of its content in individual extracts by spectrophotometric method.

KEYWORDS

Stinging nettle, photosynthesis, chlorophyll, photosynthetic pigments, spectrophotometry

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD.....	12
1 TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1 Kopřiva dvoudomá	13
1.1.1 Historie.....	14
1.1.2 Výskyt.....	14
1.1.3 Obsah látek	15
1.1.4 Využití	15
1.2 Účinky kopřivy dvoudomé na zdraví.....	16
1.2.1 Antioxidační vlastnosti	16
1.2.2 Protizánětlivé vlastnosti	17
1.2.3 Hypoglykémická vlastnost.....	17
1.2.4 Protivředový účinek	18
1.2.5 Antibakteriální účinek.....	18
1.2.6 Kardiovaskulární účinek	19
1.2.7 Účinek na neurodegenerativní onemocnění.....	19
1.3 Fotosyntéza	20
1.3.1 Fotosyntetizující organismy.....	20
1.3.2 Chloroplasty	21
1.3.3 Fáze fotosyntézy	22
1.4 Chlorofyl.....	23
1.4.1 Struktura.....	23
1.4.2 Chlorofyl a	24
1.4.3 Chlorofyl b.....	25
1.4.4 Využití	25
1.5 Ostatní pigmenty	26
1.5.1 Karotenoidy	26
1.5.2 Flavonoidy	27
1.5.3 Betalainy	28
1.6 Metody stanovení obsahu chlorofylu.....	28
1.6.1 Extrakce	29
1.6.2 Tenkovrstvá chromatografie	30
1.6.3 UV/VIS Spektrofotometrie	30
1.6.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	32

1.6.5 Průtoková injekční analýza	34
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
2.1 Materiály a přístroje	36
2.1.1 Vzorky kopřivy dvoudomé	36
2.1.2 Pomůcky	36
2.1.3 Chemikálie	36
2.1.4 Přístroje	36
2.2 Příprava vzorků kopřivy	37
2.2.1 Příprava vzorků čerstvé kopřivy	37
2.2.2 Příprava vzorků sušené kopřivy	37
2.2.3 Příprava vzorků lyofilizované kopřivy	37
3 VÝSLEDKY	38
3.1 Spektrofotometrické stanovení obsahu chlorofylu	38
3.2 Výpočet koncentrace chlorofylu	38
ZÁVĚR	41
POUŽITÁ LITERATURA	42

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Kopřiva dvoudomá.....	13
Obrázek 2: List kopřivy dvoudomé	14
Obrázek 3: Trichomy	16
Obrázek 4: Průběh fotosyntézy	20
Obrázek 5: Popis chloroplastu	21
Obrázek 6: Primární fáze fotosyntézy	22
Obrázek 7: Calvinův cyklus.....	23
Obrázek 8: Struktura chlorofylu	24
Obrázek 9: Absorpční spektrum chlorofylů.....	24
Obrázek 10: Struktura β -karotenu	27
Obrázek 11: Základní schéma spektrofotometru	31
Obrázek 12: Schéma kapalinové chromatografie	33
Obrázek 13: Základní schéma zapojení průtokové injekční analýzy	34
Obrázek 14: Absorpční spektrum vzorků kopřivy dvoudomé.....	38
Tabulka 1: Koncentrace chlorofylu ve vzorcích kopřivy	39

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

MPTP – 1-methyl-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin

ATP – adenosin trifosfát

ADP – adenosin difosfát

NADPH – nikotinamidadenin dinukleotid fosfát

LHC – světlosběrný komplex

CHL – chlorofyl

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UV – ultrafialové záření

VIS – viditelné záření

FIA – průtoková injekční analýza

ÚVOD

Kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*) je rostlina, která je hojně rozšířena po celém světě a tradičně se využívá v lidovém léčitelství. Díky svému bohatému obsahu bioaktivních látek, včetně chlorofylu, vitamínů, minerálů a antioxidantů, získává stále více pozornosti jak v oblasti tradiční medicíny, tak i v moderním výzkumu.

Chlorofyl je zelený pigment, který je klíčový pro fotosyntézu – proces, kterým rostliny přeměňují sluneční energii na chemickou energii. V posledních desetiletích se chlorofyl stal předmětem intenzivního výzkumu kvůli jeho potenciálním zdravotním přínosům. Mezi tyto přínosy patří jeho antioxidační účinky, schopnost detoxikace organismu, podpora zdravého trávení, a dokonce i potenciální role v prevenci některých onemocnění.

Cílem této bakalářské práce je jednak teoretický popis rostliny a jejího využití a také experimentální stanovení obsahu chlorofylu v extraktech připravených z listů kopřivy dvoudomé. Dále byla práce zaměřena na monitorování změny obsahu chlorofylu v průběhu sušení a lyofilizace listů kopřivy.

Studie této problematiky je důležitá nejen pro lepší pochopení biologických a chemických vlastností kopřivy dvoudomé, ale také pro její potenciální využití v medicíně a výživě. Tato práce se tak pokusí přispět k rozšíření znalostí o této všestranné rostlině a jejích možnostech využití pro podporu lidského zdraví.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Kopřiva dvoudomá

Kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*) (Obrázek 1) je plevelná vytrvalá rostlina z čeledi kopřivovitých (*Urticaceae*), známá svými žahavými listy. Kopřiva je rozšířena téměř po celém světě, ale zejména v Evropě, Severní Americe, severní Africe a některých částech Asie [1].

Jedná se o vytrvalou bylinu, která často dorůstá výšky kolem 2 metrů. Rostlina se může šířit vegetativně pomocí dlouhých plazivých oddenků a často tvoří husté kolonie. Zubaté listy (Obrázek 2) jsou postaveny proti sobě podél stonku a stonky i listy jsou pokryty četnými žahavými i nežahavými trichomy. Žahavé trichomy obsahují histamin, acetylcholin a kyselinu mravenčí [1, 2].

Rostliny mohou být jednodomé nebo dvoudomé. U jednodomých nese jedinec zároveň samčí i samičí květy v závislosti na poddruhu a u dvoudomých nese pouze samičí nebo samčí květy. Drobné zelené, i bílé květy jsou v hustých trsech v paždí listů a na koncích stonků a jsou opylovány větrem. Plody jsou malé nažky a rostliny produkují velké množství semen [1, 3].



Obrázek 1: Kopřiva dvoudomá [4]



Obrázek 2: List kopřivy dvoudomé [5]

1.1.1 Historie

Latinský název *Urtica dioica* je odvozen z latinského slova *uro*, což znamená "pálit", protože její listy mohou při kontaktu vyvolat dočasný pocit pálení. Domorodí obyvatelé sbírali kopřivy od nepaměti a využívali je v léčitelství, při obřadech i jako velmi výživnou potravinu. Již staří Egypťané používali kopřivu k léčbě artritidy a bolestí dolní části zad, zatímco římsí vojáci si ji pokládali na kůži, aby se zahřáli [6, 7].

Na nalezištích z doby bronzové byla objevena vlákna z kopřivových oděvů, a dokonce i ve dvacátém století našla spředená kopřivová vlákna uplatnění v uniformách německé armády v první světové válce. V Británii se za druhé světové války používalo tmavě zelené barvivo z kopřiv pro maskování, a zároveň byl extrahován chlorofyl pro použití v lékařství. Kopřiva je stále využívána pro získávání chlorofylu jak pro účely léčebné, tak v potravinářství jako barvivo. V severoevropských zemích se z kopřivových vláken dlouho vyráběla lana, oděvy i rybářské vlasce, náhradou za len či konopí [7].

1.1.2 Výskyt

Kopřivy se vyskytují dříve na mnoha místech světa, mimo tropické oblasti. Je rozšířena především v Evropě, na východě sahá až na Sibiř a Írán. Dále roste v Jižní a Severní Americe, Africe i Austrálii. V České republice roste obecně na rumišťích, v příkopech, podél cest a plotů, v křovinách i vlhčích lesích, od nížin až do hor. Lze je snadno pěstovat na zahradě nebo v nádobách. Kopřivy se množí semeny a oddenky. Semena kopřiv si můžeme vypěstovat ze sazenic [8].

1.1.3 Obsah látek

Urtica dioica je bohatým zdrojem výživových látek, jako jsou aminokyseliny (všechny esenciální), vláknina, vitamíny (vitamín A, C, K a vitamíny skupiny B), minerály (vápník, železo, hořčík, fosfor, draslík a sodík), tuky (kyselina linolová, linolenová, palmitová, stearová a olejová), polyfenoly (kaempferol, kvercetin, kyselina kávová, kumariny a další flavonoidy), fenolové kyseliny (deriváty kyseliny hydroxybenzoové a skořicové), barviva (betakaroten, lutein, luteoxantin a další karotenoidy), organické kyseliny a mastné kyseliny [3, 9]. Bylo také zaznamenáno několik sloučenin z jiných skupin, jako jsou sacharidy (inositol, glukóza, ramnóza a sacharóza), těkavé sloučeniny (např. hexanal, linalool, karvon, kmínový aldehyd, karvakrol a fytol), cholin a indol-3-karboxaldehyd [9].

1.1.4 Využití

Sběr kopřiv se pro své léčebné účely provádí v období jara do konce května, po tomto datu prudce stoupá množství dusíkatých látek. Kořen se sbírá na podzim nebo brzo na jaře a semena ideálně v srpnu, kdy se na rostlině začínají vytvářet. Nejlepší stanoviště pro sběr je čisté slunečné prostředí daleko od silnic, továren nebo železnic [10].

Rostlina je mírně jedovatá, jed v trichomech (Obrázek 3) je tvořen směsí histaminů, kyseliny mravenčí, nervových hormonů acetylcholinu a serotoninu. Spařením vodou o teplotě 80 °C však dochází k rozkladu této jedovaté látky obsažené v žahavých chloupcích.

Kopřivy se běžně používají v kuchyni jako výživná potravina. Listy a stonky lze zpracovat do salátů, polévek nebo je lze využít jako koření. Dále je lze využít k přípravě špenátu, nádivky či pesta. Pro přípravu čaje z čerstvých kopřiv se vrchovatá čajová lžička spaří 1/4 l vody a nechá se 20 minut louhovat. Kopřivovou tinkturu připravujeme z kořene vykopaného na jaře nebo na podzim. 150 g očištěného a nadrobno nakrájeného kořene se zaleje 1000 ml 40% alkoholu a nechá se stát na teplém místě po dobu 14 dnů. Stejným způsobem lze vyrobit tinkturu z nati nebo semínek. Je to silná bylina, která není určená k dlouhodobějšímu užívání. Maximální doba užívání je 21 dní, poté je doporučeno vyměnit za jinou bylinu, která má podobné účinky [6, 10]. Výluh z kopřivy lze také využít při koupeli či jako výživové tonikum např. pro posílení vlasů. Pro budoucí použití mohou být kopřivy uchovávány zmrazením nebo usušením [7, 9].

V biologickém zahradničení mají kopřivy mnohostranné využití. Nadrobno rozmělněnou kopřivovou natí můžeme mulčovat půdu, čímž dochází jednak k zabránění vysychání půdy, ale rovněž rozkládající se listy obohacují půdu o důležitý humus. Dále

je možné z kopřiv připravit jichu, což je velmi účinný prostředek pro posílení rostlin, který je rovněž účinným biologickým postříkem při napadení mšicemi [7].



Obrázek 3:Trichomy [4]

1.2 Účinky kopřivy dvoudomé na zdraví

1.2.1 Antioxidační vlastnosti

Kopřivy byly široce studovány pro své antioxidační vlastnosti, a to díky přítomnosti flavonoidů a fenolických sloučenin [11]. Antioxidační ochranný systém chrání buňky před toxickými účinky reaktivních forem kyslíku, a tím zabraňuje peroxidaci lipidů [9, 12]. Methanolové a ethanolové extrakty kořene kopřivy vykazovaly při koncentraci 500 µg/ml antioxidační aktivitu okolo 45 %. Antioxidační aktivitu vykazují i extrakty připravené z *Urtica parviflora*, u kterých byla zaznamenána rovněž redukční aktivita [13].

Pro testování antioxidantů z různých nadzemních částí *Urtica dioica* se použila metoda DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl), kde dochází k vycytávání volných radikálů DPPH antioxidanty přítomnými ve studovaném vzorku. Jako standard byla pro test použita kyselina askorbová. Výsledek ukázal, že rostlinný extrakt vykazuje aktivitu DPPH s hodnotou IC₅₀ 88,33 ± 2,88 µg/ml, zatímco kyselina askorbová vykazovala aktivitu IC₅₀ 2,8 ± 0,62 µg/ml. Výsledek antioxidačního testu byl tedy pozitivní [9].

