

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2022

Bc. Edita Ježilová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Vliv tvrdosti vody na fyzikálně-chemické vlastnosti nálevu z kořene
omanu pravého

Bc. Edita Ježilová

Diplomová práce

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Edita Ježilová**
Osobní číslo: **C20504**
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Vliv tvrdosti vody na fyzikálně-chemické vlastnosti nálevu z kořene omanu pravého**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. S využitím databází vědeckých periodik a odborných knih zpracujte přehled o využití kořene omanu (*Inula* sp.), obsah významných biologicky aktivních látek, vliv na zdraví. Vypracujte přehled dosavadních znalostí o vlivu tvrdosti vody na vlastnosti nálevů/nápojů z bylin (včetně čaje a kávy). V teoretické části zpracujte stručné charakteristiky využitých instrumentálních technik.
2. Připravte nálevy z kořene omanu ve vodách s různou tvrdostí a zjistěte jejich vlastnosti. Pokuste se vysvětlit případné rozdíly v chemicko-fyzikálních vlastnostech nálevů, a to s využitím dostupných instrumentálních metod na KAICH.
3. Výsledky a závěr bádání podpořte statistickou analýzou, diskutujte s dostupnými odbornými daty.

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: **Ing. Michaela Frühbauerová**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2022**

Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

Prohlášení

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 2.5.2022

Bc. Edita Ježilová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu doc. Ing. Liboru Červenkovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při zpracování této diplomové práce. Stejně tak bych chtěla poděkovat Ing. Michaele Frühbauerové za pomoc v průběhu experimentu.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá sledováním vlivu tvrdosti na fyzikální a chemické vlastnosti nálevu z kořene omanu pravého. V teoretické části je práce zaměřena zejména na popis a využití omanu v lékařství, dále na definice ohledně tvrdosti vod, vliv pH na významné složky kořene a popis použitých technik při experimentální části. V praktické části byly připraveny nálevy z kořene omanu pravého do vody s různou tvrdostí. Ve vzorcích byla změřena barevnost, pH a byly stanoveny antioxidační aktivity metodou DPPH a FRAP, chelatační aktivita, a celkového obsah fenolických látek, flavonoidů a katechinů. Dále byla změřena infračervená spektra nálevu. Vzorek kořene byl podroben analýze minerálních látek pomocí ICP/MS. Byl potvrzen předpoklad, že pH má vliv na barvu a antioxidační vlastnosti bylinných nálevů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Oman kořen, bylinný nálev, pH, spektroskopie, antioxidační aktivita

TITLE

The effect of hardness of water on various physicochemical properties of elecampe root infusion

ANNOTATION

This diploma thesis deals with the effect of hardness of the water on the physical and chemical properties of oman root infusion. The theoretical part describes medicinal properties of oman, water hardness, and techniques used in the experimental part. In the experimental part, oman infusion was prepared in water with various hardness levels. Colour, the pH, antioxidant activity in terms of DPPH and FRAP, chelating activity, as well as total phenolic, flavonoid, and catechin contents were determined. The main functional groups present in the infusion were evaluated by infrared spectroscopy. The mineral content of oman root was determined by ICP/MS. The pH level was identified as the probable factor that influenced the colour of the infusion.

KEYWORDS

Oman root, herbal infusion, pH, spectroscopy, antioxidant activity

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ

SEZNAM TABULEK

SEZNAM GRAFŮ

SEZNAM ZKRATEK

ÚVOD	14
1 Teoretická část	15
1.1 Oman pravý.....	15
1.1.1 Historické souvislosti s užíváním omanu	15
1.1.2 Morfologické znaky	15
1.1.3 Pěstování	16
1.1.4 Sběr léčivých bylin.....	16
1.1.5 Využití v lékařství	16
1.1.6 Složení kořene omanu	18
1.1.7 Přípravky z léčivých bylin.....	24
1.2 Tvrdost vody	25
1.2.1 Dočasně tvrdá voda	25
1.2.2 Trvale tvrdá voda.....	26
1.3 Vliv tvrdosti vody na vlastnostech nápoje z bylin.....	26
1.4 Použité metody	28
1.4.1 Spektrofotometrie	28
1.4.2 Barevnost.....	31
1.4.3 Stanovení chelatační aktivity.....	34
1.4.4 Stanovení antioxidační aktivity	35
1.4.5 Stanovení fenolických látek	36
1.4.6 Stanovení flavonoidů.....	36
1.4.7 Infračervená spektroskopie.....	37
1.4.8 ICP/MS	39
1.4.9 Měření pH a elektrické vodivosti	39

1.4.10	Chelatometrické stanovení vápníku a hořčíku	40
2	Experimentální část	41
2.1	Chemikálie	41
2.2	Přístroje	42
2.3	Příprava bylinných nálevů	43
2.4	Statistické zpracování dat	43
2.5	Postupy analýzy vzorku omanu pravého	44
2.5.1	Měření pH.....	44
2.5.2	Měření elektrické vodivosti a chelatometrické stanovení vápníku a hořčíku	44
2.5.3	Měření barevnosti	45
2.5.4	Spektrofotometrické analýzy	46
2.5.5	Infračervená spektroskopie.....	49
2.5.6	ICP/MS	50
3	Výsledky a diskuze.....	51
3.1	pH vzorků vod a nálevů z kořene omanu pravého.....	51
3.2	Elektrická vodivost a tvrdost připravených vod a nálevů omanu pravého	52
3.3	Měření barevnosti	52
3.4	Antioxidační charakteristika nálevů z kořene omanu pravého	59
3.4.1	Chelatační aktivita	59
3.4.2	Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH.....	60
3.4.3	Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP	61
3.4.4	Stanovení celkového obsahu fenolických látek.....	62
3.4.5	Stanovení obsahu flavonoidů	63
3.4.6	Stanovení obsahu katechinů	64
3.5	VIS spektra	65
3.6	Infračervená spektroskopie	67
3.7	ICP/MS	70
	ZÁVĚR.....	71
	POUŽITÁ LITERATURA	73
	SEZNAM PŘÍLOH.....	89

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 <i>Inula helenium</i> [1]	16
Obrázek 2 Kořen <i>Inula helenium</i> [15]	17
Obrázek 3 Strukturní vzorec inulinu	18
Obrázek 4 Strukturní vzorec alantolaktону a isoalantolaktónu	19
Obrázek 5 Strukturní vzorec katechinu	22
Obrázek 6 Základní struktura molekuly chlorofylu [52]	24
Obrázek 7 UV/VIS spektra chlorofylu A a chlorofylu B [52]	24
Obrázek 8 Elektromagnetické spektrum [70]	28
Obrázek 9 Schéma jednopaprskového spektrofotometru [71]	29
Obrázek 10 Schéma dvoupaprskového spektrofotometru [72]	30
Obrázek 11 Diagram barevného prostoru [74]	32
Obrázek 12 Zobrazení prostoru průřezu barevného prostoru [78]	33
Obrázek 13 Schéma kolorimetru [76]	34
Obrázek 14 Strukturní vzorec 1,1- difenyl-2-(2,4,6-nitrofenyl) hydrazylu	36
Obrázek 15 Schéma disperzního IR spektrometru [97]	37
Obrázek 16 Schéma Michelsonova interferometru [97]	38
Obrázek 17 UltraScan VIS pro měření barevnosti [105]	45
Obrázek 18 (z leva do prava); Demi, demineralizovaná voda; STV, středně tvrdá voda; VTV, velmi tvrdá voda; HCO ₃ ⁻ , roztok hydrogenuhličitanu sodného	55
Obrázek 19 Změna barevnosti nálevu v alkalickém pH (z leva do prava: DEMI (pH=8, 9, 10,11), HCO ₃ ⁻ (pH=7–8, 9, 10) Demi, demineralizovaná voda; HCO ₃ ⁻ , roztok hydrogenuhličitanu sodného	58
Obrázek 20 Změna barevnosti v kyselém pH (zleva doprava: DEMI (pH=3, 4, 5), HCO ₃ ⁻ (pH=3, 4, 5); Demi, demineralizovaná voda; HCO ₃ ⁻ , roztok hydrogenuhličitanu sodného	58

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Klasifikace tvrdosti vod.....	25
Tabulka 2 Kyvetové materiály a jejich vlnové délky [70]	31
Tabulka 3 IČ oblasti [104].....	37
Tabulka 4 Chemické složení vod použité k experimentální části	43
Tabulka 5 Srovnání ΔE^* na základě vjemu lidským okem [106]	46
Tabulka 6 Teplotní program mineralizace.....	50
Tabulka 7 pH připravených vod a nálevů.....	51
Tabulka 8 Vodivost a tvrdost připravených nálevů z omanu pravého	52
Tabulka 9 Barevnost připravených nálevů v barevném prostoru $L^*a^*b^*$	53
Tabulka 10 Barevnost připravených nálevů v barevném prostoru $L^*C^*h^\circ$	54
Tabulka 11 Barevnost připravených nálevů v barevném prostoru $L^*a^*b^*$	56
Tabulka 12 Barevnost připravených nálevů v barevném prostoru $L^*C^*h^\circ$	57
Tabulka 13 FT-IR spektrum vysušeného nálevu HCO_3^-	68

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 A-D Chelatační aktivita nálevů omanu připravených do DEMI, STV, VTV, HCO_3^-	60
Graf 2 A–D Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH u DEMI, STV, VTV, HCO_3^-	61
Graf 3 A–D Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP u DEMI, STV, VTV, HCO_3^-	62
Graf 4 A-D Stanovení fenolických látek u DEMI, STV, VTV, HCO_3^-	63
Graf 5 A-D Stanovení obsahu flavonoidů u DEMI, STV, VTV, HCO_3^-	64
Graf 6 A-D Stanovení obsahu katechinů u DEMI, STV, VTV, HCO_3^-	65
Graf 7 VIS spektra nálevů DEMI, DEMI (pH=9), HCO_3^- , HCO_3^- (pH=9)	66
Graf 8 VIS spektra nálevu HCO_3^- (pH=9) (10 měření po 2 hodinách).....	67
Graf 9 Infračervená spektra nálevů DEMI, DEMI (pH=9), HCO_3^- , HCO_3^- (pH=9) a čistého inulinu	69
Graf 10 Minerální látky s nejvyšší koncentrací v nálevu z kořene omanu pravého stanoveny pomocí ICP/MS	70

SEZNAM ZKRATEK

Zkratka Význam

CIE	Commission internationale de l'éclairage (Mezinárodní komise pro osvětlování)
DEMI	Demineralizovaná voda
SET	Přenos jednoho elektronu (Single electron transfer)
STV	Středně tvrdá voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-nitrofenyl)hydrazyl
EC	epikatechin
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraoctová
EEG	elektroencefalografie
EGC	epikatechin galát
EGCG	epigalokatechin galát
FC	Folin-Ciocalteu
Ferozzin	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
ICP/MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IR	infrared, infračervené záření
NIR	near infrared, blízká infračervená oblast
RGB	červené (Red), zelené (Green) a modré (Blue), barevná prostor
TPTZ	2,4,6,-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazin
Trolox	kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová
TTRAN	total transmission, totální transmise
UV	ultraviolet (ultrafialové)
VIS	visible (viditelné)

ÚVOD

Oman pravý, latinsky *Inula helenium* je statná dvouletá bylina vyskytující se zejména v Evropě, Asii a Africe. Řadí se do čeledi hvězdnicovitých a dorůstá do výšky 2,5 m. Oman pravý se díky svým léčivým účinkům hojně využíval již ve středověku, a i v dnešní době našel využití zejména v tradiční medicíně. Obsahové látky omanu pravého zahrnuje inulin, silice neboli éterické oleje, seskviterpenové laktony (alantolakton, isoalantolakton), fenolové kyseliny, hořčiny a další látky v menším zastoupení. Využití našla celá rostlina, ve zdravotnictví se však nejvíce využívá její kořen. Nálev z kořene se dnes využívá zejména při onemocněních trávicího traktu a při bolestech žaludku. Dále podporuje vykašlávání a správnou funkčnost ledvin. Mezi účinné látky kořene, které byly zkoumány v této práci jsou látky antioxidační.

Cílem této práce bylo sledovat vliv tvrdosti vody na fyzikálně-chemické vlastnosti nápoje připraveného z omanu pravého. Byl sledován zejména vliv pH na barevnost nálevu a na změnu antioxidační aktivity.

1 Teoretická část

1.1 Oman pravý

Oman pravý, latinsky *Inula helenium* je vytrvalá bylina lidově nejčastěji nazývaná koňské oko, ale také ji můžeme nalézt pod názvem alant, ománek, elenium, enula, inula, uspivřed, devětsil, nebo oko Kristovo. Pochází ze západní a střední Asie a aktuálně je i velmi rozšířena po celé Evropě [1].

1.1.1 Historické souvislosti s užíváním omanu

Historie této léčivé byliny spadá už do starověku, a to do oblasti Středozeří. Mýty zmiňují původ latinského názvu, který praví, že se oman zrodil ze slz Heleny Trojské poté, co oplakávala milovaného, hadem uštknutého Menelaa. Oman se už v této době využíval dost hojně, nejčastěji jako bylina s mnoha léčivými účinky. Také v domácnosti našel své využití. Přidával se jako kořenová zelenina do polévky, nebo se konzumoval v syrovém stavu. Dále se z něho vyrábělo omanové víno [2, 3].

Olej z listů se používal k aromatizaci alkoholických a nealkoholických nápojů, do cukroví, pečiva, želé a pudinků. Kořen se vařil a konzumoval. Čerstvé listy se jedly stejně jako zelenina a používaly se ke zdobení různých pokrmů. Olej získaný z květů se používal k výrobě mýdel a parfémů. Rostlina poskytuje barvivo, jímž se barvila vlna a hedvábí. Kořen se tradičně využíval při vykuřování během pohanských oslav slunovratu [4].