Pro stanovení celkové antioxidační aktivity je také možné použít metodu thiokyanatanu železitého, kterou se měří množství peroxidu vznikajícího v počátečních fázích oxidace, a který je primárním produktem oxidace lipidů [12]. Ke stanovení antioxidačních vlastností methanolového extraktu listů kopřivy byl jako standard použit α-tokoferol. Při koncentraci

250 µg/ml byla inhibice peroxidace kyseliny linolové extraktem porovnána s inhibicí standardu. Z výsledku bylo jasně patrné, že extrakt z kopřivy vykazoval vyšší inhibici peroxidace (62,34 %), oproti použitému standardu (34,41 %) [9]. Porovnáním antioxidační aktivity různých částí kopřivy bylo zjištěno, že 100 µg/ml hydroalkoholových extraktů semen, kořenů, květu a listů vykazovalo velmi podobných hodnot inhibice peroxidace (81,7 %, 79,8 %, 78,3 % a 76,4 %, v uvedeném pořadí). Antioxidační účinky extraktů z kopřivy byly dokonce lepší, než u standardních antioxidantů jako jsou butylhydroxyanisol, butylhydroxytoluen a α-tokoferol [9].

Antioxidační potenciál kopřivy byl rovněž sledován při podávání různého množství (0,5-1,5 %) kopřivy dvoudomé brojlerovým kuřatům po dobu až 6 týdnů. Po této době došlo k výraznému zvýšení exprese antioxidačního genu katalázy a super oxid dismutázy1 v játrech a plicích těchto kuřat, a navíc došlo k významnému potlačení peroxidace lipidů [9].

1.2.2 Protizánětlivé vlastnosti

Rostlinné léčivé přípravky vykazují protizánětlivou aktivitu tím, že se zaměřují na různé buněčné signální dráhy nebo endogenní enzymy, které hrají klíčovou roli při zánětu. Extrakty z kopřivy dvoudomé se zaměřují na zánětlivé kaskády podobné cyklooxygenáze, čímž inhibují zánětlivé prostaglandiny a tryptázu žírných buněk a zabraňují degranulaci [9, 14].

Srovnání protizánětlivých účinků extraktů připravených z různých částí rostliny za použití různých rozpouštědel (voda, methanol, hexan či dichlormethan) ukázalo, že extrakty připravené pomocí dichlormethanu měli silnější protizánětlivou aktivitu v lipopolysacharidem stimulované buněčné linii myších makrofágů než extrakty připravené za využití ostatních rozpouštědel [9, 15].

1.2.3 Hypoglykémická vlastnost

Diabetes mellitus vzniká, když v těle není správně regulována hladina glukózy v krvi, což je doprovázeno zvýšením triglyceridů a snížením HDL cholesterolu v krevním séru. Je charakterizován hyperglykemií s příznaky polyurie, polyfagie a polydipsie [16]. Kopřivový extrakt podávaný potkanům s inzulinovou rezistencí po dobu 2 týdnů v dávkách 50, 100 a 200 mg/kg/den snižoval hladinu glukózy, cholesterolu LDL, leptinu a indexu inzulinové rezistence nalačno, a to v závislosti na dávce [17].

Další studie léčby hydroalkoholovým extraktem z listů kopřivy ukázala, že injekční podávání extraktu z kopřivy diabetickým potkanům (100 mg/kg/den), významně snižuje koncentraci glukózy v krvi ($454,7 \pm 34,5$ u diabetického potkana vs. $303,6 \pm 100,6$ u skupiny léčené extraktem) [9, 17].

Podle *in vitro* studie Ranjbariho a kol. [18] vodný extrakt z listů kopřivy výrazně indukoval sekreci inzulinu v buňkách beta pankreatu a rovněž byl schopen stimulovat vychytávání glukózy myotububami, čímž prokázal silnou prospěšnou aktivitu *in vitro* [9, 18].

1.2.4 Protivředový účinek

Účinky kopřivy na vředy vyvolané intraperitoneálním podáním etanolu byly zkoumány Gulčín a kol. [19] u potkanů, kterým bylo podáno 50, 100 a 200 mg/kg vodného kopřivového extraktu a tyto extrakty vykazovaly 67,7; 61,1 a 77,8 % snížení poškození žaludeční sliznice. Jako referenční léčivo byl pro srovnání použit famotidin (20 mg/kg), u kterého došlo ke snížení poškození žaludeční sliznice pouze ze 34,4 %. Výsledky tedy jasně ukázaly vyšší účinek extraktu z kopřivy proti vředovému onemocnění ve srovnání s referenčním léčivem [9].

Burkova a kol. [20], zkoumali vliv velikosti rozdrčených fragmentů (mm až nm) listů kopřivy na schopnost chránit žaludeční sliznici před vředy vyvolané imobilizovaným stresem, prednisolonem, kyselinou acetylsalicylovou a histaminem. Byl porovnán ochranný účinek výtažků mechanicky rozdrčených fragmentů kopřivy s účinky rakytníkového oleje ve srovnání se stavem bez léčby. Výsledky ukázaly, že fragment o velikosti 40-70 nm chrání žaludeční sliznici lépe než větší 1 mm fragment. Protivředová aktivita fragmentů o velikosti 40-70 nm byla podobná jako při účinku rakytníkového oleje. Výtažky z kopřivy také inhibovaly nadměrnou sekreci kyseliny a snižovaly kyselost žaludeční šťávy [9, 20].

1.2.5 Antibakteriální účinek

Antibakteriální aktivita kopřivového ethylacetátového extraktu byla sledována u několika typů bakterií, kterými byly *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* a *Aeromonas hydrophila* [9]. U této studie podle Ghaima a kol. [21] byla použita jamková difuzní metoda s využitím Muellerova-Hintonova agaru. Pro měření inhibiční zóny se zavedl extrakt (10 mg/ml) spolu s referenčním standardem (30 µg/ml), kterým byl cefalothin. Bylo prokázáno, že ethylacetátový extrakt byl účinný proti všem testovaným bakteriím. Inhibiční zóna extraktu proti *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* a *Staphylococcus aureus* byla 14, 24, 10, 22 a 20 mm, u cefalothinu byla zjištěna zóna 20, 22, 20, 18 a 24 mm [19, 21].

Ačkoli *Staphylococcus aureus* způsobuje širokou škálu lidských onemocnění, včetně infekcí kůže a měkkých tkání byl dle studie Kima kol. [22] proveden screening antibakteriálního účinku polyfenolů identifikovaných v extraktech z kopřivy a levandule na izoláty MMSA a MRSA z diabetických vředů a nohou. Je dobře známo, že vysoké množství bakterií může zpozdit nebo případně zabránit hojení ran a ztížit chirurgické uzavření

diabetických vředů, což může v konečném důsledku vést k amputaci. Ačkoli by polyfenolové sloučeniny mohly být řešením problémů s multirezistencí, je třeba lépe pochopit a dále objasnit mechanismus jejich účinku [21].

1.2.6 Kardiovaskulární účinek

Testai a kol. [23] provedli *in-vivo* studii hypotenzní aktivity kopřivy dvoudomé v různých dávkách u potkanů. Intravenózním podáním extraktu (0,1 mg/kg) anestetizovaným potkanům se podařilo snížit hodnotu středního arteriálního tlaku z hodnoty $96,5 \pm 0,5$ mmHg na $79,5 \pm 0,5$ mmHg. Při podání 10x koncentrovanějšího extraktu (1 mg/kg) došlo ke snížení na $65,5 \pm 5,5$ mmHg a u extraktu 10 mg/kg až na $55,5 \pm 9,5$ mmHg. 2-3 minuty po dosažení hypotenzního vrcholu se střední arteriální tlak zvýšil a dosáhl původní bazální hodnoty [9].

Vědci zkoumali antihypertenzní účinek surového methanolového extraktu kopřivy dvoudomé a jeho frakcí získaných různými rozpouštědly (ethylacetát, hexan, chloroform a voda) [23]. Účinnost extraktu a frakcí byla porovnána u normotenzních a hypertenzních potkanů. Zkoumání ukázalo, že ethylacetátová frakce vykazovala u hypertenzních potkanů nejvýraznější antihypertenzní aktivitu ze všech frakcí. Tato frakce zároveň prokázala nejsilnější vazorelaxační účinek na izolovaných kroužcích králičích hrudních aort. Vazorelaxační účinnost ethylacetátové frakce byla srovnatelná s účinkem referenčního léčiva verapamilu. Tyto výsledky naznačují potenciál kopřivy dvoudomé při léčbě hypertenze [9, 23].

1.2.7 Účinek na neurodegenerativní onemocnění

Neurodegenerativní onemocnění jsou v dnešní době jednou z rostoucích hrozeb pro lidskou populaci. Mezi tato onemocnění patří Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba a další, které se vyznačují ztrátou nervosvalového spojení, poruchou paměti a celkovým systémovým neurologickým defektem [9, 24].

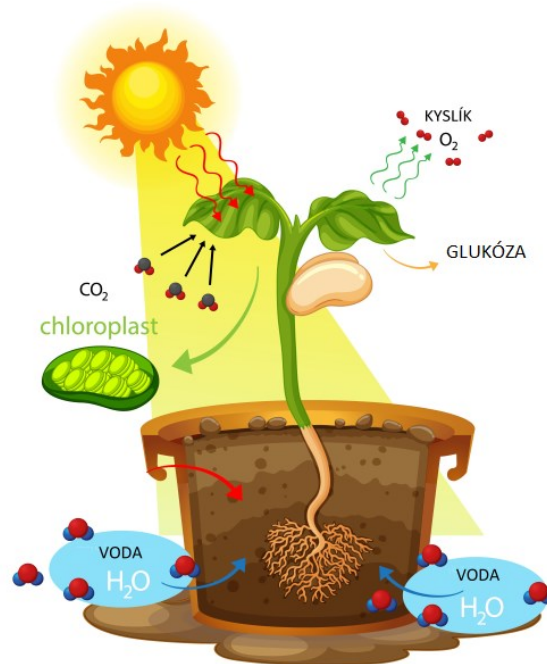
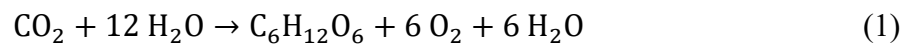
Extrakt kopřivy dvoudomé byl studován pro svůj neuroprotektivní účinek u neurodegenerativních onemocnění [25]. Studie prokázala, že extrakt bohatý na antioxidanty má ochranný vliv na mozkové buňky u myši s modelem Parkinsonovy choroby vyvolaným MPTP. Ve dnech 1, 7 a 14 bylo MPTP podáváno injekčně přímo do mozku do oblasti zvané nigrostriatální dráha, která je u Parkinsonovy choroby silně postižena. Podávání MPTP vedlo k vyčerpání dopaminu a jeho metabolitu, což jsou důležité neurotransmitery v mozku. Zároveň způsobilo změny v chování a snížení počtu dopaminergních buněk, které samy dopamin produkují. Extrakt z kopřivy dvoudomé byl podáván myším po dobu 14 dnů v dávkách 20, 40 a 80 mg/kg rozpuštěním ve sterilní vodě na injekci a podáván ústy. Ve srovnání se skupinou myši, kterým byl podáván pouze MPTP zlepšil chůzi, běh lezení, lépe plnily úkoly a snížil

koncentraci dusitanů, které se hromadí v mozku u pacientů s Parkinsonovou chorobou. Dávka 80 mg/kg extraktu z kopřivy dvoudomé obnovilo hladinu dopaminu a jeho metabolitu a posílilo neuroprotektivní účinek minocyklinu, který se při léčbě používá. Kromě toho také snížil hladinu prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 β) a obnovil hladinu glutathionu a katalázy které chrání mozkové buňky před poškozením [9, 26].

1.3 Fotosyntéza

Fotosyntéza (z řeckého fós, fótos "světlo" a synthesis "shrnutí", "skládání") je biochemický proces, při kterém zelené rostliny a některé další organismy přeměňují světelnou energii na energii chemickou. Hlavním zdrojem energie pro fotosyntézu je sluneční záření, které se dělí na ultrafialové, viditelné a infračervené záření [1, 27].

Během fotosyntézy (Obrázek 4) zelené rostliny pohlcují světelnou energii a přeměňují vodu a oxid uhličitý na glukózu, přičemž uvolňují kyslík (rovnice 1). Základ fotosyntetického procesu spočívá ve štěpení vody světlem, uvolňování kyslíku do atmosféry a využívání vodíku k redukci oxidu uhličitého na cukry a další složitější organické molekuly [1].



Obrázek 4: Průběh fotosyntézy [30]

1.3.1 Fotosyntetizující organismy

Fotosyntézu provádějí eukaryotické i prokaryotické organismy, které obsahují pigmenty absorbující světelnou energii. Nejznámějšími jsou zelené rostliny obsahující chlorofyl. Druhou významnou skupinou eukaryotických fotosyntetizujících organismů jsou řasy, včetně

mikroskopických diatomů. Mezi fotosyntetizující prokaryota patří sinice a některé sirmé bakterie [1].

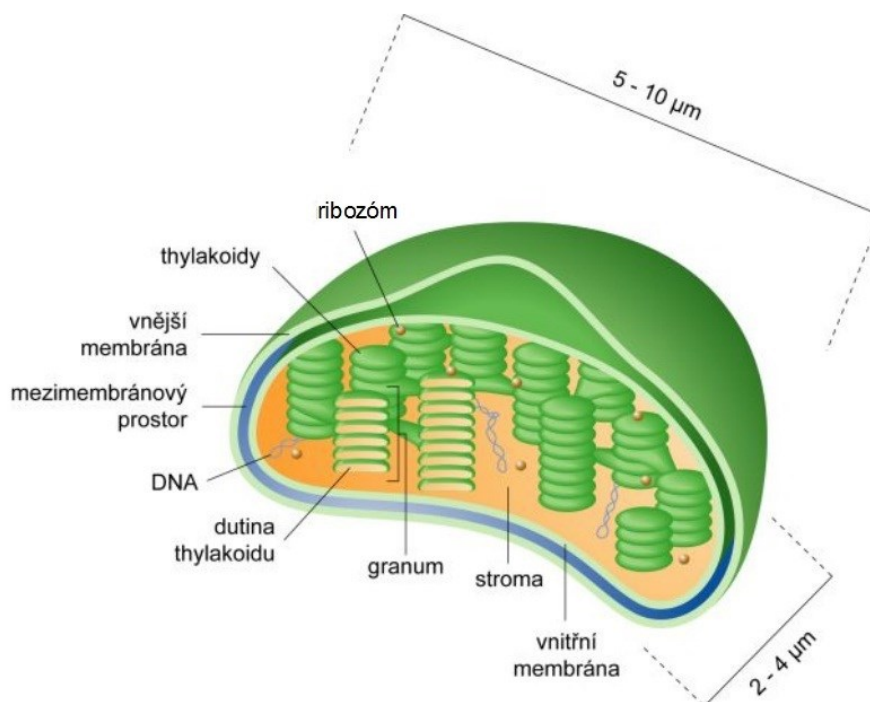
Chlorofyl, základní pigment při fotosyntéze, odráží zelené světlo a pohlcuje červené a modré světlo. Kromě chlorofylu existují další pigmenty (červené, hnědé a modré), které pomáhají při absorpci světelné energie a chrání buňky před poškozením [1, 28, 29].

1.3.2 Chloroplasty

Chloroplasty jsou plastidy oválného nebo diskovitého tvaru, které se podílejí na syntéze a skladování potravin. Jsou charakteristické svou zelenou barvou díky přítomnosti chlorofylu a a chlorofylu b [31]. V chloroplastech jsou také karotenoidy, které zachycují sluneční energii a předávají ji chlorofylu. U rostlin se chloroplasty nacházejí zejména v parenchymatických buňkách mezofylu listů [31, 32].

Chloroplasty (Obrázek 5) mají průměr 5-10 μm a tloušťku 2-4 μm . Jsou obaleny dvojitou membránou s mezimembránovým prostorem. Uvnitř se nachází třetí, tylakoidní membrána, tvořená uzavřenými disky zvanými tylakoidy, které jsou uspořádány do hromádek (grana). Grana jsou spojena stromálními lamelami, které vedou přes stroma, kde se nachází enzymy, škrobová zrna a chloroplastový genom [1, 31, 32].

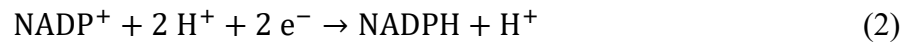
Tylakoidní membrána obsahuje chlorofyly a proteinové komplexy, jako fotosystém I, fotosystém II a ATP syntázu. Sluneční světlo excituje chlorofylové pigmenty v tylakoidech, což vede k produkci ATP a NADPH přes elektronový transportní řetězec [1, 28].



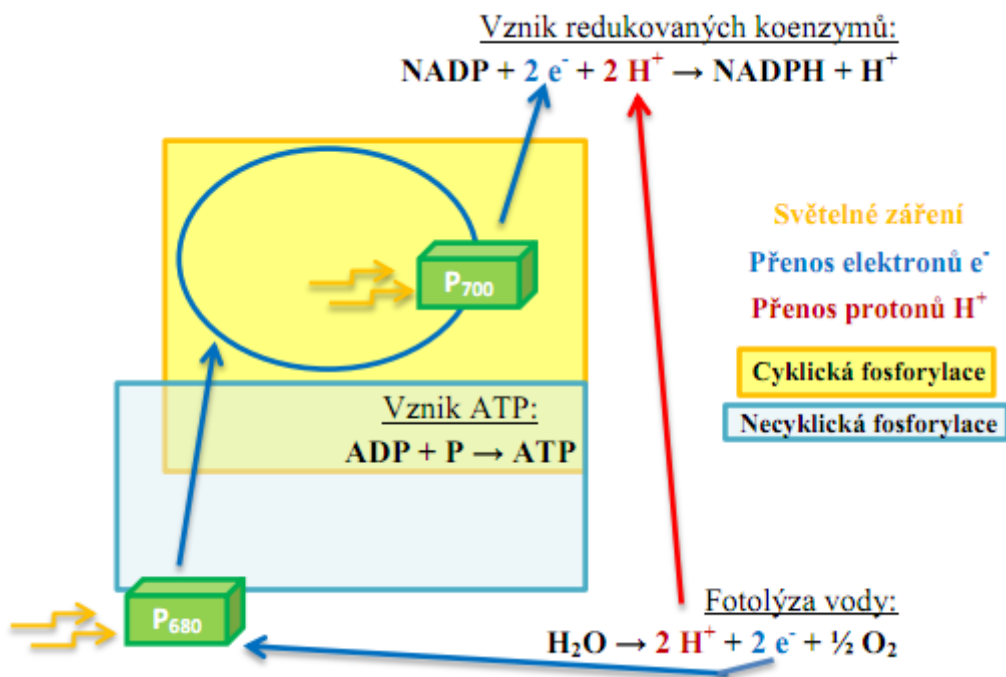
Obrázek 5: Popis chloroplastu [33]

1.3.3 Fáze fotosyntézy

Světelná fáze, která je prvním krokem fotosyntézy (Obrázek 6), probíhá během dne v tylakoidech chloroplastů, kde se absorbuje a přeměňuje světelná energie. Fotosystémy I a II, založené na chlorofylu a, se účastní přenosu elektronů, fotolýzy vody a syntézy ATP. Fotosystém I excituje chlorofyl P700 a uvolňuje elektrony, které redukují koenzym NADP na NADPH (rovnice 2) a dochází k cyklické fosforylaci a vzniku ATP (rovnice 3).

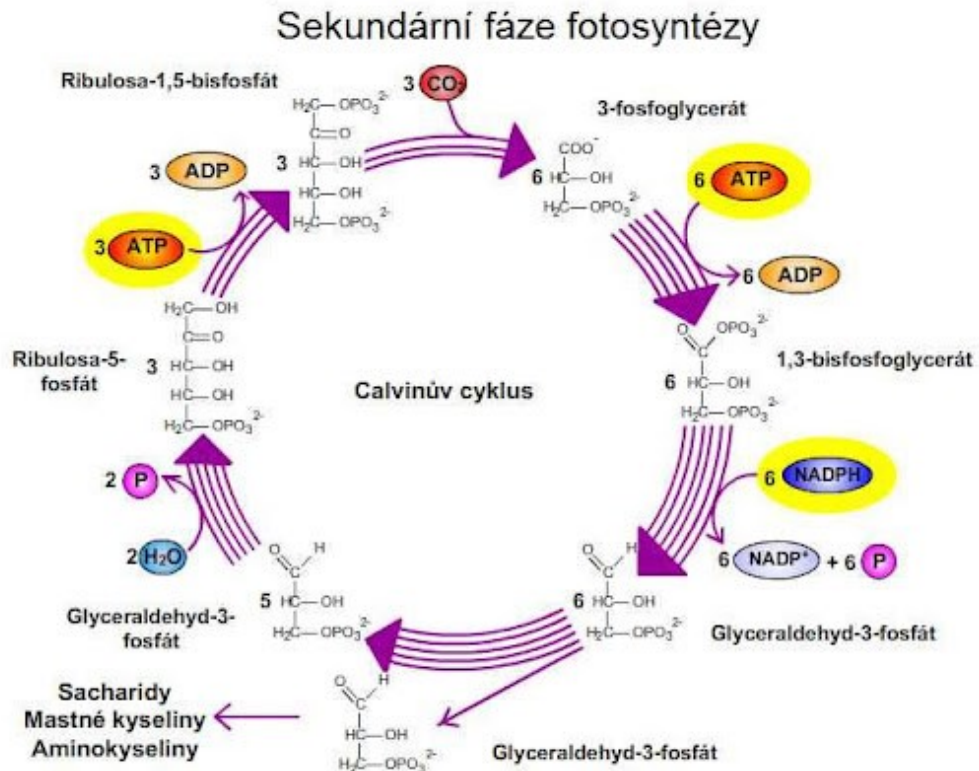


Fotosystém II excituje chlorofyl P680 a uvolněné elektrony jsou transportovány do fotosystému I, čímž se nahrazují chybějící elektrony [27, 34]. Světelný rozklad neboli fotolýza vody je způsobena elektronovým deficitem u chlorofylu a P680. Dochází při ní k rozpadu molekuly vody a tím vznikají elektrony, protony a molekula kyslíku (rovnice 4) [34].



Obrázek 6: Primární fáze fotosyntézy [34]

Sekundární, temnostní fáze fotosyntézy probíhá ve stromatu chloroplastů, kde oxid uhličitý je redukován na glukózu pomocí NADPH a ATP z primární fáze. Calvinův cyklus (Obrázek 7) zahrnuje enzym rubisco, který katalyzuje přeměnu oxidu uhličitého na D-3-fosfoglycerát, následně fosforylovaný a redukován na glyceraldehyd-3-fosfát. Glukóza vzniká spojením glyceraldehyd-3-fosfátů a přeměnou na glukózu-6-fosfát. [27, 34].



Obrázek 7: Calvinův cyklus [34]

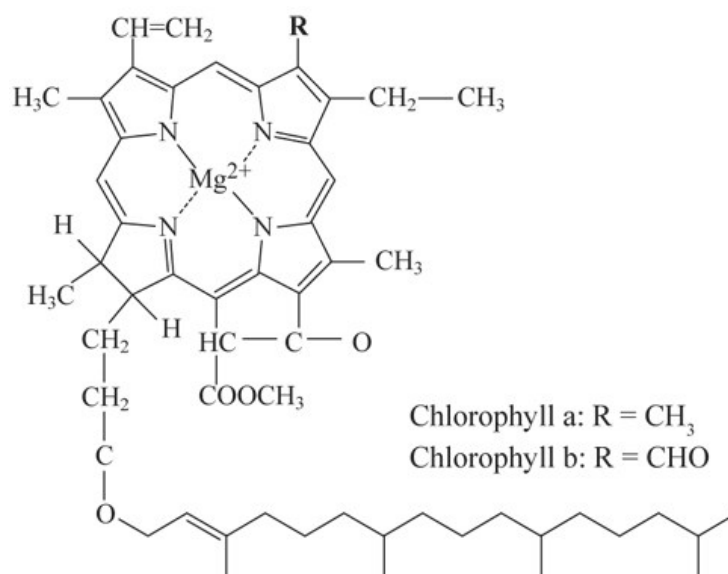
1.4 Chlorofyl

Název chlorofyl vznikl spojením řeckých slov *chloros* "zelený" a *phyllon* "list". Chlorofyl je jedním z nejdůležitějších pigmentů v přírodě a vyskytuje se prakticky ve všech fotosyntetizujících organismech, včetně zelených rostlin, řas a sinic. Jak již bylo popsáno, podílí se na fotosyntéze, při níž se světelná energie přeměňuje na energii chemickou a vznikají složitější chemické sloučeniny [1, 35].

U zelených rostlin se chlorofyl vyskytuje v thylakoidech chloroplastu a tvoří několik různých forem. Hlavní typy se vyskytují u zelených řas a vyšších rostlin (chlorofyl a a b). Chlorofyl c a d se často společně s chlorofylem a nachází u dalších různých druhů řas. Vzácným typem, vyskytujícím se u některých zlatých řas je chlorofyl e a bakteriochlorofyl nacházející se u bakterií [1, 36].

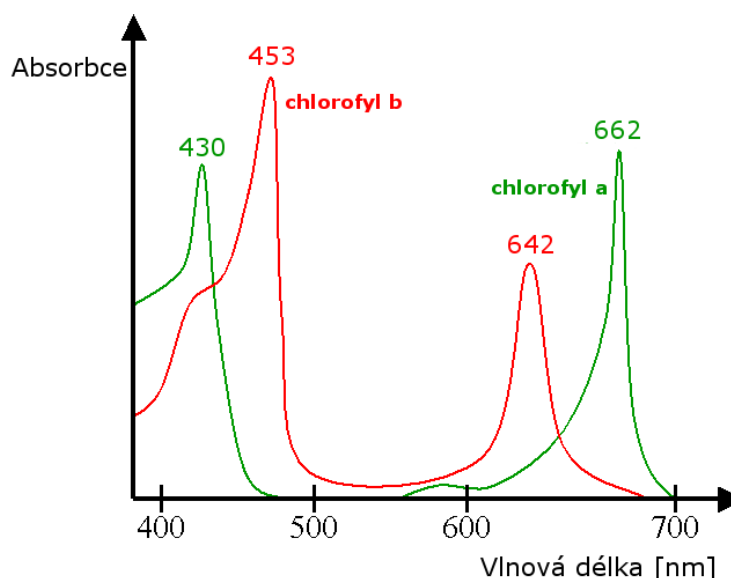
1.4.1 Struktura

Základní strukturou molekuly chlorofylu je porfyrinový kruh, koordinovaný s centrálním atomem. Ten je svou strukturou velmi podobný prostetické skupině hemu, nacházející se v molekule hemoglobinu, s tím rozdílem, že v hemu je centrálním atomem železo, zatímco u chlorofylu je to hořčík [36, 37].