1.1.2 Morfologické znaky

Oman pravý se řadí do čeledi Asteracea, neboli do čeledi hvězdicovité. Je to statná, dvouletá bylina vysoká okolo 30 cm až 2,5 m s dřevnatým, hnědým oddenkem, který je větvený, na řezu bílý s průměrem 3 cm. Lodyha je přímá, rovnoměrně olistěná, větvená, barvou načervenalá až tmavě červená. Dolní listy jsou dlouhé 40–50 cm s oválným až vejčítým tvarem. Horní a střední listy jsou menší a přisedlé. Květy jsou vždy žluté, 6–9 cm široké, s mnoha okrajovými kvítky (Obrázek 1) [1, 3, 5].



Obrázek 1 *Inula helenium* [1]

1.1.3 Pěstování

Semena omanu můžeme na jaře (březen–duben) předpěstovat buď v domácích podmínkách, nebo v pařeništi. Semena mají klíčivost 2–4 týdny. Oman je bylina kvetoucí od června do září zejména na lesních pasekách, mýtinách, okrajích lesů, na loukách, podél břehů řek, potoků, jezer a ústí řek. Lesy vyhledává většinou borové nebo modřínové, dává přednost půdám s dostatkem vláhy. Doba sběru je od září do října [3, 6].

1.1.4 Sběr léčivých bylin

Správný zdroj léčivé rostliny a doba sklizně jsou důležitými faktory pro maximalizaci výnosu požadovaného fytochemického obsahu. Harmonogram sběru různých částí rostlin je rozdílný, například kořeny a oddenky se sbírají na konci vegetačního období, listy a květy krátce po otevření a plody a semena po zralosti [7].

Oman pravý se sklízí v období června až července, kdy se nejdříve začnou sklízet květy a listy. Kořeny se sklízí až 2.–3. rok po výsevu. Při sběru se upřednostňuje ruční sběr. Čerstvé kořeny omanu by měly být skladovány stejně jako všechny kořeny. Sušené kořeny by měly být po nasekání a vyčištění chráněny před přímým slunečním zářením [7, 8].

Posklizňové zpracování zahrnuje veškeré postupy ošetření bylin po sklizni nebo po sběru. Zahrnuje procesy jako je kontrola, třídění a různé primární zpracování a sušení. Sušení se využívá jako nejčastější konzervace rostlinných materiálů, kdy část obsažených účinných látek je zachována [9, 10, 11].

1.1.5 Využití v lékařství

Inula helenium je bylina v tradiční medicíně nazývaná jako takzvaný všelék a využití zde našla celá rostlina. Využíval se k léčbě cukrovky, při bolestech žaludku a žlučníku, při akutních respiračních infekcích, žaludečních vředech, poškození jater, zápalu plic,

bronchiálního astmatu, na srdeční choroby (angina pectoris), revmatismus a také lokálně k péči na kožní poranění. Květy ve formě vodního nálevu (čaje) se aplikovali při nachlazení a zánětech, anebo se výluh přímo aplikoval na rány. Kořen (Obrázek 2) se připravoval jako vodní nálev a používal se zejména při onemocnění trávicího traktu a při bolestech žaludku. Nálev z listu se zase využíval jako diuretikum při břišní vodnatelnosti. Prášek ze suchých kořenů se aplikoval na trofické vředy a používal se jako mast na furunkl a septické rány. Vývar z kořenů a listů snižoval horečky a pomáhal při bolestech žaludku [12, 13, 14].



Obrázek 2 Kořen *Inula helenium* [15]

V Gruzii se oman stále využívá proti hadímu uštknutí. Oddenek omanu se promyje, rozdrtí, přidá se voda a vymačká se filtrát, který se dá vypít zraněnému člověku. Mezitím se listy omanu nechají spařit v octě nebo víně a přiloží se na ránu zraněného. V dnešním pojetí lidové medicíny se doporučuje převážně využití kořene, a to ke správné funkci střev, k podpoře žaludečních šťáv a k podpoře vykašlávání. Další zdroje zabývající se tradičním léčitelstvím doporučují oman k podpoře normální funkce ledvin, kdy se při užívání zesilují odvodňovací schopnosti a tím se i zrychluje odchod škodlivin z těla. Phytochemikálie alantolakton a isoalantolakton obsažené v kořenu vykazují protirakovinné, a antimikrobiální vlastnosti. Seskviterpenové laktonové sloučeniny mají také protizánětlivé vlastnosti [16, 17, 18].

Zheng a kolektiv v roce 2020 izolovali a identifikovali z kořene *Inula helenium* pět nových seskviterpenů. Ty byly na základě bioaktivního chování hodnoceny jako sloučeniny vykazující silnější protizánětlivé aktivity nežli indometacin¹. Práce nejen obohatila chemické složení kořene, ale také poskytla slibné kandidáty na vývoj protizánětlivých látek nebo chemosenzibilizátoru, které by mohly napomáhat proti boji rezistence rakovinových nádorů vůči protinádorovým činidlům [13].

¹Indometacin je silné nesteroidní protizánětlivé léčivo [18].

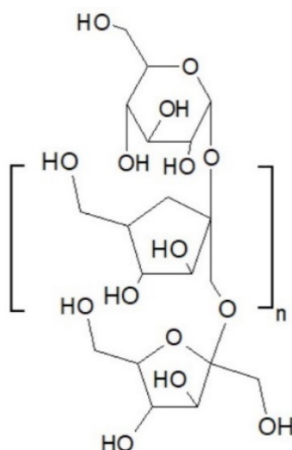
1.1.6 Složení kořene omanu

Oddenky a kořeny obsahují až 5 % silic se seskviterpenovými laktony (hlavně alantolakton a isoalantolakton), 44 % polysacharidů jako je inulin – celkový obsah polysacharidů v kořeni činí 55,6 %, fenolové kyseliny (kávová, chlorogenová, hydroxybenzoová a ferulová kyselina), éterické oleje (helenin), různé flavonoidy (epikatechin, epikatechin galát, katechin), hořčiny, sliz, deriváty thymolu, triterpeny a sterol v menším zastoupení. V kořenu byly nalezeny prvky (mg/g): draslík, vápník, hořčík, železo a stopové prvky (μg/g): mangan, kobalt, chrom, hliník, uhlík, vanad, jod, brom [5, 17, 19].

Byly hodnoceny ethanolové extrakty z kořene omanu. Hlavními detekovanými sacharidy byly inulin, sacharóza, fruktóza a glukóza. Mezi látky zodpovědné za jeho léčivé vlastnosti lze řadit zejména: inulin, silice, alantolakton, fenolické látky, hořčiny, sliz. Hlavní strukturou všech rostlinných kořenů jsou plastidy [19, 20].

1.1.6.1 Inulin

Inulin (Obrázek 3) je přírodní rostlinný polysacharid patřící do skupiny fruktanů. V rostlinách se vyskytuje zejména v kořenech u rostlin hvězdnicovitých a zvonkovitých, kde nahrazuje škrob jako zásobní látku [21].



Obrázek 3 Strukturální vzorec inulinu

Fruktany inulinového typu mají protizánětlivé a protirakovinné účinky. Kromě toho vykazují vysokou prebiotickou aktivitu, která může selektivně podporovat růst prospěšných bakterií, regulovat složení střevní mikroflóry a tím být přínosná pro zdravá střeva [22, 23].

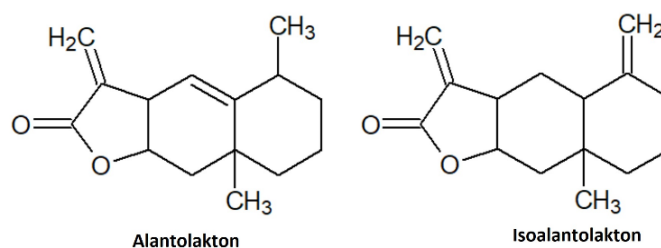
Pang a kolektiv v roce 2019 získali z rostliny *Platycodon grandiflorus* fruktan inulinového typu se stupněm polymerace deset. V tomto případě byly poprvé zjištěny největší prebiotické vlastnosti, kdy se ve střevech podpořil růst a množení až šesti kmenů žádoucího rodu *Lactobacillus* a zároveň došlo k největšímu zániku patogenních mikroorganismů [24].

Několik studií potvrzuje, že inulin má pozitivní účinky na hladinu krevního cukru u lidí trpících cukrovkou nebo u lidí, kteří jsou ve stádiu, která cukrovce předchází (takzvaný pre-diabetes). Účinnost inulinu ale také závisí na typu inulinu. Vysoce účinný inulin je v terapii cukrovky nejvhodnější [25, 26, 27].

Studie potvrzují pozitivní efekt na obsahu tuku v jaterních tkáních u lidí ve stádiu pre-diabetu. Jedné studie se zúčastnily ženy trpící cukrovkou druhého typu, kdy jim denně bylo podáváno 10 gramů. Byly sledovány hodnoty krevního cukru na lačno, které klesly o 8,5 % a hodnoty glykovaného hemoglobinu, které klesly až o 10,5 %. Glykovaný hemoglobin nám v lékařství slouží pro dlouhodobý monitoring cukrovky. Hlavní komerční zdroji inulinu je čekanka a topinambur [25, 28].

1.1.6.2 Silice

Silice neboli éterické oleje jsou aromatické látky ve vodě nerozpustné. Složky silic lze rozdělit do dvou hlavních skupin, a to na uhlovodíky (terpeny, seskviterpeny a diterpeny) a kyslíkaté sloučeniny odvozené od uhlovodíků včetně alkoholů, aldehydů, esterů, ketonů, fenolů a oxidů. Celkový obsah éterického oleje u omanu je proměnlivý a jeho množství je minimálně 0,30 %. Analýzy plynové chromatografie s hmotnostním detektorem ukázaly, že izolovaný esenciální olej z *Inula helenium* obsahoval jako dominantní sloučeniny alantolakton (65,8 %) a isoalantolakton (25,5 %) (Obrázek 4) a další v menším zastoupení [14,15, 29, 30, 31].



Obrázek 4 Strukturální vzorec alantolaktonu a isoalantolaktonu

Alantolakton je seskviterpenový lakton, který lze izolovat z mnoha bylinných rostlin patřících do čeledi Asteraceae. Kromě antimikrobiálních aktivit proti bakteriím, houbám a virům také prokázal významné protizánětlivé účinky. Podle studií alantolakton, ale i isolakton podporuje přirozený proces apoptózy². Jejich deriváty byly cíleně použity na nádorové buňky u laboratorních myší a u 80 % z nich došlo ke zmenšování nádorů, které následně zmizely úplně [32, 33, 34, 35].

²Apoptóza je programovaná buněčná smrt pro odstranění poškozených buněk [34, 35].

V roce 2016 Sowndhararajan a kolektiv publikovali studii o vlivu inhalace esenciálního oleje z kořene *Inula helenium* na elektroencefalografickou (EEG) aktivitu lidského mozku. EEG vyšetřuje činnost lidského mozku tím, že snímá na povrchu hlavy elektrické potenciály, které neustále vznikají mozkovou činností. Vliv byl hodnocen měřením EEG spektra u dvaceti zdravých účastníků. Hodnoty EEG spektra byly zaznamenány. Bylo dokázáno, že esenciální oleje z kořene mohou zlepšit stav bdělosti mozku, zlepšit koncentraci a lze je využít k léčbě psychofyziologických poruch [36, 37].

1.1.6.3 Antioxidační látky

V posledních letech byla věnována velká pozornost volným radikálům a vlivu na lidské zdraví. Pro správnou fyziologickou funkci je nezbytná rovnováha mezi volnými radikály a antioxydanty. Pokud volné radikály přemohou schopnost těla je regulovat, nastává stav známý jako oxidační stres [38].

Volné radikály

Volný radikál může být definován jako jakýkoli molekulární druh schopný samostatné existence, který obsahuje nepárový elektron v atomovém orbitalu. Přítomnost nepárového elektronu má za následek určité společné vlastnosti, které sdílí většina radikálů. Mnoho radikálů je nestabilních a vysoce reaktivních. Mohou buď darovat elektron nebo přijmout elektron z jiných molekul, a proto se chovají jako oxidační nebo redukční činidla. Nejčastější nežádoucí volné radikály jsou ty obsahující kyslík. Sem řadíme hydroxylový radikál, superoxidový aniontový radikál, peroxid vodíku, singlet kyslíku, chlornan. Dusík, jako je oxid dusný také patří mezi volné radikály. Tyto radikály jsou v lidském těle vytvářeny endogenními systémy a vystavením různým fyzikálně–chemickým podmínkám nebo patologickým stavům. Jedná se o vysoce reaktivní druhy schopné v jádře a v membránách buněk poškozovat všechny druhy molekul v těle, jako jsou DNA, nukleové kyseliny, proteiny, sacharidy a lipidy [38, 39, 40].

Antioxidant je molekula dostatečně stabilní, aby darovala elektron volnému radikálu a neutralizovala jej. Antioxydanty zpomalují nebo inhibují poškození buněk především díky své schopnosti zachycovat volné radikály. Antioxydanty s nízkou molekulovou hmotností mohou bezpečně interagovat s volnými radikály a ukončit řetězovou reakci dříve, než dojde k poškození životně důležitých molekul. Některé z těchto antioxydantů, včetně glutathionu, ubichinonu a kyseliny močové, jsou produkovány během normálního metabolismu v těle. Některé vitamíny, jako vitamín E (α -tokoferol), vitamín C (kyselina askorbová) a β -karoten,

kteřé také zachycují volné radikály, si tělo neumí vyrobit samo, proto musí být dodávány ve stravě. Hodnoty antioxidační aktivity v *Inula helenium* byly stanoveny metodou volných radikálů s 1,1- difenyl-2-(2,4,6-nitrofenyl)hydrazylem, metoda nazývána zkráceně DPPH (Kapitola 2.5.4.2). Hodnoty se pohybovaly v rozsahu 161,60–1563,02 µg/ml [38, 41, 42].

Květenství a kořeny mají vyšší koncentraci fenolických sloučenin a významnou antioxidační aktivitu, zatímco listy obsahují vyšší koncentrace flavonoidů. Kromě toho se množství fenolických látek, stejně jako antioxidační aktivita, významně liší mezi různými populacemi v důsledku různých dopadů environmentálních faktorů. Výzkum ukázal, že *Inula helenium* představuje vydatný zdroj bioaktivních látek a že množství těchto sloučenin se u různých populací i u stejných populací se značně odlišují, pokud jde o různá časová období i části rostlin [42].