Obrázek 8: Struktura chlorofylu [38]

Chlorofyly a a b se od sebe liší jen nepatrně ve složení postranního řetězce (Obrázek 8). Chlorofyl a obsahuje methylovou skupinu, zatímco chlorofyl b má v postranním řetězci aldehydovou skupinu. Oba tyto hlavní typy chlorofylu jsou velmi účinnými fotoreceptory, obsahující síť střídajících se jednoduchých a dvojných vazeb. Orbitály se tak mohou delokalizovat a stabilizovat strukturu. Takto delokalizované polyeny mají velmi silné absorpční pásy ve viditelné oblasti spektra, což rostlině umožňuje absorbovat energii ze slunečního záření [36].



Obrázek 9: Absorpční spektrum chlorofylů [39]

1.4.2 Chlorofyl a

Chlorofyl a se vyznačuje modrozelenou barvou. Je klíčovým pigmentem pro fotosyntézu u rostlin a dalších fotosyntetických organismů. Jeho absorpční maxima jsou

ve 430 nm a 662 nm [40] (Obrázek 9). Zářením odráží v zelené oblasti spektra, a proto se pigment jeví jako zelený. Rozpouští se v tucích a jiných organických rozpouštědlech. Na porfyrinový cyklus je navázán zbytek fytolu a díky tomuto hydrofobnímu konci je chlorofyl nerozpustný ve vodě [41, 42].

Po absorpci světelné energie dochází v chlorofylu a k přechodu elektronu do excitovaného stavu. Excitovaný elektron se snáze uvolní a přenesení na jinou molekulu. Tím se spouští série kroků přenosu elektronů, která končí redukcí oxidu uhličitého [35, 41, 42].

1.4.3 Chlorofyl b

Chlorofyl b je méně významný než chlorofyl a, ale v procesu fotosyntézy hraje nezastupitelnou roli a doplňuje funkce chlorofylu a. Spolu s chlorofylem a hraje klíčovou roli ve schopnosti rostliny přizpůsobit se různé intenzitě světla. Strukturně se chlorofyl b liší navázanou formylovou skupinou na sedmém uhlíku, kdežto chlorofyl a zde má methylovou skupinu. Tato změna má za následek odlišné vlastnosti. Chlorofyl b se rozkládá na feofytin b pomocí enzymu chlorofylázy. To způsobuje změnu jeho barvy ze zelené na olivově hnědou [42].

Absorbuje světlo v modré a červené oblasti spektra, jeho maxima jsou v 453 nm a 642 nm [40]. První oblast je z hlediska fotosyntézy bez většího významu, v praxi se využívá druhá oblast. Doba života excitovaného stavu je příliš krátká, a proto tuto excitaci nelze využít pro spuštění oxidačně-redukčních procesů fotosyntézy. Jeho hlavní funkcí je rozšíření absorpčního spektra fotosyntetických komplexů LHC-I a LHC-II do oblasti 650 nm, kterou není schopný chlorofyl a pokrýt. Díky chlorofylu b tak rostliny dokážou zachytit více sluneční energie a efektivněji fotosyntetizovat i za méně příznivých světelných podmínek [35, 42].

1.4.4 Využití

V současnosti je chlorofyl stále více používán v potravinářství k barvení potravin např. u dortů a nápojů nebo k ochraně barvy konzervovaného ovoce a zeleniny. K extrakci chlorofylu pro potravinářské účely se zpravidla využívají zelené řasy jako je chlorela či spirulina, přičemž spirulina je se řadí mezi rostliny obsahující velké množství chlorofylu a, dokonce 2 až 3krát vyšším než u jiných zelených rostlin. Kromě využití jako potravinářské barvivo se chlorofyl z řas používá také jako antioxidant [36]. Kromě chlorofylu řasy obsahují mnoho dalších účinných látek s antioxidantními vlastnostmi, které zhasí reaktivní formy kyslíku, a zabraňují tak vzniku některých onemocnění jako je rakovina, cukrovka či právě zmíněné různé typy zánětů [43]. Avšak porovnáním antioxidantních schopností různých bioaktivních látek

bylo zjištěno, že jedním z hlavních nositelů antioxidantních vlastností řas je právě chlorofyl [36, 41, 43].

Kromě chlorofylu lze z řas získat také jeho deriváty, jako je feofytin a různé formy chlorofylu, které mají také pozitivní účinky na zdraví. Deriváty chlorofylu extrahované z mořských řas *Grateloupia elliptica* významně inhibují akumulaci intracelulárních lipidů a mají příznivé účinky na metabolismus lipidů. Chlorofyl získaný z hnědé mořské řasy *Sargassum fulvellum* zvyšuje nervovou diferenciaci buněk a má potenciál k léčbě neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba [43]. Bylo prokázáno, že chlorofyl a jeho deriváty jsou v lidském těle degradovány, absorbovány a následně využity střevními buňkami prostřednictvím pokusů se simulovaným trávením *in vitro* [36, 43].

Díky jejich široké škále dostupnosti a vysoké koncentraci chlorofylu se stávají řasy jeho cenným zdrojem jak pro potravinářský, tak lékařský i kosmetický průmysl. V návaznosti na to vědci pokračují v optimalizaci a inovaci technik pro jeho získávání. Zároveň se stále více pracuje na vývoji metod pro pěstování řas se stále větším obsahem chlorofylu [36, 41, 43].

1.5 Ostatní pigmenty

Ostatní pigmenty v thylakoidech, jako jsou karotenoidy, flavonoidy a další typy chlorofylů, zastávají funkci pouze pomocnou. Tyto pomocné pigmenty absorbují světelné záření a přenáší zachycenou světelnou energii na chlorofyl a, aniž by došlo k emisí fotonu. Rozšiřují spektrum absorbovaného záření tím, že zachycují záření o jiných vlnových délkách. Kromě své barvicí schopnosti nabízejí tyto pigmenty potenciální zdravotní výhody. Mají zdraví podporující vlastnosti a působí proti různým lidským onemocněním, jako je rakovina, ateroskleróza, artritida a neurodegenerativní a kardiovaskulární choroby. Pigmenty mají využití i v potravinách, lécích, látkách a kosmetických přípravcích [44].

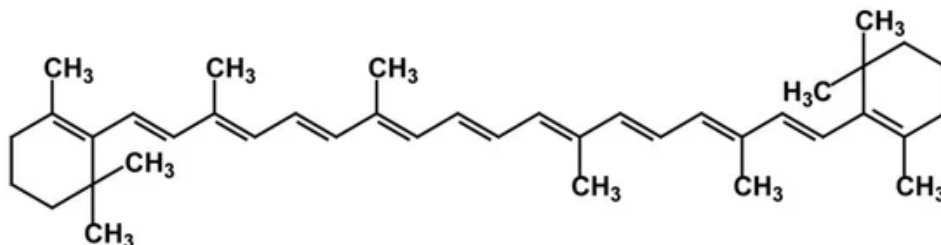
1.5.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou nejrozšířenějšími a nejstudovanějšími lipofilními pigmenty, které rostlinám dodávají žlutou, oranžovou a červenou barvu. Jsou přítomny především v rostlinách, řasách, ovoci a zelenině a také ve fotosyntetizujících bakteriích. Hrají pomocnou roli v procesu fotosyntézy tím, že absorbují světlo a přenášejí ho na chlorofyl. Tyto pigmenty mají nekovalentní vazbu s bílkoviny. V přírodě bylo nalezeno více než 850 karotenoidů, z nichž 250 pochází z řas. Barevná schopnost karotenoidů závisí na dvojných vazbách ve struktuře. Karotenoidy se dělí na dvě základní skupiny, a to na karoteny a xantofyly [43, 44].

Karotenoidní pigmenty jsou tvořeny osmi izoprenovými jednotkami. Strukturně se řadí do skupiny tetrapenů tvořených čtyřiceti uhlíkovými atomy. Absorbují záření ve žlutozelené

oblasti spektra v intervalu od 480 nm do 570 nm. Rozpouští se v nepolárních rozpouštědlech a jsou odolné vůči vnějším vlivům, jako je změna pH nebo působení redukčních činidel [44].

Buňky listů obsahují až 90 % karotenoidů, jedná se o směs karotenů a jejich produktů způsobené oxidací. β -karoten, tvoří až 70 % celkové směsi (Obrázek 10) [43, 44].



Obrázek 10: Struktura β -karotenu [45]

Do skupiny karotenoidů patří také xantofylové barvivo lutein, které charakterizuje jeho žlutooranžové zabarvení. Je obsažen v květu měsíčku lékařského, ze kterého se také získává. Má barvicí schopnost a používá se jako přísada do různých potravinářských výrobků, jako jsou cereálie, pečivo nebo také vaječné výrobky.

Je přírodním zdrojem aktivních karotenoidů a vykazuje antioxidační účinky. Má také funkci v prevenci onemocnění, jako jsou oční choroby např. šedý zákal nebo kardiovaskulární onemocnění. Kombinovaný účinek luteinu s lykopenem by mohl chránit před oxidačním poškozením [43, 44].

Protože lidské tělo nedokáže lutein syntetizovat, jeho příjem je tedy závislý na potravinách, jako je zelenina, ovoce a vaječný žloutek. Na lutein je bohatá především kukuřice, vojtěška, špenát a dýně. Nejbohatším zdrojem luteinu jsou již zmíněné okvětní lístky měsíčku lékařského. Lutein z hedvábí může rozšířit využití v lékařství [43].

1.5.2 Flavonoidy

Flavonoidy patří k nejběžnější a nejrozšířenější skupině fenolických sloučenin obsažených ve všech částech rostlin, zejména ve fotosyntetizujících rostlinných buňkách. Jsou důležitou složkou lidské i živočišné stravy. Mohou být také obsaženy v potravinách vyrobených z rostlin, které obsahují přírodní barviva a aroma. V rostlinách bylo objeveno více než 5000 flavonoidů. Rozdělují se na 10 různých skupin podle chemické struktury. Běžně jsou přítomny flavanony, flavony, isoflavony, flavany, antokyany a flavonoly [43, 44].

Nejvíce zastoupeny flavonoly, které jsou přítomny hlavně v citrusových plodech, zatímco isoflavony jsou přítomny převážně v sójových potravinách a antokyany se vyskytují hlavně v ovoci a zelenině [43].

Antokyaniny jsou skupinou flavonoidů s nejvýznamnější zbarvením, a proto mohou potravinám poskytovat jak zářivé barvy, tak zdraví prospěšné vlastnosti. Tyto sloučeniny jsou charakteristické svými oranžovými, červenými, modrými a fialovými barvami. V dnešní době je známo asi 300 druhů anthokyanů, které jsou přítomny ve všech vyšších rostlinách, avšak chybí v řasách a jiných nižších rostlinách.

Rostliny většinou obsahují antokyanidiny, mezi které patří kyanidin, malvidin, petunidin, delphinidin, pelargonidin a peonidin. Některé plody, jako jsou jablka, obsahují jeden antokyanin kyanidin, zatímco jiné plody mohou obsahovat dva nebo více antokyanů, jako například hrozny. Ty jim dodávají různé odstíny od šarlatové po modrou. Hlavními zdroji antokyanů jsou fialové hrozny, švestky, ostružiny, borůvky, červené zelí, aronie, jahody, maliny, třešně a brusinky [44].

Antokyaniny jsou rozpustné ve vodě, což přispívá k jejich využití v potravinářství. Přírodní antokyanin, jako je fykokyanin získaný ze spiruliny, je schválen jako modré barvivo pro potravinářské účely. Největší nevýhodou antokyaninů je jejich nestabilita, rychlost degradace a interakce s jinými sloučeninami. Stabilitu ovlivňují faktory jako je světlo, teplota a pH, proto se v potravinářských výrobcích stabilita udržuje nízkou teplotou a pH. [43, 44].

1.5.3 Betalainy

Betalainy jsou amonné deriváty kyseliny betalainové, které mají charakteristické žluté, růžové, červené či fialové zbarvení. Rozdělují se na dvě skupiny, červenofialové betakyaniny a žluté betaxanthiny. U vyšších rostlin je jejich výskyt omezen na řád hvozdíkotvarých (*Caryophyllales*), ale najdeme je rovněž u některých hub, jako jsou voskovka (*Hygrocybe*) a šťavnatka (*Hygrosporus*). Zdrojem pro získání betalainů je povolena pouze červená řepa [44, 45].

Fenolové a aminové skupiny dodávají těmto pigmentům redukční a stabilizační vlastnosti a činí z nich antioxidanty. Ty jsou díky své stabilitě mnohem využívanější pro používání v potravinářství než antokyaniny. Pozornost spotřebitelů si získaly díky svému použití jako potravinářské barvivo a svým antioxidačním vlastnostem, proti antivirovým a protirakovinným vlastnostem [44].

1.6 Metody stanovení obsahu chlorofylu

Koncentrace chlorofylu je jedním z nejdůležitějších parametrů, které se stanovují u rostlin pro hodnocení fyziologických procesů. Měření fotosyntetických pigmentů při výzkumu rostlin může poskytnout základní informace o jejich fyziologickém stavu. Obsah chlorofylu se může měnit v reakci nepříznivé podmínky v závislosti na okolním prostředí, jako

jsou půdní podmínky, živiny či infekce patogeny. Proto stanovení chlorofylu poskytuje důležité informace o vlivu prostředí na růst rostliny.

Nejčastěji se pro měření chlorofylu používají spektroskopické metody, které umožňují přesné, rychlé a levné určení koncentrace chlorofylu. Konvenční spektroskopické metody, při kterých se měří fotosyntetické pigmenty ve stejné květi, však mají omezení ve schopnosti měřit současně více fotosyntetických pigmentů. Je to způsobeno překrývajícími se absorpčními spektrami těchto pigmentů. Z toho důvodu se běžnější metodou pro stanovení fotosyntetických pigmentů stala vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [46, 47].

1.6.1 Extrakce

Extrakce nebo také vyluhování je jednoduchá separační metoda, pomocí které je složka směsi převáděna fázovým rozhraním z kapalně, pevně nebo plynně fáze do druhé fáze, která je kapalná nebo pevná [48].

Extrakce může být klasifikována podle fázového přechodu složky mezi různými skupenstvími. Extrakce rozpouštědlem zahrnuje rozpouštění cílové složky z pevného materiálu do vhodného rozpouštědla, zatímco ostatní složky zůstávají nerozpouštěné. Extrakce z kapaliny do kapaliny se zakládá na rozdělení složky mezi dvě nemísitelné kapaliny podle jejich rozpustnosti, což umožňuje její separaci. Extrakce z kapaliny na pevnou fázi zahrnuje selektivní adsorpci cílových složek z roztoku na pevnou fázi, přičemž může dojít i jeho zakoncentrování [46, 48].

Aby se mohly pigmenty detailně studovat, je nutné je nejprve z rostlinných materiálů izolovat, což můžeme provést právě extrakcí. Při extrakci je nejdůležitější volba rozpouštědla, do kterého přecházejí extrahované látky, se kterými se potom dále může manipulovat [46]. Pro extrakci chlorofylu se používají organická rozpouštědla, jako je aceton, propanol, methanol, ethanol, nebo také směs rozpouštědel například propanol a aceton [49]. Vhodnost dvou extrakčních rozpouštědel (methanol a aceton) byla testována spolu se čtyřmi metodami extrakce (sonikace sondou, sonikace ve vaně, rozmělnění tkáně a macerace hmoždířem a pýchovadlem). Při použití methanolu byla při extrakci účinnější sonda než ostatní extrakční metody. Methanol byl celkově lepším rozpouštědlem u všech metod kromě macerace. Metoda macerace byla stejně účinná u obou rozpouštědel, ale statisticky nižší, než bylo dosaženo u methanolu a sondy [50]. Mezi široce používaná rozpouštědla pro extrakci chlorofylu z listů vyšších rostlin patří také dimethylsulfoxid. Tato metoda je upřednostňovaná díky své časové nenáročnosti, protože není nutné mletí a odstředování. Extrakty jsou dlouhodobě stabilní, přičemž jejich stabilita je vyšší než u acetonu [51].

Výsledky studie [52] ukazují, že koncentrace chlorofylů (CHL) v získaném extraktu se zvyšuje, pokud se surovina nejprve konzervuje blanšírováním nebo sušením. Dále se výtěžnost extrakce snižuje při blanšírování a zvyšuje při sušení suroviny. Účinnost izolace chlorofylů zůstává téměř neměnná, pokud je stejná část rostliny kopřivy extrahována čerstvá nebo blanšírovaná, tj. 1,99 a 1,95 mg CHL/g kopřivy pro blanšírované a čerstvé listy kopřivy a 0,75 a 0,84 mg CHL/g kopřivy pro blanšírovanou a čerstvou celou kopřivu. Nejlepšího výsledku extrakce chlorofylů bylo dosaženo u sušených listů kopřivy, kde koncentrace chlorofylů v extraktu činila 147,1 mg CHL/g, výtěžek extrakce byl 4,50 g extraktu/100 g kopřivy a účinnost izolace chlorofylů činila 6,62 mg CHL/g kopřivy [52].

1.6.2 Tenkovrstvá chromatografie

Dnes je TLC preferovanou metodou, která se používá v praxi pro izolaci fotosyntetických pigmentů z vyšších rostlin. Chromatografie na předem potažených silikagelových deskách s použitím 70 ml uhlovodíku (hexanu bp 40-60°), 30 ml dioxanu a 10 ml 2-propanolu, jako vyvolávacího rozpouštědla vede k oddělování dvou chlorofylů a dvou polypropylénů. Chromatografická posloupnost (hodnoty R_r) je následující: β-karoten (0,85), stopa feofytinu (0,67), chlorofyl a (0,6), chlorofyl b (0,5), lutein + zeaxantin (0,4), antheraxantin (0,34), violaxantin (0,3) a neoxantin (0,2).

Extrakt by měl být aplikován na destičku v rozpouštědle bez obsahu vody. Eluce pigmentů se provádí ethanolem nebo acetonem. Je velmi vhodnou metodou také pro karotenoidy, u kterých odděluje deriváty α a β-karotenu, např. lutein a zeaxantin [40].

1.6.3 UV/VIS Spektrofotometrie

UV/VIS spektrofotometrie je analytická metoda založená na principu měření energie pohlcené vzorkem při průchodu zářením v oblasti ultrafialového (UV) a viditelného (VIS) světla (200-800 nm). Na základě absorpčního spektra, které je grafickým vyjádřením závislosti absorbance na vlnové délce, umožňuje tato metoda identifikovat a kvantifikovat látky ve vzorcích [48].

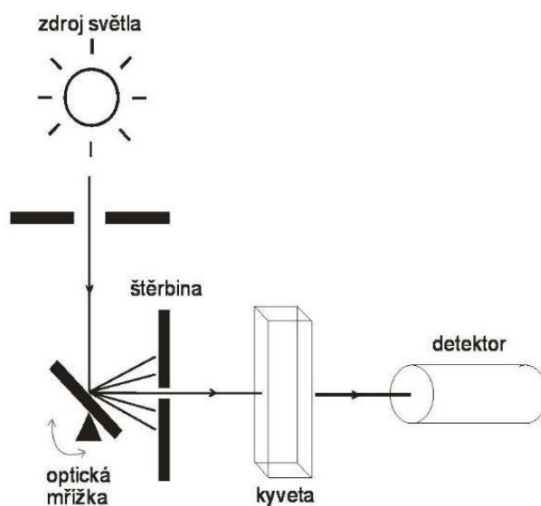
Princip spektrofotometrie spočívá v excitaci elektronového systému atomů nebo molekul v roztoku absorpcí elektromagnetického záření. Tato absorpce vede k elektronovým přechodům v molekule a projevuje se jako úbytek energie procházejícího záření. Množství absorbované energie závisí na koncentraci analytu v roztoku, délce kyvety a molárním absorpčním koeficientu, který je charakteristický pro danou látku a vlnovou délku. Tato závislost je vyjádřena Lambert-Beerovým zákonem (rovnice 5) [48, 53].

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (5)$$

kde A je absorbance, ε je molární absorpční koeficient [$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$], c je koncentrace analytu [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] a d je délka kyvety [cm].

Lambertův-Beerův zákon platí pouze pro zředěné roztoky s koncentrací analytu do $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^3$. U koncentrovanějších roztoků dochází k závislosti molárního absorpčního koeficientu na indexu lomu roztoku, čímž se ztrácí jeho nezávislost na koncentraci [48].

UV/VIS spektrofotometr se skládá z několika klíčových komponent (Obrázek 11). Základem je zdroj světla poskytující kontinuální záření ve sledované oblasti vlnových délek. V UV oblasti se používá deuteriová výbojka a ve viditelné oblasti wolframová nebo halogenová žárovka. Další důležitý prvek je monochromátor, který odděluje záření dané vlnové délky pomocí disperzního prvku jako je hranol nebo mřížka a také pomocí štěrbin. Kyvety umožňují průchod záření vzorkem a používají se skleněné a křemenné. Poslední důležitou částí je detektor, který měří intenzitu procházejícího záření. Obvykle se používá fotoelektrický detektor s digitálním záznamovým zařízením [48].



Obrázek 11: Základní schéma spektrofotometru [54]

UV/VIS spektrofotometrie nachází široké uplatnění v různých oblastech, jako je analýza léčiv, kontrola složek životního prostředí, klinická analýza a kontrola kvality technických produktů. Tato metoda je ceněna pro svou jednoduchost, dostupnost a širokou škálu aplikací [53].

Pro stanovení chlorofylů v extraktech z listů se využívá klasické spektrofotometrické stanovení vícesložkových směsí. Díky znalosti molárních absorpčních koeficientů pro chlorofyl a a chlorofyl b v různých rozpouštědlech existují také různé rovnice k výpočtu koncentrace obou typů chlorofylů, které jsem prezentovány různými autory pro různá rozpouštědla (viz přehledy Szestaka a Holdena) [40]. Nevýhodou těchto rovnic je, že hodnoty

pigmentů získané v jednom rozpouštědle nejsou srovnatelné s hodnotami v jiném rozpouštědle, což je právě způsobené různými molárními absorpčními koeficienty.

Široce používané rovnice, které uvádí Arnon [55] pro 80% aceton, jsou stále založeny na specifických absorpčních koeficientech Mackineyho [56]. Ačkoli Arnonovy rovnice lze stále používat k odhadu celkového obsahu chlorofylu a + b, nelze je nikdy použít ke stanovení poměru chlorofylu a/b pigmentového extraktu. Bylo učiněno několik pokusů o úpravu rovnic pro aceton (100 a 80 %), např. podle Vernona [57]. Přesto zůstaly rozdíly v poloze vlnové délky červeného maxima a v relativní absorpci chlorofylu a v λ_{\max} , chlorofylu b a naopak. Totéž platí pro stanovení chlorofylů v roztocích diethyletheru. Původní absorpční koeficienty Comara a Zscheileho [58] nově stanovili Smith a Benitez [59] a jejich údaje potvrdil Falk [40].

Na základě těchto koeficientů byly odvozeny následující rovnice (6-10) pro stanovení koncentrace chlorofylu a/b v μg na ml rostlinného extraktu za použití různého extrakčního rozpouštědla, tzn. hodnoty absorbance (A) byly měřeny při různých vlnových délkách [40].

Diethylether:

$$\begin{aligned}C_a &= 10,05A_{662} - 0,766A_{644} \\C_b &= 16,37A_{644} - 3,14A_{662}\end{aligned}\quad (6)$$

Methanol:

$$\begin{aligned}C_a &= 15,65A_{666} - 7,34A_{653} \\C_b &= 27,05A_{653} - 11,21A_{666}\end{aligned}\quad (7)$$

Ethanol (96%, v/v):

$$\begin{aligned}C_a &= 13,95A_{665} - 6,88A_{649} \\C_b &= 24,96A_{649} - 7,32A_{665}\end{aligned}\quad (8)$$

Aceton (80%, v/v):

$$\begin{aligned}C_a &= 12,21A_{663} - 2,81A_{646} \\C_b &= 20,13A_{646} - 5,03A_{663}\end{aligned}\quad (9)$$

Aceton (100%, v/v):

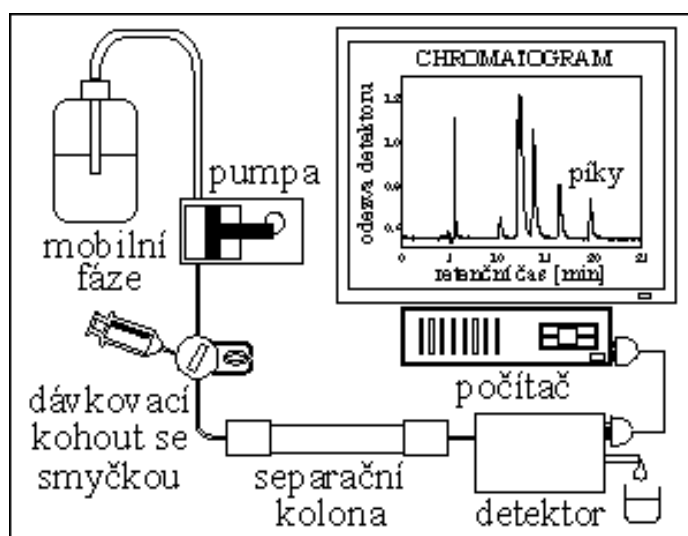
$$\begin{aligned}C_a &= 11,75A_{662} - 2,35A_{645} \\C_b &= 18,61A_{645} - 3,96A_{662}\end{aligned}\quad (10)$$

1.6.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda, která je založena na distribuci separovaných látek mezi mobilní a stacionární fází, přičemž mobilní fází je kapalina a stacionární fází jsou zpravidla kulovité částice o velikosti 3-5 μm umístěné v chromatografické koloně. Mobilní fáze je hnána vysokotlakým čerpadlem a zajišťuje

transport separovaných látek kolonou a celým chromatografickým systémem (Obrázek 12). Míra zadržení složky v koloně je dána jejím rozdělovacím koeficientem a je hodnocena na základě retenčních charakteristik. Základní retenční charakteristikou je retenční čas (objem), což je doba (objem), která uplyne od nástřiku vzorku po detektor. Na separaci látek mají vliv interakce látky se stacionární a mobilní fází, a proto změna ve složení mobilní fáze je jedním z významných faktorů ovlivňujících separaci látek [60].