Fenolické látky

Fenolické látky jsou důležitými chuťovými složkami v každém čaji. Tyto látky se dělí podle své chemické struktury na flavonoidní, neflavonoidní a ostatní. Dále je můžeme dělit na základě jejich vlastností, a to na látky chuťové (taniny), barviva (flavonoidy, xanthony), vonné látky (benzochinony, kumariny) a přírodní antioxidanty (flavonoidy) [42].

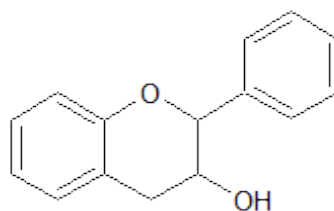
Fenolické sloučeniny představují jednu ze tří hlavních skupin rostlinných sekundárních metabolitů. Mezi těmito sloučeninami jsou fenolické látky zvláště důležité díky své schopnosti eliminovat volné radikály a fungovat jako antioxidanty. Stejně tak díky sekundárním metabolitům jsou v lidském těle připisovány četné ochranné funkce, včetně antioxidačních, antibiotických a antikarcinogenních účinků. Tyto bioaktivní sloučeniny přirozeně dostupné z rostlin mají sice nižší účinnost než moderní léky, ale jsou tradičně konzumovány ve významném množství prostřednictvím stravy, mohou tak mít dlouhodobé fyziologické přínosy bez jakýchkoliv škodlivých vedlejších účinků. To je důvod, proč role fenolických látek jako přírodních antioxidantů přitahují v posledních letech značný zájem v oblasti farmakochemie [29, 42, 43].

Podle výzkumu z roku 2019 se celková koncentrace fenolických látek v rostlinných extraktech *Inula helenium* pohybovala v rozsahu 17–90 mg kyseliny gallové na gram. Pokud jde o části rostlin, tak největší množství fenolických látek bylo získáno z květu, zatímco v kořenech a listech byla koncentrace nižší. Mezi další identifikované fenolické látky řadíme kyselinu kávovou, katechiny, epikatechiny, kyselinu ferulovou, kyselinu tříslovou, kyselinu chlorogenovou a kvercetiny [42, 44].

Flavonoidy

Flavonoidy jsou polyfenolické sloučeniny, které jsou přítomny ve většině rostlin. Podle chemické struktury bylo identifikováno přes 4000 flavonoidů, které byly rozděleny na flavanoly, flavanony, flavony, isoflavony, katechiny, antokyany a proanthokyanidiny [45]. Příznivé účinky flavonoidů na lidské zdraví spočívá především v jejich silné antioxidační aktivitě. Dále předcházejí nebo oddalují řadu chronických a degenerativních onemocnění, jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění, artritida, stárnutí, šedý zákal, ztrátu paměti, mrtvice, Alzheimerovu chorobu, záněty a infekce. Každá rostlina obsahuje unikátní kombinaci flavonoidů, a proto různé byliny, bohaté na tyto látky, mají na tělo velmi rozdílné účinky. Mezi hlavní přírodní zdroje flavonoidů patří zelený čaj, hroznové víno (červené víno), jablka, kakao (čokoláda), sója, kurkuma, bobule, cibule, brokolice. Mezi flavanoidy vyskytující se v čaji jsou zejména flavanoly (katechiny) a kvercetin [40, 45].

Největší zastoupení z flavonoidů v listech má rutin, ten se však nenachází v kořenu. Množství rutinu se pohybuje v rozsahu 9–376 mg na jeden gram extraktu. Celkově nejvyšší koncentrace flavonoidů byla naměřena v kořenech. V kořenu se nacházejí zejména flavan-3-oly neboli katechiny (Obrázek 5) s obsahem 14–25 %. Katechiny jsou nejdůležitější funkční složkou v bylinném čaji. Představují širokou škálu funkčních aktivit. Mezi nejznámější katechiny řadíme epikatechin (EC), epikatechin galát (ECG) a epigalokatechin galát (EGCG). Další flavonoidy obsažené v kořenu jsou kvercetin a kempferol [20, 42, 46].



Obrázek 5 Strukturální vzorec katechinu

1.1.6.4 Hořčiny

Hořčiny jsou podle jedné definice všechny hořké rostlinné látky, podle jiné definice jsou to látky, jež nemají mimo svou hořkost jiný účinek či použití. Díky jeho hořké chuti vzbuzují chuť k jídlu a zlepšují trávení. V ústech dráždí chuťové receptory a tím podporují tvorbu slin, což přispívá k dobrému začátku trávicího procesu. V žaludku pak působí na sliznici, čímž se zvyšuje tvorba trávicích enzymů a žaludečních kyselin. Zároveň se zlepšuje i peristaltika střev, která má za následek lepší trávení potravy. Takto pozitivně působí ale pouze v malých dávkách, ve větším množství způsobuje překrvení a podráždění sliznice [47, 48].

Ve studii Yu-Hong Chen z roku 2022 byly sledovány účinky fenolických kyselin na hořkost a svíravost zeleného čaje. Čím více obsahoval čaj fenolických kyselin, a to zejména kyselinu kávovou, gallovou a chlorogenovou, tím se zvyšovala jeho hořkost a svíravost [49].

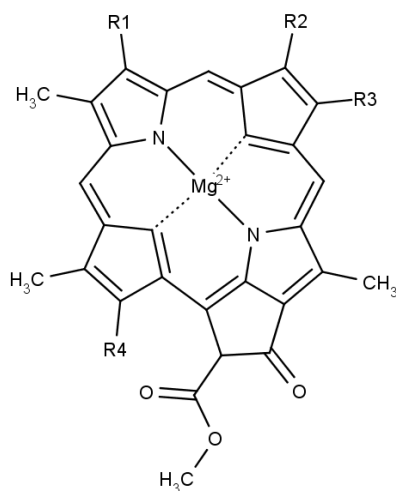
1.1.6.5 Sliz

Rostliny produkují vysokomolekulární látku zvanou sliz. Sliz je látka bohatá na polysacharidy (78,4 %), ale obsahuje také proteiny (7,3 %), minerály (5,6 %) a lipidy (3,1 %). V závislosti na rostlinném druhu je sliz vylučován kořeny, semeny, listy a stonky. Sliz vylučovaný semeny a kořeny má v rhizosféře řadu prospěšných funkcí. Například sliz ze semen zvyšuje dostupnost vody a odolnost semen vůči suchu, hraje důležitou roli při údržbě půdy a je využíván jako zdroj uhlíku prospěšnými rhizosférickými mikroorganismy. Slizové polysacharidy vylučované kořeny a semeny se mohou lišit v závislosti na rostlinném druhu, ale obecně se skládají z monosacharidů, jako je galaktóza, glukóza, fukóza, manóza, arabinóza a xylóza. Dále obsahují uronové kyseliny, jako je kyselina galakturonová a kyselina glukuronová. Sliz z kořene *Inula helenium*, díky vysokému obsahu polysacharidu, našel využití i v tradiční medicíně. Sliz vytváří na sliznici ochranný povlak a tím mírní suchý a dráždivý kašel [50, 51].

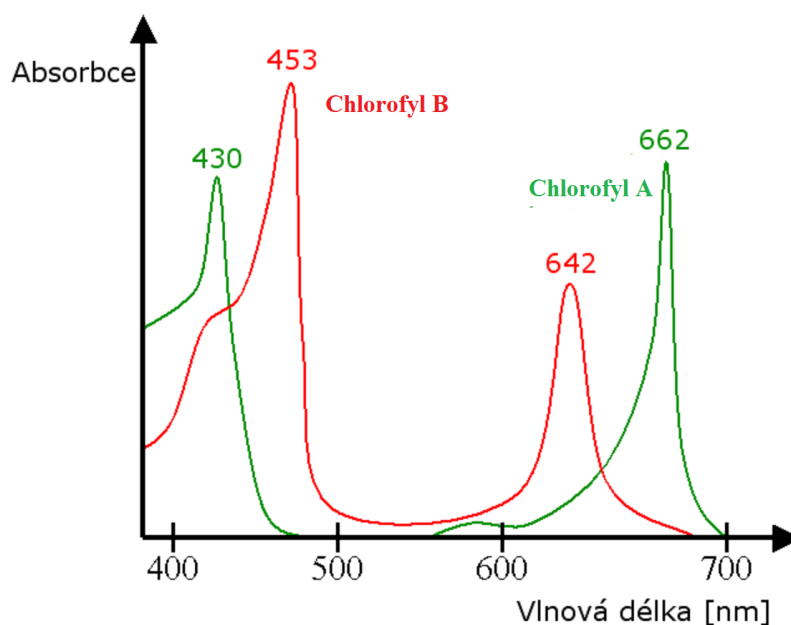
1.1.6.6 Amyloplasty

Amyloplasty jsou bezbarvé plastidy neobsahující pigmenty. Nachází se v kořenech rostlin a zásobních tkáních. Přes polymerizaci s glukózou ukládají a syntetizují škrob. Amyloplasty se mohou za přítomnosti vody a oxidu uhličitého změnit na chloroplasty, které vytváří zelené barvivo (chlorofyl). V chloroplastech jsou obsaženy thylakoidy, které jsou místem pro fotochemické reakce a jsou důležité pro proces nazývaný fotosyntéza. Máme několik druhů chlorofylů, nejčastější typy jsou chlorofyl A a chlorofyl B. Základní struktura molekuly chlorofylu je znázorněna na Obrázku 6. Různé typy vznikají navázáním odlišných skupiny na místa označena R. Chlorofyl A je hlavním pigmentem zapojeným do fotosyntézy, zatímco chlorofyl B je pomocným pigmentem, který shromažďuje energii za účelem přechodu do chlorofylu A. V chlorofylu A jsou nejúčinnějšími absorpčními vlnovými délkami spektra 429 nm a 659 nm, jenž jsou zodpovědné za fialově modrou a oranžově červenou barvu. Odráží modrozelenou barvu, která je zodpovědná za zelenou barvu většiny rostlin. Struktura chlorofylu A se skládá z chlorinového kruhu, kde čtyři atomy dusíku obklopují ionty hořčíku. V chlorofylu B jsou nejúčinnějšími absorpčními vlnovými délkami spektra 455 nm a 642 nm, ty jsou zodpovědné za fialovou a červenou barvu. Chlorofyl B dává rostlinám žlutozelenou

barvu. Srovnání spektra chlorofylu A a chlorofylu B jsou znázorněny na Obrázku 7 [52].



Obrázek 6 Základní struktura molekuly chlorofylu [52]



Obrázek 7 UV/VIS spektra chlorofylu A a chlorofylu B [52]

1.1.7 Přípravky z léčivých bylin

Bylinné přípravky se tradičně připravují několika způsoby v závislosti na typu rostliny, terapeutických složkách, způsobu a účelu aplikace. Část bylinné medicíny se zaměřuje na metodu, jak nejlépe zpracovat bylinu, aby se co nejvíce uvolnily její léčivé vlastnosti. Byliny se dají užívat vnitřně i zevně, i když většinou se jedná o účinnější léčivé látky užívané vnitřně. Přípravují se z nich nálevy (horké čaje), odvary (vařené čaje), tinktury (alkohol–vodní extrakty), macerace (namáčení za studena), přípravky určené k aromaterapii, obklady, ale i masti a balzámy. Obecným pravidlem je, že nálevy se připravují z listů a květů, zatímco odvary z kořene, kůry, semen a bobulí [47, 48].

1.2 Tvrdost vody

Vodní systémy využívají jako zdroj podzemní vodu, která při pohybu přes půdou a horniny rozpouští malá množství přirozeně se vyskytujících minerálů a přenáší je do zásob podzemních vod. Tvrdá voda je voda obsahující velké množství minerálních iontů. Nejběžnější ionty nalezené v tvrdé vodě jsou kovové kationty vápníku (Ca^{2+}) a hořčíku (Mg^{2+}), i když v určitých oblastech lze nalézt také železo, hliník a mangan. Tyto kovy se ve vodě rozpouštějí. Relativně vysoké koncentrace těchto iontů mohou nasýtit roztok a následně způsobit, že se rovnováha těchto rozpuštěných látek posune doleva, směrem k reaktantům. Jinými slovy, ionty se mohou z roztoku vysrážet. Toto vytěsnění minerálů z roztoku je zodpovědné za kalcinaci, často pozorovanou třeba pouze na vodovodních kohoutcích [53, 54].

Vodu z vodovodu lze klasifikovat do různých stupňů tvrdosti podle obsahu minerálů, které se značně odlišují podle geografického původu. Například Evropa má vodu s velmi vysokou tvrdostí (průměrná hodnota je 270 mg/l CaCO_3). Po varu se pH vzorků vody v důsledku uvolňování oxidu uhličitého zvyšuje v průměru o 0,49. Obecná pravidla pro klasifikaci vod jsou vztažena na obsah uhličitanu vápenatého ve vodě (Tabulka 1) [53, 55, 56]:

Tabulka 1 Klasifikace tvrdosti vod

CaCO_3 [mg/l]	voda
do 60	měkká
61–120	středně tvrdá
121–180	tvrdá
nad 180	velmi tvrdá

1.2.1 Dočasně tvrdá voda

Dočasně tvrdá voda je tvrdá voda, která se skládá především z iontů vápníku (Ca^{2+}) a hydrogenuhličitanu (HCO_3^-). Zahřívání způsobí, že se hydrogenuhličitanový iont v dočasně tvrdé vodě rozloží na uhličitanový iont (CO_3^{2-}), oxid uhličitý (CO_2) a vodu (H_2O). Výsledný uhličitanový iont (CO_3^{2-}) pak může reagovat s jinými ionty v roztoku za vzniku nerozpustných sloučenin, jako je CaCO_3 a MgCO_3 [54].

1.2.2 Trvale tvrdá voda

Trvale tvrdá voda se skládá z vysokých koncentrací aniontů, jako je síranový anion (SO_4^{2-}). Tento typ tvrdé vody se označuje jako „trvalá“, protože na rozdíl od dočasně tvrdé vody nelze tvrdost odstranit pouhým převařením, ale musí se použít chemické úpravy [54].

1.3 Vliv tvrdosti vody na vlastnostech nápoje z bylin

Účinnost extrakce složek čaje přímo ovlivňuje několik podmínek, jako velikosti čajových částic, teplota louhování, délka extrakce, poměr rozpouštědla k čaji, typu rozpouštědla a počet extrakcí stejného čaje [57].

Barva

Kovové ionty (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+) a anionty (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}) obsažené ve vodě mají vliv na celkové pH vody použité při přípravě čajových nálevů. Zejména vysoké koncentrace Ca^{2+} , kdy se pH vody může dostat až do alkalické oblasti ($\text{pH} > 7$) dojde k oxidaci katechinu což má za následek buďto snížení čirosti nápoje nebo změna zbarvení čajových nálevů, konkrétně do tmavšího zbarvení, než byl původní roztok [58].

Senzorické vlastnosti

Senzorické vlastnosti bylinného čaje jsou velmi rozmanité. Jejich chuťové vlastnosti jsou silně ovlivněny procesem vaření, to znamená poměrem čaje/vody, teplotou a dobou vaření a zdrojem použité vody. Nadměrné ionty Ca^{2+} v použité vodě oslabují hořkou a sladkou chuť, zvyšují svíravost a snižují celkovou senzorickou přijatelnost nálevu čaje. Vyšší pH a obsah minerálů snižují chuťové vlastnosti, a výtěžnost některých důležitých látek v nápojích. Snížením pH vody lze částečně zlepšit chuťovou kvalitu jak čaje, tak kávy [56].

Antioxidační aktivita

Antioxidační kapacita čajových nálevů je nejvíce ovlivněna koncentrací katechinů. Katechiny tvoří 70–80 % čajových polyfenolů a mají nejúčinnější antioxidační vlastnosti ve srovnání s jinými čajovými polyfenoly. Antioxidační kapacitu ovlivňuje jak pH, tak vodivost použité vody. Byly zjištěno, že čajový nálev připravený z vody s vyšším obsahem Ca^{2+} iontu vykazoval nižší koncentrace katechinů, což znamená i nižší antioxidační aktivitu než nálev připravený do vody předem upravený reverzní osmózou [58].

– Flavonoidy

V čaji extrahovaném do tvrdé vody může dojít k mírnému snížení hodnot theaflavinu a thearubiginu. Zároveň může dojít k reakci minerálních látek s čajovými polyfenolickými sloučeninami a k nárůstu vysoce polymerizovaných sloučenin, což má za následek intenzivnější zbarvení výluhu čaje. Hladiny theaflavinu a thearubiginu jsou nižší ve srovnání s čajem vařeným v destilované vodě. Čaj extrahovaný do destilované vody dával lepší výsledky než čaj extrahovaný do vody tvrdé, protože destilovaná voda neobsahuje žádné minerály [58].

– Katechiny

Jak už bylo zmíněno, tak katechiny jsou významně ovlivněny pH varného roztoku. Jsou známy tři chemické procesy, které ovlivňují stabilitu: autooxidace následuje polymerizace, epimerizace a hydrolýza. Autooxidace je oxidační proces, který není katalyzován enzymy. Enzymy, které by mohli být přítomny, jako polyfenoloxidáza a peroxidáza jsou denaturovány teplem. Vznik radikálů je považován za první krok autooxidace a je následována polymerace, při které vznikají barevné pigmenty. Kromě autooxidace/polymerizace mohou katechiny podléhat epimerizaci (konkrétně katechiny: EGCG, EKG). Epimerizace vede k přeměně epikatechinů na katechiny [54].

Dále bylo sledováno, že za kyselých podmínek (pH <6) je obsah vyšší než za neutrálních a zásaditějších podmínek, což potvrzuje jejich nestabilitu v alkalickém pH. Aby se maximalizovala extrakce a minimalizovala degradace katechinů mělo by se během vaření udržovat kyselé pH. Nejvyšší stabilita byla v nálevu připraveném do vody o pH 4,0. Při tomto pH byla také sledována nejvyšší koncentrace katechinu v nálevu, tím pádem i nejvyšší extrakční výtěžnost, což je důležité pro správné skladování čajových produktů. Největší nestabilita katechinu probíhala při pH 8,0 [60, 61, 62].

Ve studii z roku 2015 byla ke stanovení antioxidační kapacity polyfenolů v čajovém nálevu použita metoda FRAP. Bylo zjištěno, že antioxidační aktivita troloxu klesala pouze do pH 10,0. Při pH vyšším než 10 pak docházelo k ionizaci fenyhydroxylové skupiny a opět k nárůstu obsahu katechinu ve vzorku. Teplota použité vody a doba louhování má vliv na obsah polyfenolu v bylinném nálevu. Bylo zjištěno že v čaji vylouhované do vody o teplotě 98 °C a nechaném po dobu 7 minut byl zjištěn nejvyšší nárůst antioxidační aktivity [63, 64, 65, 66].

Fluoridy

Byl sledován vliv různých stupňů tvrdosti vody na extrakci fluoridu z listů sušeného čaje. Byly připraveny nálevy v koncentraci od 0–350 mg CaCO₃. Studie uvádí, že tvrdost vody má vliv na rychlost uvolňování fluoridů v čaji. Obsah fluoridů v sušeném čaji připravený ve vodě měkké byl vyšší než ve vodě tvrdé. Tukeyův test ukázal, že neexistuje významný rozdíl mezi koncentracemi fluoridů ve vodě s obsahem CaCO₃ 0,5–100 mg/l, ale významný rozdíl byl přítomný s tvrdostí vody nad 100 mg/l. Tvrdá voda brání extrakci některých složek čaje [67].

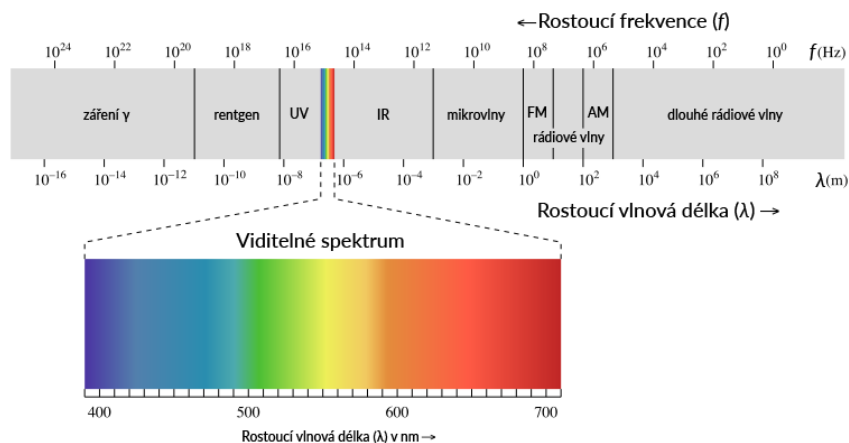
Chloroplasty

Chloroplasty mají neutrální povahu a vliv pH může částečně změnit jeho vlastnosti. Nízké pH (1–4) thylakoidů udržuje množství CO₂. V tomto prostředí se thylakoidní systém jeví jako shluky těsně naskládané vedle sebe, které však nemění svou strukturu. Při zvyšování pH na 8–9 dojde k uvolnění thylakoidů a při vhodných podmínkách (přítomnost CO₂ a vody) dojde k nastartování fotosyntézy. Naopak při ještě dalším zvýšení pH (10–11) dojde opět k vytvoření stabilní struktury, tím se zabrání oxidaci pomocí CO₂ a v chloroplastu nedojde k tvorbě pigmentů [68].

1.4 Použité metody

1.4.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je spektrální metoda, která sleduje interakce světla se vzorkem. Měření probíhá na základě pohlcování světla v různých vlnových délkách spektra. Pokud měření probíhá pouze při jedné vlnové délce, metoda se označuje fotometrie. Měření probíhá v ultrafialové oblasti (200–380 nm) a ve viditelné oblasti (380–780 nm) (Obrázek 8) [69].



Obrázek 8 Elektromagnetické spektrum [70]

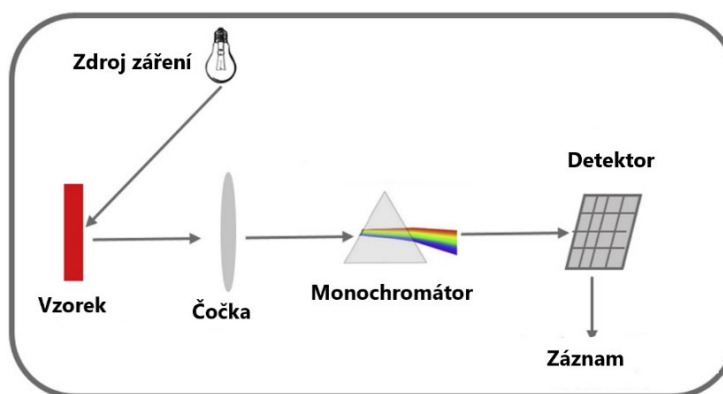
Elektromagnetické spektrum

Elektromagnetické vlny se dají rozdělovat a řadit podle různých vlnových délek/frekvencí, toto seřazení se nazývá elektromagnetické spektrum. Jsou zde zahrnuty všechny typy elektromagnetického záření, které se ve vesmíru vyskytují [70].

Viditelné spektrum—světlo, které jsme schopni vidět očima, tvoří pouze malou část ze všech existujících typů spekter. Napravo od viditelného světla jsou druhy energie, které mají nižší frekvenci (a tudíž delší vlnovou délku) než viditelné světlo. Tyto druhy energie zahrnují infračervené paprsky (IR), což jsou tepelné vlny emitované tepelnými tělesy), mikrovlny a rádiové vlny. Tyto typy záření nás neustále obklopují a nejsou škodlivé, protože mají velmi nízkou energii. Nalevo od viditelného spektra je ultrafialové záření, rentgenové záření a záření gama. Tyto druhy záření jsou pro živé organismy škodlivé, protože mají extrémně vysoké frekvence (tudíž vysoké energie). Nejvíce ničivé je záření gama, které má nejvyšší energii a frekvenci [69, 70].

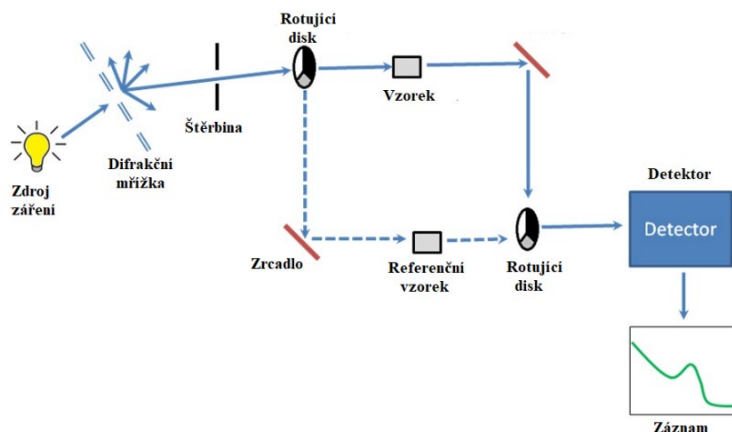
Instrumentace

Spektrofotometry máme jak jednopaprskové, tak dvoupaprskové. V jednopaprskovém spektrofotometru se nejdříve měří slepý vzorek a pak se do stejné optické dráhy vkládá vzorek měřený. Skládá ze zdroje záření (UV–deuteriová lampa, VIS–wolframová lampa), kyveta se vzorkem, monochromátor, detektor (Obrázek 9) [70].



Obrázek 9 Schéma jednopaprskového spektrofotometru [71]

Ve dvoupaprskovém spektrofotometru se měří jak slepý, tak měřený vzorek zároveň. Jeho schéma je znázorněno na Obrázku 10 [72].



Obrázek 10 Schéma dvoupaprskového spektrofotometru [72]

–Zdroj záření

Protože se jedná o UV–VIS spektrofotometr, zdroj světla potřebuje pokrýt celou viditelnou a blízkou ultrafialovou oblast. Jelikož není možné získat tento rozsah vlnových délek z jedné lampy, používá se kombinace deuteriové lampy pro UV oblast spektra a wolframové nebo halogenové lampy pro viditelnou oblast. Tento výstup je poté odeslán přes difrakční mřížku, jak je znázorněno ve schématu [72].

–Difrakční mřížka a štěrba

Paprsek světla z viditelného nebo UV světelného zdroje je pak rozdělen na jednotlivé vlnové délky pomocí difrakční mřížky. Monochromatický paprsek pokračuje do další části spektrofotometru [72].

–Rotující disky

Světlo ze štěrbiny pak dopadá na rotující disk. Každý disk se skládá z různých segmentů, neprůhledné černé části, průhledné části a zrcadlové části. Pokud světlo dopadne na průhlednou část, projde přímo vzorkovou celou, odrazí se od zrcadla, dopadne na zrcadlovou část druhého rotujícího disku a poté se shromáždí detektorem. V opačném případě světlo dopadne na zrcadlenou část, odrazí se zrcadlem, projde referenční kvyetou, dopadne na průhlednou část druhého rotujícího disku a poté se shromáždí detektorem. Pokud světlo dopadne na černou neprůhlednou část, je zablokováno a žádné světlo neprojde přístrojem, což umožňuje systému provést korekci jakéhokoli proudu generovaného detektorem v nepřítomnosti světla [72].

–Vzorková cela

Pro kapalně vzorky se používá trubice se čtvercovým průřezem utěsněná na jednom konci. Výběr kvyety závisí na následujících faktorech [72]:

- **Typ rozpouštědla** – Pro vodné vzorky se používají speciálně navržené obdélníkové křemenné, skleněné nebo plastové kyvety. Pro organické vzorky se používají skleněné a křemenné kyvety.
- **Excitační vlnová délka** – V závislosti na velikosti polovodičových nanočástic se používají různé excitační vlnové délky světla. V závislosti na vlnové délce buzení se používají různé materiály

Kyvety jsou vyrobeny z materiálů v závislosti na měření při různých vlnových délkách (Tabulka 2)

Tabulka 2 Kyvetové materiály a jejich vlnové délky [70]

Kyveta	Vlnová délka (nm)
Sklo	380–780
Plast	380–780
UV sklo	220–780
Křemen	200–900

–Detektor

Detektor převádí světlo na proudový signál, který je zaznamenán. Čím vyšší je proudový signál, tím větší je intenzita světla. Počítač následně vyhodnotí absorbanci [72].