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní fáze, čerpadlo, dávkovací systém, kolonu a detektor, výsledné informace jsou poté zobrazeny v chromatogramu [60, 61].



Obrázek 12: Schéma kapalinové chromatografie [62]

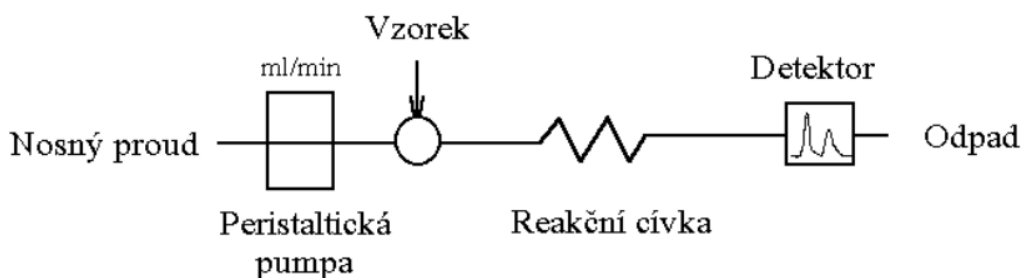
Wang a kol. [63] zahájili svou studii sledováním zelené barvy nálevů zeleného čaje, protože studené čajové nápoje v průhledných lahvích jsou v různých zemích populární. Zjistili, že hlavní složkou zeleně těchto čajových nálevů jsou chlorofyly. Kromě chlorofylů také flavonoidy, katechiny a flavonoly, přičemž hlavní fenolickou sloučeninou přispívající k zelenosti čajových nálevů byl kvercetin [64].

Bohn a kol. [65] analyzovali chlorofyly a jejich deriváty pomocí HPLC vybavené fluorescenčním detektorem. Všechna barviva byla pro HPLC analýzu separována přes kolonu RP-C18 (velikost $4\ \mu\text{m}$ \times délka 25 cm \times ID 2 mm) s methanolem. Identifikovali chlorofyl a a', chlorofyl b a b' a odpovídající feofytiny [64].

Baskan a kol. [66] analyzovali barviva obsažená v čerstvém špenátu, mrkvi, rajčatech a v odpadech z výroby rajčatového protlaku a pomerančové šťávy pomocí metody HPLC se spektrofotometrickým detektorem. Jako stacionární fázi využili kolonu Waters YMC C30 HPLC (velikost $5\ \mu\text{m}$ \times délka 25 cm \times velikost 4,6 mm) a jako mobilní fázi metanol:acetonitril (50:50, v/v) a aceton. V rozsahu vlnových délek 200-800 nm detekovali pouze chlorofyl a a chlorofyl b [64].

1.6.5 Průtoková injekční analýza

Průtoková injekční analýza (FIA) je analytická metoda, při níž se analyt vstříkne do kontinuálního toku nosného roztoku, který se před vstupem do detektoru smísí s dalšími proudícími roztoky. Tato metoda je jednoduchá s velmi nízkou spotřebou vzorku a činidla a zároveň vysokou frekvencí vzorkování. Základní systém FIA (Obrázek 13) je složen ze čtyř částí – z peristaltického čerpadla, dávkovacího systému, reakční zóny (cívka) a detektoru [67].



Obrázek 13: Základní schéma zapojení průtokové injekční analýzy [68]

Analýza probíhá v polyethylenových nebo teflonových trubicích o vnitřním průměru 0,5 – 1 mm. Vzorky a činidla se v nich samovolně pohybují, promíchávají a reagují. Výsledkem analýzy je série píků v závislosti signálu na čase a výška píku označována písmenem h udává koncentraci analytu. Vzorek je při průchodu trubicí rozmýván nosným proudem činidel a vytváří se tak koncentrační gradient. K disperzi vzorku může dojít v přímo v rozpouštědle bez chemické reakce, nebo také během chemické reakce v proudu reagentů [67, 68].

Závislost objemu vzorku, délky reakčních cívek a parametrů průtokového zařízení určuje výšku, tvar, a tedy i velikost rozptýlení zóny zaznamenaného signálu. Mezi parametry ovlivňující FIA patří délka trubičky, vnitřní průměr vedení, rychlost proudění kapaliny, vnitřní objem detekční cely a geometrie systému [67].

Obecně v metodě FIA platí že pro dosažení optimálních výsledků je nezbytné zajistit bezpulsní tok veškerých chemikálií a striktní reprodukovatelnost objemu vneseného vzorku. V rámci FIA systému lze pro detekci reakčního proudu využít jakýkoliv detektor, který je v kombinaci s průtokovou kvyetou vhodný pro určitý reakční produkt [47, 67].

Pigmenty z listů musí být separovány, extrahovány rozpouštědlem, přečištěny a vysušeny, aby se získaly standardy pro optimalizaci FIA. Nejvhodnějším rozpouštědlem pro přípravu vzorku a extrakci pigmentů je ethanol a postup se provádí v temné místnosti. Navržená metoda je vhodná zejména pro stanovení pigmentů v nízkých koncentracích v malých vzorcích s odpovídající analytickou kvalitou. Současné stanovení chlorofylů a a b metodou FIA

je proveditelné za předpokladu, že se rozptyl vypočítá pomocí korelace standardní koncentrace jako funkce koncentrace rozptýlené látky [47].

Pro získání standardů chlorofylů a a b byla upravena metodika Blanco a kol. [69]. Pigmenty z listů špenátu byly separovány, extrahovány rozpouštědlem a přečištěny. Vyčištěné chlorofyly v éterových frakcích byly vysušeny v proudu dusíku pro získání pevných látek, které by bylo možné znovu rozpustit v různých rozpouštědlech. Je důležité zdůraznit, že tento postup neumožnil získat čistý standard, ale obohacené frakce každého pigmentu. Přítomnosti zbývajících pigmentů se nelze vyhnout ani po kroku čištění a je pozorována ve spektrech pořízených pro kontrolu postupu. Nicméně standardy lze charakterizovat pomocí Arnonových rovnic [55] a jsou nezbytné pro kvantifikaci FIA. Tento postup poskytl řešení alternativy čistých komerčních standardů chlorofylu, které jsou drahé, snadno degradovatelné a dostupné pouze v několika miligramech. Na druhé straně sušené extrakty umožňují použití různých rozpouštědel [70].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Materiály a přístroje

2.1.1 Vzorky kopřivy dvoudomé

Kopřiva byla nasbíraná v květnu v okolí Univerzity Pardubice těsně před samotným experimentem tak, aby byla co nejvíce čerstvá. Používaly se mladé kopřivy bez viditelného poškození.

2.1.2 Pomůcky

- plastová lžička
- kopistka
- lodičky
- hodinové sklo
- třecí miska s tloučkem
- odměrné a běžné laboratorní sklo
- skleněné pipety
- balónek
- nálevky
- filtrační kruhy
- skládaný filtrační papír
- kyveta

2.1.3 Chemikálie

- methanol (Sigma Aldrich, USA)
- oxid hořečnatý (Sigma Aldrich, USA)
- křemičitý písek

2.1.4 Přístroje

- digitální analytické váhy (Sartorius, Ústí nad Labem)
- laboratorní sušárna UFE 400 (Memmert)
- homogenizátor ULTRA TURRAX T 18 (Ika, Německo)
- UV/VIS spektrofotometr SHIMADZU UV-2450 (Shimadzu, Japonsko)
- lyofilizátor L4-110 PRO (Gregor Instruments)

2.2 Příprava vzorků kopřivy

2.2.1 Příprava vzorků čerstvé kopřivy

Pro přípravu extraktů z čerstvých kopřiv se vždy navážilo asi 0,5 g listů, které byly převedeny do třecí misky a k nim byla přidána lžička křemičitého písku a malé množství (na kopist) oxidu hořečnatého pro zabránění degradace chlorofylu. Dále bylo přidáno 5 ml methanolu a obsah misky byl důkladně rozetřen. Extrahovaný chlorofyl byl převeden do odměrné baňky o objemu 50 ml a do misky bylo přidáno opět 5 ml methanolu. Tento krok se opakoval několikrát za sebou do úplného odbarvení obsahu v misce. Poté byla odměrná baňka doplněna methanolem po rysku, promíchána a vzorek byl přefiltrován přes skládaný filtrační papír. Tímto způsobem byly připraveny celkem 3 vzorky, které byly dále 5x naředěny methanolem.

Další 3 vzorky z čerstvých kopřiv byly připraveny pomocí homogenizátoru. Do skleněné nádoby bylo vždy odváženo asi 0,5 g listů kopřivy, přidáno 50 ml methanolu a na špičku kopisti oxidu hořečnatého. Takto připravený vzorek byl homogenizován při vysokých otáčkách a následně byl ještě 5 min promícháván při nižších otáčkách. Následovala filtrace přes skládaný filtrační papír a celý tento postup se opakoval ještě 2x. Vzorky byly opět naředěny 5x methanolem.

2.2.2 Příprava vzorků sušené kopřivy

Na předvážkách bylo naváženo 10 g čerstvých kopřiv, které byly ponechány přes noc v sušárně při teplotě 40 °C. Po usušení byl suchý materiál převeden do misky a rozdrcen tloučkem. Pro přípravu extraktů se vážilo vždy asi 0,1 g sušiny a postupovalo se stejně jako v případě čerstvých kopřiv. Opět byly připraveny 3 vzorky pomocí třecí misky s tloučkem a 3 vzorky pomocí homogenizátoru. Vzorky byly před měřením 2x naředěny methanolem.

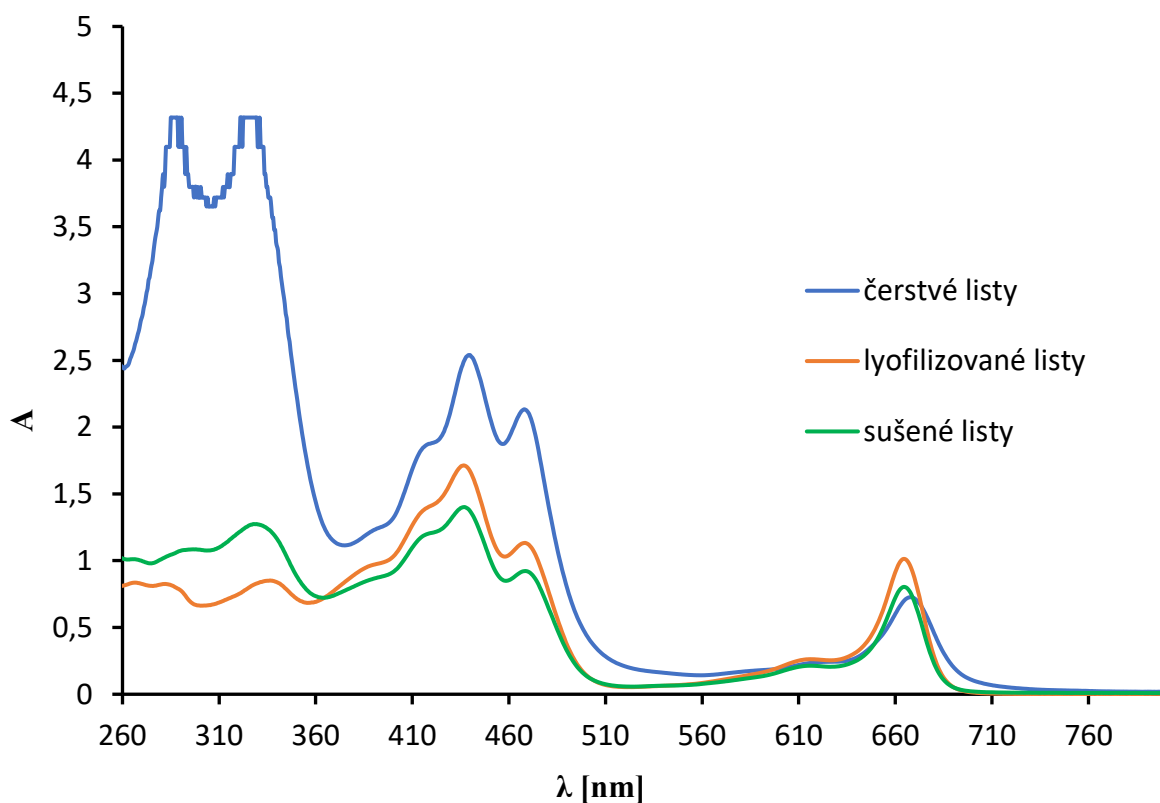
2.2.3 Příprava vzorků lyofilizované kopřivy

Pro lyofilizaci bylo opět naváženo 10 g čerstvých listů kopřiv. Lyofilizované kopřivy byly rozdrceny tloučkem v misce a poté bylo naváženo asi 0,1 g suchého materiálu. Při přípravě extraktů se opět postupovalo stejně jako v případě čerstvých a sušených kopřiv. Byly připraveny 3 vzorky pomocí třecí misky s tloučkem a 3 vzorky pomocí homogenizátoru. Před měření byly vzorky naředěny 2x methanolem.