1.4.2 Barevnost

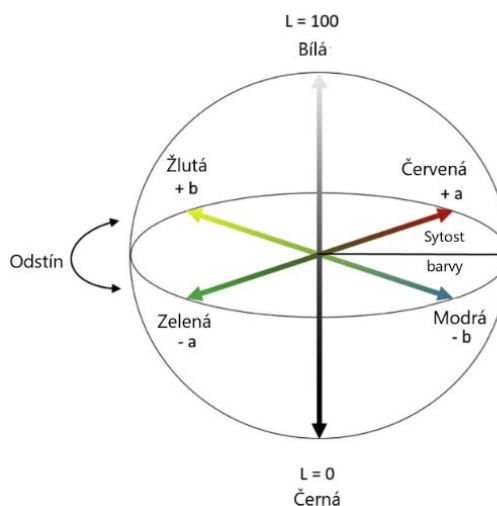
Měření barvy v potravinářském průmyslu je důležitým kvalitativním atributem potravinářských výrobků, který ovlivňuje výběr spotřebitele. Vzhledem k tomu, že vizuální posouzení barev může být ovlivněno širokou škálou faktorů, od světelných podmínek a úhlu pozorování až po individuální rozdíly ve vnímání barev, poskytuje přístrojové vybavení pro měření barevnosti subjektivní kontrolu kvality barev. Systémy pro měření barev se používají k měření široké škály potravinářských výrobků, příkladem je čerstvé ovoce a zelenina, mléčné výrobky, masné výrobky, koření, obiloviny, oleje, sirupy, cukr a nápoje [73, 74, 76].

Kontrola potravinářských výrobků se provádí pomocí přístrojového vidění, analýzou a zpracováním, kdy musí být známy parametry každého pixelu na povrchu zaznamenávaného výrobku. Použitím různých barevných prostorů se získá kvantitativní barevná hodnota. Ačkoli existuje mnoho různých barevných prostorů, pokud jde o potraviny, nejčastěji používaný je barevný prostor CIE (Mezinárodní komise pro osvětlování) $L^*a^*b^*$, a to kvůli jeho

rovnoměrnému rozložení barev, a protože vnímání barev v tomto systému je nejvíce podobné vnímání barev lidským okem [76].

1.4.2.1 Měření barevnosti

Souřadnice $L^*a^*b^*$ vyjadřuje jeden barevný parametr. Parametr L^* vyjadřuje, zda se jedná o barvu světlou nebo tmavou, vyjadřuje její jas. Na ose a^* se nachází barvy od zelené po červenou a na ose b^* od žluté po modrou (Obrázek 11) [70, 77].



Obrázek 11 Diagram barevného prostoru [74]

Systém měření barev CIE transformuje odrazové nebo propustné spektrum objektu do trojrozměrného barevného prostoru pomocí spektrálního rozložení výkonu osvětlení a funkcí přizpůsobení barev standardních pozorovatelů. Systém je založen na trichromatickém principu pomocí čísel X/Y . Číslo X vyjadřuje, pod jakým úhlem světlo dopadá a Y pod jakým úhlem se světlo odráží. Pro měření se využívají uspořádání $0^\circ/45^\circ$ a $45^\circ/0^\circ$ nebo $d/8^\circ$ a $8^\circ/d$, přičemž písmeno „d“ uvádí difúzní osvětlení [73, 78].

Transmitance je veličina, která udává kolik procent světla ze zdroje projde vzorkem na detektor. Sleduje se průchodnost vzorku. Z hlediska matematiky se jedná o poměr intenzity toku světla, které projde na detektor, a intenzity toku světla ze zdroje. Transmitance nabývá hodnot mezi 0 a 1, respektive 0–100 %. Výpočet absorbance z transmitance vyjadřuje Rovnice 1. Absorbance udává míru absorpce světla zkoumaným vzorkem a lze ji vyjádřit na základě Lambert–Beerova zákona, a to podle Rovnice 2 [72, 78]:

$$A = -\log T \text{ nebo } A = 2 - \log(\%T) \quad (1)$$

A... absorbance

T...transmitance

$$A = \varepsilon \times c \times l \quad (2)$$

A...absorbance

ε ...molární absorpční koeficient [$dm^3 \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$]

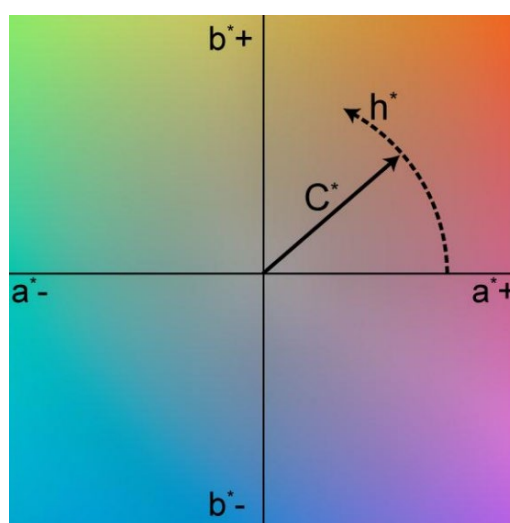
c...koncentrace [$mol \cdot dm^{-3}$]

l... délka absorpčního prostředí [cm]

Lambert-Beerův zákon říká, že absorbance vzorku je přímo úměrná koncentraci stanovované látky, délce absorpčního prostředí a charakteristické konstantě, která se nazývá absorpční koeficient. Absorbance nabývá hodnot od nuly (vzorek neabsorbuje) až do nekonečna (vzorek absorbuje veškeré světlo) [79, 80].

Při měření reflektance je světlo rozptylováno všemi směry, a proto jsou některé spektrometry určené pro měření reflektance vybaveny zařízením, které se jmenuje integrační koule. Integrační koule mají kulovitý tvar a vnitřní stěnu vyrobenou z materiálu rozptylujícího světlo, jako je síran barnatý, s vysokou odrazivostí. Integrační koule účinně způsobují, že se světelný paprsek (měřicí světlo) vstupující do koule rovnoměrně rozptyluje. Tato metoda je používána zejména u pevných vzorků, kdy světlo ze zdroje je mnohonásobně rozptýleno vzorkem [79, 82].

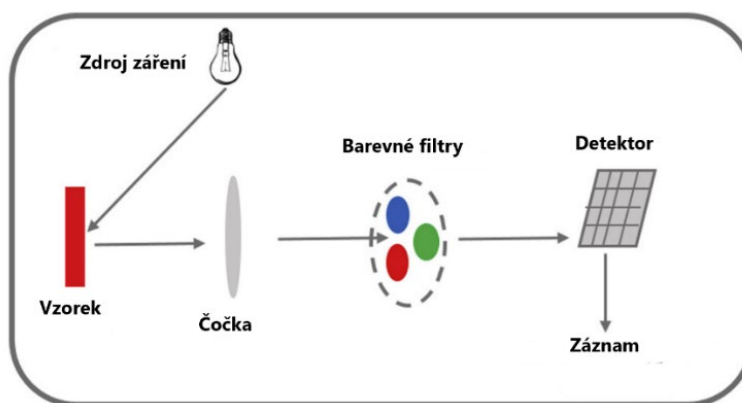
Dále používáme prostor $L^*C^*h^\circ$, kde L^* je vyjádřením jasu sledované barvy, parametr C^* vyjadřuje, jak je barva sytá a zvětšuje se s rostoucí vzdáleností od osy L^* , parametr h° (Obrázek 12) znázorňuje odstín sledované barvy a je určen úhlem mezi kladnou poloosou a^* a barevným vektorem. Nabývá tedy hodnot 0–360°, kdy hodnota 0° náleží červené barvě, 90° žluté barvě, 180° zelené barvě a 270° barvě modré [77, 78].



Obrázek 12 Zobrazení prostoru průřezu barevného prostoru [78]

Barevný prostor RGB kde snímač v každém pixelu zaznamenává intenzitu světla v červeném, zeleném a modrém spektru, je také podobný lidskému vnímání barev a je také často používán. Výběr přístrojů pro zjištění barevnosti závisí na typu potravinářského produktu a použití. Na základě optických vlastností jsou potravinářské výrobky klasifikovány jako neprůhledné (rajčata, sýr, mouka a rýže), průsvitné (ovocné šťávy a džemy) a transparentní (nealkoholické nápoje a olej) [75, 80].

Při měření barev se používají dva principy kolorimetrie a spektrofotometrie. Kolorimetrie (Obrázek 13) kvantifikuje barvu měřením tří primárních barevných složek světla, které vidí lidské oko, červené, zelené a modré. V tomto principu sekundární a terciární barvy jako žlutá, oranžová nejsou jednotlivě kvantifikovány. Přístroje využívající kolorimetrický princip se obecně nazývají chromometry nebo kolorimetry. Zaznamenávají barvu téměř stejně jako lidské oko. Při spektrofotometrii se měří spektrální odrazivost nebo propustnost produktu v celém spektru viditelného světla (400–700 nm). Přístroje využívající tento princip se nazývají spektrofotometry. Používají se při formulaci a kontrole kvality požadovaných barev v připravených potravinářských produktech, ve výzkumu a vývoji nových produktů [82, 83].



Obrázek 13 Schéma kolorimetru [76]

1.4.3 Stanovení chelatační aktivity

Stanovení chelatační aktivity je založeno na komplexometrické reakci mezi antioxidantem a kovem a následném měření absorbance nejčastěji ve viditelné oblasti. Jako chelatační činidlo se používá síran železnatý nebo ferozzin. Ionť kovu Fe^{2+} má schopnost přenášet jednotlivé elektrony a udržovat tvorbu volných radikálů ziskem nebo ztrátou elektronů. Snížení tvorby reaktivních forem kyslíku lze tedy dosáhnout chelataci kovových iontů s chelatačními činidly. Chelatační činidlo omezující přenos kovových iontů. Z Fe^{2+} iontů lze vytvořit mnoho radikálových reakcí, které díky jeho schopnosti přenášet jednotlivé elektrony, počínaje dokonce i relativně nereaktivními radikály [83,84].

Chelatační aktivitu lze vypočítat pomocí rovnice 3:

$$\text{chelatační aktivita kovů} = \frac{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{vzorek}}}{A_{\text{kontrola}}} \times 100 \quad (3)$$

Kde A_{kontrola} je absorbance kontrolní reakce (například bez rostlinného extraktu) a A_{vzorek} je absorbance v přítomném vzorku [84].

1.4.4 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidant je molekula, která inhibuje oxidaci jiných molekul. Oxidace je chemická reakce, která přenáší elektron nebo vodík z látek na oxidační činidlo. Oxidační reakce mohou produkovat volné radikály [86, 87].

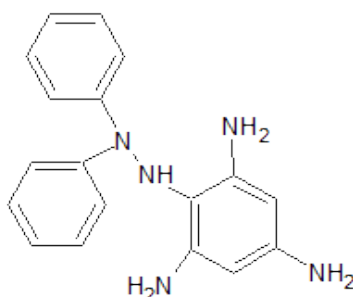
Antioxidanty hrají důležitou roli při konzervaci potravin tím, že inhibují oxidační procesy a přispívají k podpoře zdraví, kterou poskytují mnohé doplňky stravy. Antioxidační aktivitu lze monitorovat řadou testů s různými mechanismy, včetně přenosu atomu vodíku, přenosu jednoho elektronu, chelatace kovů a další [88].

Metody stanovení antioxidační aktivity můžeme rozdělit do dvou základních skupin, a to na metody chemické a fyzikální. Chemické metody jsou založeny na použití činidel, které poskytující s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty, jejichž vzniku brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Intenzita zabarvení se měří spektrofotometricky a rozdíl v hodnotách absorbancí měřeného a slepého vzorku pak udává obsah látek s antioxidačními účinky. Srovnání hodnot poskytovaných jednotlivými metodami je velmi nesnadné, neboť jak antioxidanty, tak reaktivní látky, které způsobují oxidační změny je celá řada. Fyzikální metody nesledují bezprostředně chemickou reakci nebo změny obsahů jednotlivých látek, ale sledují změny fyzikálních vlastností, které tyto procesy provázejí [84, 88].

1.4.4.1 Metoda DPPH

Metoda vycytávání radikálů s DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-nitrofenyl)hydrazyl) (Obrázek 14) se široce používá k hodnocení schopnosti přírodních antioxidantů pohlcovat volné radikály. DPPH je stabilní volný radikál na bázi dusíku, který má fialovou barvu, která se po redukci buď procesem přenosu vodíku nebo elektronu změní na žlutou. Látky, které jsou schopny tuto reakci provést, lze považovat za antioxidanty, a tedy za lapače radikálů. V radikálové formě má molekula DPPH absorbanci při 517 nm, která mizí po přijetí elektronového nebo vodíkového radikálu z antioxidační sloučeniny a stává se stabilní molekulou. Zaznamenává se

procento inhibice [89, 90].



Obrázek 14 Strukturní vzorec 1,1- difenyl-2-(2,4,6-nitrofenyl) hydrazylu

1.4.4.2 Metoda FRAP

Metoda FRAP je založena na redukcí železitých komplexů, které jsou téměř bezbarvé a po redukcí a reakci s činidlem vytvářejí intenzivně modré komplexy. Při této metodě redukují antioxidanty ze vzorku činidla Fe^{2+} -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) zkráceně nazývaný TPTZ. Množství komplexu Fe^{2+} -TPTZ odpovídá nárůstu absorbance při 593 nm a je mírou antioxidační aktivity vzorku. Měření probíhá při nízké hodnotě pH (pH=3,6), kdy nejsou zachyceny komplexem pomalu reagující polyfenolické látky a thioly, navíc vznikající Fe^{2+} je jedním z reaktantů Fentonovy reakce. Metoda FRAP tak odráží pouze schopnost látek redukovat ion Fe^{3+} a s celkovou antioxidační aktivitou vzorku nemusí pozitivně korelovat. Fentonova reakce je chemická reakce při které dochází k redukcí H_2O_2 pomocí kovů Fe^{2+} a Cu^+ za vzniku hydroxylových radikálů [91, 92].