3 VÝSLEDKY

3.1 Spektrofotometrické stanovení obsahu chlorofylu

Nejprve bylo proměřeno spektrum extraktů připravených z kopřivy (Obrázek 14) a ověřeny absorpční maxima chlorofylu a a b. Absorpční spektrum vzorků kopřivy dvoudomé ukazuje, že všechny tři typy vzorků (čerstvé listy, lyofilizované listy a sušené listy) mají podobné absorpční vlastnosti. Maximum absorpce je pozorováno v oblasti modré a červené vlnové délky, což naznačuje přítomnost chlorofylů a také i karotenoidů v listech kopřivy.



Obrázek 14: Absorpční spektrum vzorků kopřivy dvoudomé

Poté byla změřena absorbance všech připravených extraktů při vlnových délkách odpovídajících absorpčním maximům chlorofylu a (666 nm) a chlorofylu b (653 nm) za použití methanolu jako extrakčního činidla, který sloužil zároveň jako slepý roztok. Dále byla měřena absorbance při vlnové délce 750 nm, která sloužila jako referenční hodnota.

3.2 Výpočet koncentrace chlorofylu

Koncentrace chlorofylu v extraktech byla vypočtena dle rovnic (7) uvedených v kapitole 1.6.3 [40]:

$$C_a = 15,65A_{666} - 7,34A_{653}$$

$$C_b = 27,05A_{653} - 11,21A_{666}$$

kde A jsou absorbance při určitých vlnových délkách a šířce kyvety 1 cm. Výsledky byly přepočteny na množství chlorofylu na jeden gram čerstvých listů kopřivy.

Tabulka 1: Koncentrace chlorofylu ve vzorcích kopřivy

Vzorek	Způsob přípravy	C _a	C _b (mg/g)	C _{celková}
Čerstvé listy	Třecí miska	1,92 ± 0,05	0,79 ± 0,01	2,71 ± 0,06
	Homogenizátor	2,40 ± 0,04	1,04 ± 0,03	3,43 ± 0,07
Sušené listy	Třecí miska	1,81 ± 0,20	0,83 ± 0,09	2,64 ± 0,29
	Homogenizátor	1,52 ± 0,07	0,69 ± 0,04	2,20 ± 0,11
Lyofilizované listy	Třecí miska	1,43 ± 0,05	0,68 ± 0,05	2,11 ± 0,10
	Homogenizátor	1,72 ± 0,03	0,76 ± 0,02	2,48 ± 0,05

V tabulce 1 jsou uvedeny koncentrace chlorofylu a a chlorofylu b vypočtené z uvedených rovnic (7), které byly přepočteny na jednotku hmotnosti čerstvých listů kopřivy (mg/g). Analyzovány byly čerstvé, sušené a lyofilizované kopřivy, přičemž extrakce chlorofylu byla provedena pomocí třecí misky a homogenizátoru dle postupů uvedených v kapitole 2.2.

Výsledky ukazují, že koncentrace chlorofylu a a b v čerstvých listech kopřivy byla nejvyšší v porovnání se sušenými a lyofilizovanými listy. Na základě výše uvedených výsledků lze pozorovat, že homogenizátor i třecí miska poskytují velice podobné výsledky, ale nevýhodou třecí misky je náročnost přípravy vzorků. Homogenizátor poskytl lepší extrakční účinnost chlorofylu u čerstvých listů (3,43 mg/g). Tření v misce bylo efektivnější pouze u sušených listů (2,64 mg/g), kdy bylo získáno více chlorofylu než pomocí homogenizátoru.

Ve srovnání s literaturou [52], kde byla zjištěna koncentrace chlorofylu v rozmezí 1,95–1,99 mg CHL/g kopřivy pro čerstvé listy, byly naše výsledky pro čerstvé listy (2,71 mg/g a 3,43 mg/g) o trochu vyšší. Tento rozdíl může být způsoben použitím různých postupů extrakce a extrakčního rozpouštědla. Ve zmíněné studii byla extrakce provedena ethanolem s využitím jednostupňové či vícestupňové extrakce, dále byla využita Soxhletova extrakce a extrakce podpořená ultrazvukem. I přes použití více různých způsobů extrakce ethanol nedosahoval takové extrakční účinnosti jako methanol v naší práci. Rozdíly ve výsledcích mohly být způsobeny rovněž samotnými vzorky kopřivy, které byly sbírány v jiný čas a v jiné lokalitě.

Studie rovněž uvádí, že výtěžnost extrakce chlorofylu byla nejvyšší u sušených listů, s koncentrací, které činily 147,1 mg CHL/g extraktu, 4,50 g extraktu/100 g kopřivy s účinností izolace 6,62 mg CHL/g čerstvé kopřivy. Naše výsledky pro sušené listy (2,64 mg/g a 2,20 mg/g

čerstvé kopřivy) jsou nižší, což může být způsobeno nižší účinností použité extrakční metody nebo rozdílnými podmínkami sušení.

Porovnáním výsledků lze konstatovat, že naše metoda extrakce pomocí homogenizátoru je efektivnější pro získání vysoké koncentrace chlorofylu z čerstvých listů, zatímco u sušených listů může být výtěžnost ovlivněna jak podmínkami sušení, tak metodou extrakce.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo stanovit koncentraci chlorofylu a a b v různě zpracovaných listech kopřivy, konkrétně v čerstvých, sušených a lyofilizovaných vzorcích. Koncentrace chlorofylu byla měřena spektrofotometricky a výsledky jsou uvedeny v mg na gram čerstvých listů.

Výsledky ukázaly, že z čerstvých listů kopřivy lze získat nejvyšší koncentraci chlorofylu, přičemž nejlepší výsledky byly dosaženy s využitím homogenizátoru (Tabulka 1). Ztráty chlorofylu při sušení a lyofilizaci naznačují, že tyto metody ovlivňují obsah chlorofylu, a to i přesto, že umožňují delší skladování a snadnější manipulaci s materiálem.

Tato zjištění naznačují, že čerstvé listy kopřivy jsou nejbohatším zdrojem chlorofylu a a b, což je důležité pro jejich použití v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Proces sušení a lyofilizace sice umožňuje dlouhodobé skladování a snadnější manipulaci s materiálem, avšak dochází při nich k částečné ztrátě chlorofylu. Optimalizace podmínek sušení a lyofilizace by mohla pomoci minimalizovat ztráty chlorofylu a tím zvýšit kvalitu konečného produktu.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] *Biographies | Britannica*. Dostupné z: <https://www.britannica.com/Biographies>
- [2] JAHODÁŘ, L. *Farmaceuticky významné semenné rostliny*. Praha: nakladatelství Karolinum, 2002. ISBN 978-80-246-4952-8.
- [3] BHUSAL, K. K., S. K. MAGAR, R. THAPA, A. LAMSAL, S. BHANDARI, R. MAHARJAN, S. SHRESTHA a J. SHRESTHA. *Nutritional and pharmacological importance of stinging nettle (Urtica dioica L.): A review* [online]. 2022. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09717
- [4] ASGARAPANAH, J. *Urtica dioica L. (Stinging nettle)* [online]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Urtica-dioica-L-Stinging-nettle_fig2_235672360
- [5] *Kopřiva Dvoudomá Léčivá - Fotografie - Pixabay* [online]. Dostupné z: <https://pixabay.com/cs/photos/kop%C5%99iva-kop%C5%99ivy-dvoudom%C3%A9-6791583/>
- [6] UPTON, R. Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. *Journal of Herbal Medicine* [online]. 2013, **3**(1). ISSN 22108033. Dostupné z: doi:10.1016/j.hermed.2012.11.001
- [7] MACY, D., G. HYDE, J. BRIXEY a O. DAVIS. Wild Edibles: Stinging Nettle [online]. Dostupné z: <https://catalog.extension.oregonstate.edu/pnw214>
- [8] DI VIRGILIO, N., E. G. PAPAZOGLU, Z. JANKAUSKIENE, S. D. LONARDO, M. PRACZYK a K. WIELGUSZ. The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. *Industrial Crops and Products* [online]. 2015, **68**, 42–49 Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2014.08.012
- [9] DEVKOTA, H. P., K. R. PAUDEL, S. KHANAL, A. BARAL, N. PANTH, A. ADHIKARI-DEVKOTA, N. K. JHA, N. DAS, S. K. SINGH, D. K. CHELLAPPAN, K. DUA a P. M. HANSBRO. *Stinging Nettle (Urtica dioica L.): Nutritional Composition, Bioactive Compounds, and Food Functional Properties* [online]. 2022. ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27165219
- [10] *Nettle Leaf: Health Benefits, Nutrition, Preparation Information, and More* [online]. [vid. 2024-04-15]. Dostupné z: <https://www.webmd.com/diet/health-benefits-nettle-leaf>
- [11] KOMES, D., A. BELŠČAK-CVITANOVIĆ, D. HORŽIĆ, G. RUSAK, S. LIKIĆ a M. BERENDIKA. Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. *Phytochemical Analysis* [online]. 2011, **22**(2). ISSN 10991565. Dostupné z: doi:10.1002/pca.1264
- [12] GÜDER, A. a H. KORKMAZ. Evaluation of in-vitro antioxidant properties of hydroalcoholic solution extracts *Urtica dioica* L., *Malva neglecta* Wallr. and their mixture. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2012, **11**(3). ISSN 17266890.
- [13] TAHERI, Y., C. QUISPE, J. JES', J. HERRERA-BRAVO, J. SHARIFI-RAD, S. M. EZZAT, P. VALERE, T. FOKOU, A. YDYRYS, Z. BASSYGARAYEV, Sevgi DURNA, Das, tan DAS, TAN, M. M. ALSHEHRI, D. CALINA a W. C. CHO. *Urtica dioica*-Derived Phytochemicals for Pharmacological and Therapeutic Applications. *Natália Cruz-Martins* [online]. 2022, **16**, 20 Dostupné z: doi:10.1155/2022/4024331
- [14] ROSCHEK, B., R. C. FINK, M. MCMICHAEL a R. S. ALBERTE. Nettle extract (*Urtica dioica*) affects key receptors and enzymes associated with allergic rhinitis.