1.4.5 Stanovení fenolických látek

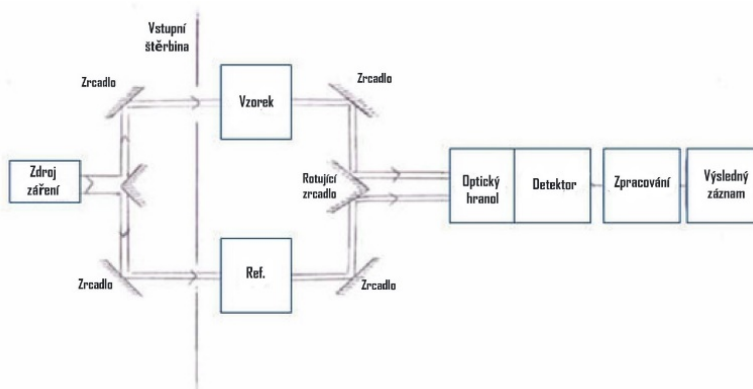
Při stanovení fenolických látek se používá činidlo Folin–Ciocalteu (FC). Činidlo obsahuje směs fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny. Tato metoda je založena na chemické redukcí činidla v alkalickém prostředí. Redukce se projeví vznikem modře zabarveného roztoku, kdy se měří jeho absorbance ve VIS oblasti. Jako standart lze použít kyselinu gallovou, kávovou nebo katechin. Výsledky vyjadřujeme jako ekvivalent použitého standartu [90, 93].

1.4.6 Stanovení flavonoidů

Při stanovení flavonoidů se používají reakce založené na tvorbě komplexu hliníku. Jako činidlo se nejčastěji používá chlorid hlinitý v kyselém prostředí. Při reakci AlCl_3 s flavonoidy obsaženými ve vzorku dochází ke vzniku žlutého zabarvení. Roztok je dále měřen spektrofotometricky při vlnové délce 415 nm. Jako standart na vyjádření celkového obsahu flavonoidů ve vzorku se používá katechin, rutin, kvercetin [94, 95]

1.4.7 Infračervená spektroskopie

Infračervená (IR) spektroskopie (Obrázek 15) je jednou z nejběžnějších a nejrozšířenějších spektroskopických technik využívaných zejména v anorganické a organické chemii. Chemické sloučeniny mají různé chemické vlastnosti v důsledku přítomnosti různých funkčních skupin [96].



Obrázek 15 Schéma disperzního IR spektrometru [97]

Infračervená spektroskopie je studium interakce infračerveného světla s hmotou, kterou lze použít k identifikaci neznámých materiálů, zkoumání kvality vzorku, nebo stanovení množství složek ve směsi. Infračervené světlo vyzařuje elektromagnetické záření v rozmezí $13000\text{--}10\text{ cm}^{-1}$ (odpovídající vlnová délka od $0,78\text{--}1000\text{ }\mu\text{m}$) [96].

Infračervená oblast se dále dělí na tři podoblasti (Tabulka 3):

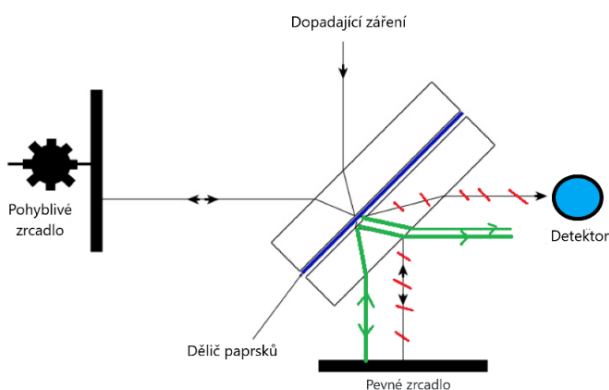
Tabulka 3 IČ oblasti [104]

Blízká IČ	$13000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$; $0,78\text{--}2,5\text{ }\mu\text{m}$
Střední IČ	$4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$; $2,5\text{--}25\text{ }\mu\text{m}$
Vzdálená IČ	$400\text{--}10\text{ cm}^{-1}$; $25\text{--}1000\text{ }\mu\text{m}$

Nejčastěji se používá střední infračervená oblast, kde molekuly snadno absorbují záření, aby vyvolaly vibrační excitaci funkčních skupin. Průchodem infračerveného světla vzorkem a měřením absorpce nebo propustnosti světla při každé frekvenci se získá infračervené spektrum s vrcholy odpovídajícími frekvenci absorbovaného záření. Protože všechny skupiny mají své charakteristické vibrační frekvence, informace o molekulární struktuře lze získat ze spektra. Infračervená spektroskopie je schopna analyzovat vzorky téměř v jakékoli fázi (kapalina, pevná látka nebo plyn) a lze ji použít samostatně nebo v kombinaci s jinými přístroji po různých postupech vzorkování. Kromě základních vibračních módů se ve spektru objevují i další faktory, jako jsou kombinační pásma a vazebné a vibrační rotační pásma [96, 97].

V poslední letech byly vyvinuty také aplikace blízké infračervené spektroskopie (NIR). NIR se používá pro různé aplikace, jako je odhad kvality a kontrola kvality různých potravinářských, zemědělských a farmaceutických produktů. Existuje také mnoho výzkumů založených na NIR v kontrole kvality bylin a analýze hlavního obsahu. Metoda je jednoduchá na přípravu vzorku, rychlá a lze současně analyzovat několik analytů v jednom vzorku. NIR spektra v kombinaci s vhodnými matematickými modely a technikami lze použít ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení různých produktů [98, 99, 100].

Nejčastěji používanými přístroji v infračervené spektroskopii je disperzní infračervený spektrometr a infračervený spektrometr s Fourierovou transformací. Mezi základní součásti disperzního IR spektrometru patří zdroj záření, monochromátor a detektor. Obecně mají disperzní spektrometry dvoupraprskovou konstrukci se dvěma ekvivalentními paprsky ze stejného zdroje, které procházejí vzorkovou a referenční komorou. Tyto referenční a vzorkové paprsky jsou střídavě zaostřovány na detektor pomocí optického přerušovače, jako je sektorové zrcadlo. Jeden paprsek bude postupovat a bude procházet vzorkem, zatímco druhý paprsek bude procházet referenčním materiálem pro analytické srovnání [96, 98].



Obrázek 16 Schéma Michelsonova interferometru [97]

Detektory jsou zařízení, která převádějí analogový spektrální výstup na elektrický signál. Tyto elektrické signály jsou dále zpracovávány počítačem pomocí matematického algoritmu. Detektory používané v IR spektrometrech lze klasifikovat buď jako fotonové/kvantové detektory nebo tepelné detektory [98, 101].

Velmi rozšířené jsou spektrometry s Fourierovou transformací (FTIR). Hlavním rozdílem mezi FTIR spektrometrem a disperzním IR spektrometrem je Michelsonův interferometr. Michelsonův interferometr (Obrázek 16) se používá k rozdělení jednoho paprsku světla na dva tak, aby dráhy obou paprsků byly různé. Poté Michelsonův interferometr tyto dva paprsky

spojí a vede je do detektoru, kde se měří rozdíl intenzity těchto dvou paprsků jako funkce rozdílu drah [98, 101].

1.4.8 ICP/MS

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je ultrastopová analytická metoda zabývající se prvkovou a izotopovou analýzou pro vzorky s širokým rozsahem koncentrací. Kapalný vzorek v tomto systému je nasáván peristaltickou pumpou do zmlžovače za vzniku aerosolu. Aerosol následně prochází mlžnou komorou do ICP, kde dochází k odpaření použitého rozpouštědla, atomizaci vzorku a ionizaci atomů, které jsou vedeny do hmotnostního spektrometru. Na rozdíl od ICP, který pracuje za atmosférického tlaku (760 torr), hmotnostní spektrometr pracuje za hlubokého vakua (10^{-5} – 10^{-6} torr), tím se tvoří tlakový gradient, který slouží jako hnací síla. Ionty jsou fokusovány do iontového paprsku, který je zaostřen pomocí fokusačních elektrod. Vzniklý fokusovaný paprsek iontu je následně veden do kvadrupólového hmotnostního analyzátoru. Tento hmotnostní analyzátor je tvořen čtyřmi kovovými tyčemi, kde vždy na dvě protilehlé tyče je vedeno stejné kladné a stejné záporné stejnosměrné napětí. Na všechny tyče zároveň je aplikováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Tato kombinace umožňuje průchod iontu o předem určené hodnotě m/z . Možnou změnou napětí lze proměřit celé hmotnostní spektrum. K detekci iontu se využívá iontový násobič [102].

1.4.9 Měření pH a elektrické vodivosti

pH je mírou koncentrace vodíkových iontů v roztoku a vyjadřuje stupeň kyselosti nebo zásaditosti roztoku. Měření probíhá pomocí dvou elektrod, které jsou často kombinovány v jedné zaváděcí sondě. Skleněné trubice obsahující roztok s konstantním pH (pufr) a vodič s referenční elektrodou obsahující referenční elektrolyt. U kombinované elektrody jsou pH a referenční elektrody umístěny v jedné sestavě sondy [103].

Konduktometrie je založena na měření elektrické vodivosti roztoku. Hodnota vodivosti závisí na množství iontu přítomných v roztoku a na jejich pohyblivosti. Čím více iontů roztok obsahuje, tím větší má i vodivost. Základní jednotkou konduktivity je $S \cdot m^{-1}$, častěji se používá jednotka $S \cdot cm^{-1}$. Konduktometr se skládá ze dvou elektrod na jednu z nich se vkládá střídavé napětí. Střídavé napětí způsobí pohyb iontů v měřeném roztoku mezi elektrodami [104].

1.4.10 Chelatometrické stanovení vápníku a hořčíku

Chelatometrickou titrací lze stanovit prakticky všechny kationty kovů s nábojem $2+$. Používá se disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), která má obchodní název Chelaton 3. Chelaton reaguje s kovovými ionty za vzniku komplexních aniontů rozpustných ve vodě, kdy se zároveň uvolňují ionty H^+ . Rovnováhy jsou tedy ovlivňovány koncentrací H^+ iontů, a proto je nutné používat tlumivé roztoky. Z povahy titračního činidla vyplývá, že jedna molekula chelatovného činidla reaguje vždy s jedním iontem kovu bez ohledu na jeho oxidační číslo. Pro určení bodu ekvivalence se využívá metalochromní indikátor. Eriochromová čerň T tvoří s vápenatým a hořečnatým iontem při pH 10 v prostředí amoniakálního tlumivého roztoku višňově červený komplex. Bod ekvivalence je určen modrou barvou volného indikátorového iontu. Metoda je vhodná pro společné stanovení obsahu vápníku a hořčíku ve vodách.

2 Experimentální část

V této části práce byla popsána příprava a analýza nálevu z kořene omanu pravého. Byl sledován vliv pH na barevnost nálevů za použití spektrofotometru UltraScan VIS. Spektrofotometrické metody byly měřeny v rozsahu vlnových délek od 380 do 780 nm, kdy se vzorek jeví jako barevný. Mezi spektrofotometrické metody byla zařazena chelatační aktivita, stanovení antioxidační kapacity, stanovení celkového obsahu fenolických látek, flavonoidů a katechinů. Jako přístroj byl použit spektrofotometr UV-VIS Shimadzu UV-2600. Byla měřena infračervená spektra, a to pomocí přístroje Nicolet iS50 FT-IR. Měření probíhalo v rozsahu 400–4000 cm^{-1} a to v počtu skenu 64. IČ spektra jsou vyjádřena jako závislost absorbance na vlnočtu. Při stanovení minerálních látek ve vzorku kořene omanu pravého byla nejdříve provedena mineralizace vzorku pomocí tlakové mineralizačního zařízení Speedwave Xpert a následně byl použit kvadrupólový hmotnostní spektrometr Agilent 7900.

2.1 Chemikálie

- Destilovaná voda (Univerzita Pardubice, ČR)
- Methanol $\geq 99,9\%$ (Honeywell, Morristown, USA)
- Ethanol 96% (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Hydrogen uhličitán sodný (Lachema n. p. Brno)
- Síran vápenatý (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Síran hořečnatý (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Chlorid draselný (PENTA, s.r.o., Praha, ČR)
- Hexahydrát chloridu železitého (PENTA, s.r.o., Praha, ČR)
- Hexahydrát chloridu hlinitého (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR) Ethanol 96% (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- DPPH radikál, 1,1-difenyl-2-(2,4,6-nitrofenyl) hydrazyl (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Dusitan sodný (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Ferrozin (3-(2-Pyridyl)-5,6-difenyl-1,2,4,-triazin-p,p'-hydrát monosodné soli disulfonové kyseliny) (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Tetrahydrát chloridu železnatého (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Hydroxid sodný (PENTA, s.r.o., Praha, ČR)
- Kyselina gallová (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)

- TPTZ, 2,4,6,-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Trolox, kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Vanillin (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Kyselina chlorovodíková 35% (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Kyselina octová 99% (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Octan sodný (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Uhlíčan sodný (J. T. Baker, Deventer, Holandsko)
- Kyselina dusičná (1:3) (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Peroxid vodíku (30 %) (Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
- Chlorid sodný (PENTA, s.r.o., Praha, ČR)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (Lachema n. p. Brno, ČR)
- Xylenová oranž (P-LAB, a.s., Praha, ČR)
- Eriochromová čern T (Lachema n. p., Brno, ČR)
- Urotropin (hexamethylentetraamin) (Chempur, Německo)

2.2 Přístroje

- Analytické váhy KERN ABT 220-4 M (Kern & Sohn, Balingen, Německo)
- pH-metr SCHOTT (SCHOTT AG, Mainz, Německo)
- Nicolet iS50 FT-IR (Nicolet CZ, Praha, ČR)
- Centrifuga Sorvall ST4 Plus–MD (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Konduktometr Handylab LF1, Schott, Německo
- Spektrofotometr UltraScan VIS (HunterLab, Reston, USA)
- Spektrofotometr UV-VIS Shimadzu UV-2600 (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- Kvadrupólový hmotnostní spektrometr Agilent 7900 (Q-ICP-MS, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)
- Speedwave Xpert (Obersalzberg, Berchtesgaden, Německo)
- běžné laboratorní vybavení

2.3 Příprava bylinných nálevů

Jako vzorek byl použit sušený kořen *Inula helenium*. Ten byl proset přes síto s velikostí ok 3,15 mm podle ČSN 15 3330. Dále byla připravena voda na přípravu bylinných nálevů, a to ve třech úrovních tvrdosti (středně tvrdá, velmi tvrdá a uhličitánová). Na analytických vahách bylo naváženo přesné množství NaHCO₃, CaSO₄, MgSO₄ a KCl (Tabulka 4) a rozpuštěno v destilované vodě. Dále je demineralizovaná voda značena jako DEMI, středně tvrdá voda jako STV, velmi tvrdá voda jako VTV a uhličitánová voda jako HCO₃⁻.