- Phytotherapy Research* [online]. 2009, **23**(7). ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.2763
- [15] JOHNSON, T. A., J. SOHN, W. D. INMAN, L. F. BJELDANES a K. RAYBURN. Lipophilic stinging nettle extracts possess potent anti-inflammatory activity, are not cytotoxic and may be superior to traditional tinctures for treating inflammatory disorders. *Phytomedicine* [online]. 2013, **20**(2). ISSN 09447113. Dostupné z: doi:10.1016/j.phymed.2012.09.016
- [16] DAR, S. A., F. A. GANAI, A. R. YOUSUF, M. H. BALKHI, T. M. BHAT a P. SHARMA. Pharmacological and toxicological evaluation of *Urtica dioica*. *Pharmaceutical Biology* [online]. 2013, **51**(2). ISSN 13880209. Dostupné z: doi:10.3109/13880209.2012.715172
- [17] AHANGARPOUR, A., M. MOHAMMADIAN a M. DIANAT. Antidiabetic effect of hydroalcoholic *urtica dioica* leaf extract in male rats with fructose-induced insulin resistance. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2012, **37**(3). ISSN 17353688.
- [18] RANJBARI, A., M. A. AZARBAYJANI, A. YUSOF, A. HALIM MOKHTAR, S. AKBARZADEH, M. Y. IBRAHIM, B. TARVERDIZADEH, P. FARZADINIA, R. HAJIAGHAEI a F. DEHGHAN. In vivo and in vitro evaluation of the effects of *Urtica dioica* and swimming activity on diabetic factors and pancreatic beta cells [online]. 2016 Dostupné z: doi:10.1186/s12906-016-1064-6
- [19] GÜLÇİN, I., Ö. I. KÜFREYİOĞLU, M. OKTAY a M. E. BÜYÜKOKUROĞLU. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2004, **90**(2–3), 205–215. ISSN 0378-8741. Dostupné z: doi:10.1016/J.JEP.2003.09.028
- [20] BURKOVA, V. N., S. G. BOEV, A. I. VENGEROVSKY, N. V. YUDINA a A. G. ARBUZOV. Gastroprotective action of nettle extract in experimental peptic ulcer. *Ekspierimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 2011, **74**(1). ISSN 08692092.
- [21] GHAIMA, K. K., N. M. HASHIM a S. A. ALI. Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*). *Journal of Applied Pharmaceutical Science* [online]. 2013, **3**(5). ISSN 22313354. Dostupné z: doi:10.7324/JAPS.2013.3518
- [22] KIM, H. K., V. THAMMAVONGSA, O. SCHNEEWIND a D. MISSIAKAS. Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2012, **15**(1), 92–99 [vid. 2024-06-25]. ISSN 1369-5274. Dostupné z: doi:10.1016/J.MIB.2011.10.012
- [23] TESTAI, L., S. CHERICONI, V. CALDERONE, G. NENCIONI, P. NIERI, I. MORELLI a E. MARTINOTTI. Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (*Urticaceae*) roots extracts: In vitro and in vivo pharmacological studies. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2002, **81**(1), 105–109. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-8741(02)00055-7
- [24] ABELIOVICH, A. a A. D. GITLER. *Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics* [online]. 2016. ISSN 14764687. Dostupné z: doi:10.1038/nature20414
- [25] PATEL, S. S., N. MAHINDROO a M. UDAYABANU. *Urtica dioica* leaves modulates hippocampal smoothed-glioma associated oncogene-1 pathway and cognitive dysfunction in chronically stressed mice. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* [online]. 2016, **83**, 676–686. ISSN 1950-6007. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOPHA.2016.07.020

- [26] BISHT, R., B. C. JOSHI, A. N. KALIA a A. PRAKASH. Antioxidant-Rich Fraction of *Urtica dioica* Mediated Rescue of Striatal Mito-Oxidative Damage in MPTP-Induced Behavioral, Cellular, and Neurochemical Alterations in Rats. *Molecular Neurobiology* [online]. 2017, **54**(7). ISSN 15591182. Dostupné z: doi:10.1007/s12035-016-0084-z
- [27] LEEGOOD, R. C. *Photosynthesis* [online]. B.m.: Elsevier, 2004 [vid. 2024-04-17]. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-443710-9/00487-7
- [28] LAWSON, T. a A. L. MILLIKEN. *Photosynthesis – beyond the leaf* [online]. 2023. ISSN 14698137. Dostupné z: doi:10.1111/nph.18671
- [29] MOULIN, S. L.Y. What do photosynthetic organisms need to thrive in all circumstances? *The Plant Cell* [online]. 2023, **35**(11), 3914. ISSN 1532298X. Dostupné z: doi:10.1093/PLCELL/KOAD213
- [30] KONIECZNY, T. *Herbalus | Fotosyntéza - co je to a proč je tak důležitá?* [online]. [vid. 2024-04-17]. Dostupné z: <https://www.herbalus.cz/blog/9187303-fotosynteza-co-je-to-a-proc-je-tak-dulezita>
- [31] SABATER, B. Evolution and Function of the Chloroplast. Current Investigations and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(10), 3095. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/IJMS19103095
- [32] KIRCHHOFF, H. *Chloroplast ultrastructure in plants* [online]. 2019. ISSN 14698137. Dostupné z: doi:10.1111/nph.15730
- [33] *Elektronická učebnice-ELUC* [online]. Dostupné z: <https://eluc.ikap.cz/verejne/lekce/7>
- [34] *Biochemie | E-ChemBook : Multimediální učebnice chemie* [online]. Dostupné z: <https://e-chembook.eu/biochemie>
- [35] VIRTANEN, O., E. CONSTANTINIDOU a E. TYYSTJÄRVI. Chlorophyll does not reflect green light—how to correct a misconception. *Journal of Biological Education* [online]. 2022, **56**(5). ISSN 21576009. Dostupné z: doi:10.1080/00219266.2020.1858930
- [36] *Chlorophyll* [online]. [vid. 2024-03-22]. Dostupné z: https://www.chm.bris.ac.uk/motm/chlorophyll/chlorophyll_v.htm
- [37] MARTINS, T., A. N. BARROS, E. ROSA a L. ANTUNES. Enhancing Health Benefits through Chlorophylls and Chlorophyll-Rich Agro-Food: A Comprehensive Review. *Molecules* [online]. 2023, **28**(14). ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/MOLECULES28145344
- [38] *Aromatic Heterocyclic Compounds - ppt download* [online]. [vid. 2024-04-17]. Dostupné z: <https://slideplayer.com/slide/2242541/>
- [39] *Chlorophyll_ab_spectra_(cs).png (640×505)* [online]. [vid. 2024-04-17]. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5e/Chlorophyll_ab_spectra_%28cs%29.png?uselang=cs
- [40] LICHTENTHALER, H. K. a A. R. WELLBURN. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* [online]. 1983, **11**(5). ISSN 0300-5127. Dostupné z: doi:10.1042/bst0110591
- [41] CHAZAUX, M., C. SCHIPHORST, G. LAZZARI a S. CAFFARRI. Precise estimation of chlorophyll a, b and carotenoid content by deconvolution of the absorption spectrum and new simultaneous equations for Chl determination. *Plant Journal* [online]. 2022, **109**(6). ISSN 1365313X. Dostupné z: doi:10.1111/tpj.15643
- [42] KHALEGHI, E., K. ARZANI, N. MOALLEMI a M. BARZEGAR. Evaluation of Chlorophyll Content and Chlorophyll Fluorescence Parameters and Relationships

- between Chlorophyll a , b and Chlorophyll Content Index under Water Stress in *Olea europaea* cv . Dezful. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*. 2012, **6**(8), 2108–2111.
- [43] CHEN, Z., W. WU, Y. WEN, L. ZHANG, Y. WU, M. S. FARID, H. R. EL-SEEDI, E. CAPANOGLU a C. ZHAO. *Recent advances of natural pigments from algae* [online]. 2023. ISSN 26618974. Dostupné z: doi:10.1186/s43014-023-00155-y
- [44] NABI, B. G., K. MUKHTAR, W. AHMED, M. F. MANZOOR, M. M. A. N. RANJHA, M. KIELISZEK, Z. F. BHAT a R. M. AADIL. *Natural pigments: Anthocyanins, carotenoids, chlorophylls, and betalains as colorants in food products* [online]. 2023. ISSN 22124306. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2023.102403
- [45] FREITAS, M. V., D. PACHECO, J. COTAS, T. MOUGA, C. AFONSO a L. PEREIRA. Red Seaweed Pigments from a Biotechnological Perspective. *Phycology* [online]. 2021, **2**(1). Dostupné z: doi:10.3390/phycology2010001
- [46] HU, X., A. TANAKA a R. TANAKA. Simple extraction methods that prevent the artifactual conversion of chlorophyll to chlorophyllide during pigment isolation from leaf samples. *Plant Methods* [online]. 2013, **9**(1). ISSN 17464811. Dostupné z: doi:10.1186/1746-4811-9-19
- [47] M. LÓPEZ, J., R. E. LUCENA, L. P MERÚ MARCÓ, N. MOGOLLÓN, R. RIVAS a A. G. ANZALONE. Design of a flow injection method for chlorophyll determination in in vitro plants. *Talanta* [online]. 2004, **64**, 1304–1308. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2004.06.002
- [48] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody: učebnice základů instrumentálních analytických metod*. 1996.
- [49] ERGUN, E., B DEMIRATA, G. GUMUS a R. APAK. Simultaneous determination of chlorophyll a and chlorophyll b by derivative spectrophotometry [online]. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-004-2637-7
- [50] SIMON, D. a S. HELLIWELL. Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae. *Water Research* [online]. 1998, **32**(7), 2220–2223. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/S0043-1354(97)00452-1
- [51] NIKOLOPOULOS, D., C. KORGIOPOULOU, K. MAVROPOULOS, G. LIAKOPOULOS a G. KARABOURNIOTIS. Leaf anatomy affects the extraction of photosynthetic pigments by DMSO. *Talanta* [online]. 2008, **76**(5), 1265–1268. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/J.TALANTA.2008.05.037
- [52] HOJNIK, M., M. ŠKERGET a Ž. KNEZ. Isolation of chlorophylls from stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Separation and Purification Technology* [online]. 2007, **57**(1), 37–46 ISSN 1383-5866. Dostupné z: doi:10.1016/J.SEPPUR.2007.02.018
- [53] *Spektrofotometricke stanoveni B-karotenu* [online]. [vid. 2024-04-15]. Dostupné z: https://www.google.com/search?q=Spektrofotometricke+stanoveni+B-karotenu.docx&oq=Spektrofotometricke+stanoveni+B-karotenu.docx&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUyBggAEEUYOTIKCAEQABiABBiiBDIKCAIQABiABBiiBDIGCAMQRRg80gEHNDM3ajBqN6gCALACAA&sourceid=chrome&ie=UTF-8
- [54] *Spektrofotometr.jpg (960×720)* [online]. [vid. 2024-04-16]. Dostupné z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0d/Spektrofotometr.jpg>
- [55] ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *beta vulgaris*. *Plant Physiology* [online]. 1949, **24**(1). ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.24.1.1

- [56] MACKINNEY, G. Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1941, **140**(2). ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/s0021-9258(18)51320-x
- [57] VERNON, L. P. Spectrophotometric Determination of Chlorophylls and Pheophytins in Plant Extracts. *Analytical Chemistry* [online]. 1960, **32**(9), 1144–1150. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac60165a029
- [58] COMAR, C. L. a F. P. ZSCHEILE. Analysis of plant extracts for chlorophylls a and b by a photoelectric spectrophotometric method. *Plant Physiology* [online]. 1942, **17**(2). ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.17.2.198
- [59] SMITH, J. H. C. a A. BENITEZ. Chlorophylls: Analysis in Plant Materials. In: *Modern Methods of Plant Analysis / Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* [online]. 1955. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-64961-5_6
- [60] ABDU HUSSEN, A. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Annals of Advances in Chemistry* [online]. 2022, **6**(1). Dostupné z: doi:10.29328/journal.aac.1001026
- [61] SADAPHAL, P. a K. DHAMAK. Review article on High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method Development and Validation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* [online]. 2022. Dostupné z: doi:10.47583/ijpsrr.2022.v74i02.003
- [62] BARTONÍKOVÁ, G. a M. KRÁLOVÁ. Klasifikace chromatografických metod [online]. 2018. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/introduction-chromatography?ID=LUSMIS7OP>
- [63] WANG, L. F., S. C. PARK, J. O. CHUNG, J. H. BAIK a S. K. PARK. The Compounds Contributing to the Greenness of Green Tea. *Journal of Food Science* [online]. 2004, **69**(8), S301–S305. ISSN 1750-3841. Dostupné z: doi:10.1111/J.1365-2621.2004.TB09894.X
- [64] MANDAL, B. K. a Y. C. LING. *Analysis of Chlorophylls/Chlorophyllins in Food Products Using HPLC and HPLC-MS Methods* [online]. 2023. ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28104012
- [65] BOHN, T. a T. WALCZYK. Determination of chlorophyll in plant samples by liquid chromatography using zinc-phthalocyanine as an internal standard. *Journal of chromatography. A* [online]. 2004, **1024**(1–2), 123–128. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHROMA.2003.10.067
- [66] SÖZGEN BAŞKAN, K., E. TÜTEM, N. ÖZER a R. APAK. Spectrophotometric and chromatographic assessment of contributions of carotenoids and chlorophylls to the total antioxidant capacities of plant foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013, **61**(47). ISSN 00218561. Dostupné z: doi:10.1021/jf403356h
- [67] MIRÓ, M. a W. FRENZEL. *Flow injection analysis | Detection Techniques* [online]. B.m.: Elsevier, 2005. ISBN 9780123693976. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-369397-7/00157-6
- [68] RŮŽIČKA, J. *Flow injection analysis* [online]. Dostupné z: <https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.3.%20Selecting%20Assay%20Protocol.html>
- [69] PIERRE V. A., F. LAGE-PINTO, L. B. CAMPANELI DA S., M. DA CUNHA, J. GONÇALVES DE OLIVEIRA, C. E. REZENDE, C. M. MAGALHÃES DE SOUZA a R. A. AZEVEDO. Brazilian archives of biology and technology Structural and Ecophysiological Alterations of the Water Hyacinth [*Eichhornia crassipes* (Mart.)

- Solms] Due to Anthropogenic Stress in Brazilian Rivers. *Arch. Biol. Technol.* v.54 n. 2011, 5(5), 1059–1068. ISSN 1516-8913.
- [70] LÓPEZ, J. M., R. E. LUCENA, L. M. MARCÓ P., N. MOGOLLÓN, R. RIVAS a A. ANZALONE G. Design of a flow injection method for chlorophyll determination in in vitro plants. *Talanta* [online]. 2004, 64(5), 1304–1308. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/J.TALANTA.2004.06.002