Tabulka 4 Chemické složení vod použité k experimentální části

g/l	NaHCO ₃	CaSO ₄	MgSO ₄	KCl
Středně tvrdá	0,096	0,060	0,060	0,004
Velmi tvrdá	0,384	0,240	0,240	0,016
Uhličitánová	0,384	–	–	–

Postup

Na přípravu bylinného nálevu bylo na předvážkách naváženo do čajového sáčku 2 g sušeného a prosetého kořene. Den předem připravená voda o různé tvrdosti (Tabulka 4) byla zahřívána k varu. Var byl udržován přesně 1 minutu. Voda byla odměřena ve 250 ml válci s úrovní tolerance ±1,6 ml na objem 200 ml. U vody bylo následně změřeno pH, vodivost a stanovena celková tvrdost. Čajový sáček byl vložen do varem upravené vody a louhován 10 minut. Po uplynutí této doby byl pomocí skleněné tyčinky sáček odstraněn a takto připravený bylinný nálev byl ochlazen proudem studené vody. Připravené nálevy byly uchovány na chladném stinném místě po dobu čtyř dnů. Během doby uchovávání byla změřena barevnost nálevu a pH. Část nálevu byla každý den odebrána, zmrazena, aby byl vzorek zachován pro stanovení antioxidačních vlastností.

2.4 Statistické zpracování dat

Pro vzorek kořene omanu pravého byly ze stejně připravené vody zhotoveny vždy dva nálevy. Analýza každého extraktu byla opakována 2× (N=4). Výsledky stanovení byly vyhodnoceny na základě aritmetického průměr ± směrodatná odchylka. Naměřená data byla zpracována v programu Excel (MS Office v., Microsoft, Albuquerque, NM, USA), v němž byly hodnoty i zpracovány. Párové porovnání bylo provedeno s použitím studentova t-testu v programu Excel. Písmena ^A a ^B označují statisticky významný rozdíl vyhodnoceného t-testu na hladině pravděpodobnosti $\alpha=0,05$. Pokud bylo $p>0,05$, platila nulová hypotéza, a tedy shodnost

výsledků v rámci hladiny statistické významnosti $\alpha = 0,05$. Pokud $p < 0,05$, platila alternativní hypotéza, která vyvracela shodnost v rámci hladiny statistické významnosti $\alpha = 0,05$. Parametry barevnosti byly vypočítány s využitím softwaru EasyMatch QC (HunterLab, Reston, VA, USA).

2.5 Postupy analýzy vzorku omanu pravého

Pevný vzorek byl použit pouze na stanovení obsahu minerálních látek metodu ICP/MS. V připravených nálevkách bylo změřeno pH, barevnost, spektrofotometrické metody, infračervená spektra, VIS spektra. Mezi spektrofotometrické metody bylo zařazeno stanovení chelatační aktivity, antioxidační aktivity, celkového obsahu fenolických látek, celkového obsahu flavonoidů a stanovení obsahu katechinů.

2.5.1 Měření pH

Pomocí předem kalibrovaného pH metru bylo změřeno pH jednotlivých nálevů a vod použitých k přípravě, a to před varem a po varu. U připravených bylinných nálevů bylo pH změřeno pomocí skleněné elektrody. Elektroda byla před samotným měřením kalibrována na pufrů o hodnotách pH 4, 7 a 9.

2.5.2 Měření elektrické vodivosti a chelatometrické stanovení vápníku a hořčíku

Na měření elektrické vodivosti byl použit konduktometr Handylab LF1. Měření probíhalo za laboratorní teploty (25 °C). Chelatometrické stanovení sumy vápníku a hořčíku bylo provedeno podle následujícího postupu:

Činidla:

Tlumivý roztok: 54 g chloridu amonného bylo rozpuštěno ve 100 ml vody za tepla a bylo přidáno 350 ml vodného roztoku amoniaku a doplněno po rysku.

Eriochromová čern T: 0,5 g eriochromové černě T bylo smícháno se 100 g chloridu sodného.

0,02M roztok chelaton 3 (Ch3): Roztok byl připraven navážením 7,4369 g Ch3 do 1 l destilované vody. Přesná koncentrace byla stanovena pomocí $Pb(NO_3)_2$. Navážka $Pb(NO_3)_2$ byla rozpuštěna v 50–100 ml destilované vody a okyselena několika kapkami 1M HNO_3 . Po přidání xylenolové oranž bylo upraveno pH přidávkem urotropinu do vzniku fialově červeného zbarvení a byla provedena titrace chelatonem do žlutého zbarvení.

Postup:

Do titrační baňky bylo odpipetováno 20 ml vzorku, přidáno 2 ml tlumivého roztoku

a eriochromová čerň T. Směs se titrovala roztokem chelatonu 3 do jasně modrého zbarvení. Celková koncentrace vápníku a hořčíku byla vyjádřena v mmol/l.

Použité výpočty: Teoretická navážka

$$\begin{aligned}m &= M_{\text{Ch3}} \times c_{\text{Ch3}} \times v_{(l)} \\m &= 372,252 \times 0,02 \times 1 \\m &= 7,4450 \text{ g}\end{aligned}$$

Praktická navážka

$$c = \frac{7,4369}{372,252 \times 1} = 0,01996 \text{ mol/l}$$

Výpočet tvrdosti středně tvrdé vody:

$$\begin{aligned}c_1 \times V_1 &= c_2 \times V_2 \\19,98 \times 0,775 &= c_2 \times 20 \\c_2 &= 0,7742 \text{ mmol/l}\end{aligned}$$

2.5.3 Měření barevnosti

Barevnost byla měřena na přístroji UltraScan VIS, (Obrázek 17). Spektrofotometr využívá integrační kouli s geometrií $d/8^\circ$ s automatickým začleněním nebo vyloučením zrcadlové složky a s pulsní xenovou lampou–D65. Vzorky jsou dle CIE měřeny v rozsahu 380–780 nm (krok 10 nm) [105].



Obrázek 17 UltraScan VIS pro měření barevnosti [105]

U přístroje byla nejdříve provedena standardizace pomocí destilované vody, a to každý den před měřením. Standardizace byla provedena na černou barvu pomocí černé destičky a následně na bílou barvu pomocí bílé kachličky (přiloženy k přístroji). Vzorky byly

i se sedimentem promíchány a byly měřeny ve skleněné s optickou dráhou 10 mm. Po standardizaci byla kyveta naplněna vzorkem a následně změřena barevnost roztoku. Měření probíhalo při celkové transmitanci (TTRAN).

Měřeny byly parametry L^* , a^* , b^* ze kterých byl následně vypočten parametr ΔE^* (Rovnice 4). Celkové rozdíly barev v systému CIE lze vyjádřit buď jako souřadnice barevného prostoru nebo jako korelace světla, sytosti a odstínu (ΔE^*). ΔE^* je definována jako rozdíl mezi dvěma barvami v barevném prostoru $L^*a^*b^*$. Pro snadnější porovnání a představu o barevnosti vzorku byly číselné hodnoty odchylek vztaženy na vnímání lidským okem (Tabulka 5) [78, 106].

$$\Delta E^* = \sqrt{(L_{vzorek}^* - L_{standard}^*)^2 + (a_{vzorek}^* - a_{standard}^*)^2 + (b_{vzorek}^* - b_{standard}^*)^2} \quad (4)$$

Tabulka 5 Srovnání ΔE^* na základě vjemu lidským okem [106]

ΔE^*	
<1	Okem nepostřehnutelný rozdíl
1–2	Okem velmi nepatrný rozdíl
2–3,5	Střední rozdíl, okem pozorovatelný
3,5–5	Okem zřejmý rozdíl
>5	Okem velmi zřejmý rozdíl

Dále byly měřeny další parametry v barevném prostoru L^* , C^* , h° . Z těchto hodnot byla vypočtena podle rovnice 5 takzvaná stínová odchylka (ΔH^*).

$$\Delta H^* = \sqrt{(\Delta E^*)^2 - (L_{vzorek}^* - L_{standard}^*)^2 - (C_{vzorek}^* - C_{standard}^*)^2} \quad (5)$$

2.5.4 Spektrofotometrické analýzy

Vzorky byly den předem vyjmuty z mrazáku a rozmraženy. Jednotlivé vzorky byly odstředěny na centrifuze (Sorvall ST4 Plus – MD, 2000 rpm, 5 minut), kdy přítomný sediment ze vzorku kořene klesl na dno vialky a mohl tak být k měření použit pouze čirý roztok nálevu. Ke spektrofotometrickému měření byl použit přístroj UV–VIS Shimadzu UV–2600, kdy byly vzorky měřeny ve skleněných kyvetách (10 mm). Pouze u stanovení chelatační aktivity byly použity plastové kyvety (10 mm). Byla stanovena chelatační aktivita, antioxidační aktivita pomocí metody DPPH a FRAP, celkový obsah flavonoidů, celkový obsah fenolických látek a stanovení katechinů.

2.5.4.1 Stanovení chelatační aktivity

Bylo pipetováno 1 ml vzorku, ke kterému bylo přidáno 50 μ l 2 mM FeCl₂ a 200 μ l 5mM ferrozinu. Vzniklá směs byla umístěna na 10 minut do tmavého prostředí a následně byla proměřena absorbance při 562 nm. Stejným způsobem byly připraveny i slepé pokusy, které místo vzorku obsahovaly destilovanou vodu. Chelatační aktivity vzorků byly vyjádřeny v procentech inhibice (Rovnice 6).

$$\text{Inhibice \%} = \frac{A_{sl} - A_{vz}}{A_{sl}} \times 100 \quad (6)$$

A_{sl} ...absorbance slepého pokusu

A_{vz} ...absorbance vzorku

2.5.4.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Nejprve byla provedena optimalizace metody (Příloha 1). Byl připraven methanolický roztok DPPH radikálu navážením 12,5 mg činidla do 500 ml odměrné baňky. Bylo pipetováno 5 ml roztoku radikálu DPPH a 100 μ l 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. Stejným způsobem byly připraveny i slepé pokusy, které místo vzorku obsahovaly destilovanou vodu. Byla připravena kalibrační řada ze zásobního roztoku Troloxu. Zásobní roztok byl připraven navážením 100 mg Troloxu do 100 ml odměrné baňky a doplněn methanolem po rysku. Ze zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada v rozmezí 10–100 mg Troloxu na litr (Příloha 5). Kalibrační řada byla pak proměřena stejným způsobem jako vzorky. Naměřené hodnoty byly následně přepočítány na procento inhibice. Antioxidační aktivita vzorků byla vyjádřena ve formě ekvivalentů Troloxu, a to vypočtením z rovnice regrese kalibrační řady závislosti inhibice na koncentraci Troloxu [107].

2.5.4.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP

Nejprve byla provedena optimalizace metody (Příloha 2). Byla připravena reakční směs smícháním 20mM FeCl₃, 10mM roztoku TPTZ ve 40mM HCl a 0,3M octanového pufru o pH 3,6. Uvedené látky byly smíchány v poměru 1:1:10. Ke stanovení bylo pipetováno 3 ml výše uvedené reakční směsi do zkumavky s víčkem a k ní bylo přidáno 100 μ l naředěného vzorku. Zkumavky byly dále ponechány 50 minut v temnu při laboratorní teplotě. Po uplynutí reakční doby byla proměřena absorbance při 593 nm. Slepé pokusy byly připraveny

smícháním 3 ml reakční směsi s 100 µl destilované vody. Dále byla připravena kalibrační řada ze zásobního roztoku Troloxu. Zásobní roztok byl připraven navážením 0,0598 g Troloxu do 100ml odměrné baňky a doplněním methanolem po rysku. Ze zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada v rozmezí 10–100 µg Troloxu na l (Příloha 6). Kalibrační řada byla následně proměřena stejným způsobem jako vzorky. Kalibrační graf byl sestrojen v závislosti absorbance kalibračních roztoků na koncentraci Troloxu. Antioxidační aktivita vzorků byla vyjádřena ve formě ekvivalentů Troloxu [107].

2.5.4.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Nejprve byla provedena optimalizace metody (Příloha 3). Bylo pipetováno 6 ml destilované vody, 1 ml naředěného vzorku a 0,5 ml FC činidla do zkumavky s víčkem. Reakční směs byla ponechána 5 minut v klidu. Následně byl přidán 1 ml 5% roztoku Na₂CO₃ a takto vzniklá reakční směs byla umístěna na 60 minut do temna, při laboratorní teplotě. Po uplynuté době byla změřena absorbance při 765 nm. Stejným způsobem byly připraveny i slepé pokusy, které obsahovaly místo vzorku destilovanou vodu. Byla připravena kalibrační řada v rozmezí 10–100 mg/l ze zásobního roztoku kyseliny gallové (Příloha 7). Kalibrační graf byl sestrojen v závislosti absorbance kalibračních roztoků na koncentraci kyseliny gallové. Celkový obsah fenolických látek byl vypočten pomocí rovnice regrese sestrojené kalibrační řady s kyselinou gallovou [107].

2.5.4.5 Stanovení obsahu flavonoidů

Nejprve byla provedena optimalizace metody (Příloha 4). Bylo pipetováno 1 ml vzorku a 0,6 ml 5% NaNO₂ do zkumavky s víčkem. Zkumavka byla ponechána 5 minut v klidu a poté byl do ní přidán 1 ml 2% AlCl₃. Po 6 minutách byl přidán 1 ml 1M NaOH. Vzniklá směs byla umístěna na 10 minut do tmavého prostředí a po uplynutí reakční doby byla změřena absorbance při 510 nm. V případě slepého pokusu byl 2% AlCl₃ nahrazen destilovanou vodou, jinak bylo postupováno stejným způsobem. Kalibrační řada byla připravena ze zásobního roztoku katechinu, který byl připraven navážením 50 mg katechinu do 100ml odměrné baňky a doplněním methanolem po rysku. Z takto připraveného zásobního roztoku byla dále připravena kalibrační řada v rozmezí 0,5–50 mg/l (Příloha 8). Kalibrační řada byla následně proměřena stejným způsobem jako vzorky samotné. Kalibrační graf byl sestrojen v závislosti absorbance kalibračních roztoků na koncentraci katechinů. Obsah flavonoidů byl vypočten pomocí rovnice regrese sestrojené kalibrační řady [107].

2.5.4.6 Stanovení obsahu katechinů

Metoda s vanilinem je založena na reakci vanilinu s aromatickým katechinem v silně kyselém prostředí, kdy vazbou dochází ke vzniku produktu s červeným zbarvením a jeho intenzita je měřena při vlnové délce 500 nm [107].

Bylo pipetováno 1 ml vzorku, 2,5 ml 4 % vanilinu v metanolu a 2,5 ml 25 % H₂SO₄ v metanolu. Vzniklá směs byla umístěna na 15 minut do tmavého prostředí a po uplynutí reakční doby byla změřena absorbance při 500 nm. V případě slepého pokusu byl 1 ml vzorku nahrazen destilovanou vodou, jinak bylo postupováno stejným způsobem. Kalibrační řada byla připravena ze zásobního roztoku katechinu, který byl připraven navážením 50 mg katechinu do 100ml odměrné baňky a doplněním methanolem po rysku (Příloha 9). Z takto připraveného zásobního roztoku byla dále připravena kalibrační řada v rozmezí 5–80 mg/l. Kalibrační řada byla následně proměřena stejným způsobem jako vzorky samotné. Kalibrační graf byl sestaven v závislosti absorbance kalibračních roztoků na koncentraci katechinů. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent katechinu [107].

2.5.4.7 VIS spektra

Spektra byla měřena na spektrofotometru UltraScan VIS. Byl měřen nálev DEMI a uhličitanový nálev připravený podle postupu 2.3. Z těchto dvou nálevů byla ½ odebrána a následně zalkalizovaná pomocí 6M NaOH na pH=9. Jednotlivá spektra byla porovnána. Následně byl měřen samotný uhličitanový nálev, a to po dobu 20 hodin. Bylo zaznamenáno deset měření, kdy jednoho měření trvalo 2 hodiny. Měření probíhalo při vlnových délkách 450–800 nm.

2.5.5 Infračervená spektroskopie

Infračervené spektrum bylo změřeno u nálevu připraveného do vody destilované (DEMI) a uhličitanové (HCO₃⁻) připravené podle postupu v kapitole 2.3. Z připraveného nálevu byla ½ odebrána a následně zalkalizovaná pomocí 6M NaOH na pH = 9. Oba nálevy byly následně nality na Petriho misku (průměr 100 mm) s výškou hladiny 5,0 mm, vysušeny v proudu vzduchu (25 °C, 24 h) a rozmělněny na prášek. Měření probíhalo na přístroji Nicolet iS50 FT-IR. Byla nastavena metoda iS50 ATR Lab., spektra byla snímána v rozsahu 400–4000 cm⁻¹ a to v počtu 64 skenů. Vzorek byl pomocí kopistu nanášen na ATR modul a následně změřen proti vzduchu. Byla sledována možná změna ve spektru. Pro srovnání spekter byl použit čistý inulin z čekanky (Zdraví z přírody, Zlín, Česká republika).

2.5.6 ICP/MS

Před měřením byla nejprve provedena mikrovlnná mineralizace vzorku. Na analytických vahách bylo naváženého ± 100 mg vzorku sušeného kořene *Inula helenium*. Do každé patronky se vzorkem bylo odměřeno 5 ml HNO₃ (1:3) a 2 ml H₂O₂ (30 %). Patronky byly uzavřeny předem roztaženým víčkem a utěsněny. Uzavřená nádoba byla vložena do mineralizačního přístroje Speedwave Xpert, kde byl následně nastaven teplotní program (Tabulka 6). Po rozkladu byl vzorek kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněn redestilovanou vodou po rysku. Takto připravený vzorek byl následně změřen na hmotnostním spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (ICP/MS).

Stanovení vzorku bylo provedeno na kvadrupólovém hmotnostním spektrometru Agilent 7900. Jde o výkonný přístroj, který má dynamický rozsah 11 řádů. Přístroj obsahuje oktapólový reakční systém (ORS), který odstraňuje interference diskriminací kinetické energie pomocí kolizního plynu (He), nebo reakčního plynu. Přístroj obsahuje i Ultra High Matrix Introduction (UHMI), čímž se zvyšuje tolerance rozpuštěných pevných látek až na 25 %. Pomocí UHMI se také zlepšuje odolnost plazmatu a snižuje vliv matrice [108].

Tabulka 6 Teplotní program mineralizace

	T [°C]	p [bar]	Nárůst [min]	Držení [min]	Výkon [%]
Krok 1	170	40	5	5	70
Krok 2	230	40	5	35	80
Krok 3	50	40	1	5	0
Krok 4	50	40	0	5	0
Krok 5	59	40	0	5	0

3 Výsledky a diskuze

3.1 pH vzorků vod a nálevů z kořene omanu pravého

Pomocí předem kalibrovaného pH metru bylo změřeno pH připravených vod (Kapitola 2.3) použitých k přípravě nálevů a následně i pH připravených nálevů. Při měření pH byl jako standard použit vždy nálev připravený první den.

Tabulka 7 pH připravených vod a nálevů

Voda	Ø pH (před)	Ø pH (po)	Ø pH oman nálev
DEMI	6,28	6,31	^{STD} 6,26±0,04
2.den	–	–	^B 5,78±0,03
3.den	–	–	^B 5,53±0,01
4.den	–	–	^B 5,47±0,01
STV	7,92	8,83	^{STD} 7,14±0,06
2. den	–	–	^B 6,99±0,01
3.den	–	–	^A 7,01±0,06
4.den	–	–	^B 6,62±0,01
VTV	8,26	8,51	^{STD} 7,79±0,02
2. den	–	–	^B 7,64±0,00
3. den	–	–	^B 7,25±0,02
4. den	–	–	^B 7,19±0,01
HCO₃⁻	8,30	9,17	^{STD} 7,94±0,06
2.den	–	–	^A 7,76±0,08
3.den	–	–	^B 7,59±0,02
4.den	–	–	^B 7,31±0,11

Demi, demineralizovaná voda; STV, středně tvrdá voda; VTV, velmi tvrdá voda; HCO₃⁻, roztok hydrogenuhličitanu sodného; aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Index A značí statistickou shodu se standardem, index B značí statistickou neshodnu se standardem. Standard je označený jako ^{STD} (N=4).

Hodnoty pH pro připravené vody se pohybovaly v rozmezí 6,28–9,17. Po varu se zvýšilo pH v důsledku uvolňování CO₂. Nejvíce patrná je tato změna u vody VTV (nárůst o 0,25 pH) a u HCO₃⁻ (nárůst o 0,87 pH). Hodnoty pH bylinného nálevu se pohybovaly v rozmezí 5,47–7,94. U jednotlivých vod došlo po přidání kořene ke snížení pH v důsledku pravděpodobného uvolňování látek s kyselou povahou. Nejvíce patrná je tato změna u nálevu VTV (pokles o 0,72 pH) a u nálevu HCO₃⁻ (pokles o 1,23 pH). Jako standard byl použit vždy nálev

připravený první den. Hodnoty pH připravených nálevů klesaly s nárůstem dnů. Na hladině významnosti $p < 0,05$ bylo zjištěno, že jsou výsledky pH nálevu v porovnání se standardem statisticky rozdílné (Tabulka 7).

3.2 Elektrická vodivost a tvrdost připravených vod a nálevů omanu pravého

Byla měřena vodivost připravených vod a nálevů z omanu pravého pomocí konduktometru Handylab. Jednotlivé výsledky vychází z aritmetického průměru, a to celkem ze dvou měření dvou stejně připravených nálevů ($N = 4$). Hodnoty vodivosti připravených vod se pohybovaly v rozmezí 0–1027,5 $\mu\text{S/cm}$ a vodivost nálevů se pohybovala v rozmezí 0–908 $\mu\text{S/cm}$. K poklesu mohlo dojít z důvodu snížení množství iontu v roztoku. Nejvyšší vodivost byla naměřena u nálevu připraveného do velmi tvrdé vody. Chelatometricky byla stanovena tvrdost připravených vod po varu vyjádřena jako suma hořečnatých a vápenatých kationtů. Nejvyšší tvrdost byla stanovena u nálevu připraveného do velmi tvrdé vody, která také byla připravena z největší navážky CaSO_4 a MgSO_4 (Tabulka 8).

Tabulka 8 Vodivost a tvrdost připravených nálevu z omanu pravého

Voda	Voda	Omanový nálev ($\mu\text{S/cm}$)	Voda $\Sigma\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ (mmol/l)
DEMI	$<0,1 \pm 0,00$	$<0,1 \pm 0,00$	–
STV	$302 \pm 2,83$	$298 \pm 4,24$	$0,787 \pm 0,02$
VTV	$1027,5 \pm 2,12$	$908 \pm 14,14$	$1,474 \pm 0,11$
HCO_3^-	$518 \pm 5,66$	$464 \pm 4,24$	$0,325 \pm 0,04$

Demi, demineralizovaná voda; STV, středně tvrdá voda; VTV, velmi tvrdá voda; HCO_3^- , roztok hydrogenuhličitanu sodného; aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka, ($N=4$).

3.3 Měření barevnosti

Byla změřena barevnost vod použitý k přípravě nálevů, kdy jednotlivé vody neměly na měření barevnosti nálevů kořene omanu pravého vliv. Dále byla změřena barevnost bylinných nálevů v průběhu skladování (1.–4. den). Následně byly porovnány naměřené hodnoty L^* , a^* , b^* , C^* , h° pro všechny vzorky (Tabulka 9–12). Parametr L^* (jas) se hodnotí na stupnici od 0 (černá) do 100 (bílá). Hodnoty parametru a^* se nacházejí buďto v kladné části, ty odpovídají červené barvě nebo v záporné části, kde odpovídají zelené barvě. Osa b^* se pohybuje buďto v kladné části, což odpovídá žluté barvě, nebo v záporných hodnotách, což odpovídá modré

barvě. Hodnota C* udává sytost nebo čistotu barvy a sílí se zvyšující se vzdáleností od osy L*. Hodnota konkrétně udává množství šedi v poměru odstínu, kdy 0 odpovídá šedé barvě a 100 plně syté barvě. Hodnota h° udává polohu na standardním barevném kole. Vzorke připraveny duplicitně byly změřeny dvakrát (N=4) a výsledky byly uvedeny jako aritmetický průměr se standardní odchylkou měření. Písmena ^A a ^B 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 $p < 0,05$, platila alternativní hypotéza, která vyvracela shodnost v rámci hladiny statistické významnosti $\alpha=0,05$.

Tabulka 9 Barevnost připravených nálevu v barevném prostoru L*a*b*

	L*	a*	b*	ΔE^*
1.den				
Nálev (DEMI)	94,75±0,11	-0,71±0,01	7,56±0,18	standard
Nálev (STV)	^A 94,07±0,23	^A -1,04±0,13	^B 9,16±0,08	1,77±0,08
Nálev (VTV)	^B 93,12±0,85	^B -2,16±0,16	^B 11,97±1,50	4,93±1,88
Nálev (HCO ₃ ⁻)	^A 94,00±0,13	^B -2,16±0,02	^B 11,11±0,23	3,91±0,43
2.den				
Nálev (DEMI)	94,53±0,23	-0,63±0,04	7,91±0,48	standard
Nálev (STV)	^A 93,77±0,16	^A -1,17±0,18	^B 9,40±0,07	1,76±0,54
Nálev (VTV)	^B 91,29±1,34	^B -3,74±0,76	^B 11,76±1,4	5,94±2,46
Nálev (HCO ₃ ⁻)	^B 93,23±0,24	^B -2,89±0,13	^B 10,93±0,24	4,00±0,75
3.den				
Nálev (DEMI)	94,44±0,27	-0,61±0,06	8,06±0,59	standard
Nálev (STV)	^A 93,63±0,14	^B -1,29±0,15	^A 9,59±0,11	1,60±1,04
Nálev (VTV)	^B 90,28±1,32	^B -5,10±0,88	^B 11,91±1,31	7,27±2,42
Nálev (HCO ₃ ⁻)	^B 92,59±0,33	^B -3,78±0,13	^B 11,33±0,20	4,94±0,79
4.den				
Nálev (DEMI)	94,57±0,06	-0,60±0,04	7,92±0,45	standard
Nálev (STV)	^B 93,58±0,14	^B -1,37±0,16	^B 9,66±0,14	1,98±0,48
Nálev (VTV)	^B 89,49±1,46	^B -6,34±1,07	^B 11,64±1,32	8,55±2,36
Nálev (HCO ₃ ⁻)	^B 91,98±0,40	^B -4,74±0,16	^B 11,30±0,21	5,94±0,66

Demi, demineralizovaná voda; STV, středně tvrdá voda; VTV, velmi tvrdá voda; HCO₃⁻, roztok hydrogenuhličitanu sodného; aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Index A značí statistickou shodu se standardem, index B značí statistickou neshodnu se standardem, (N=4).

Hodnota jasu L* se pohybuje v rozmezí 89,49–94,75, vzorky tedy spadají do světlé části

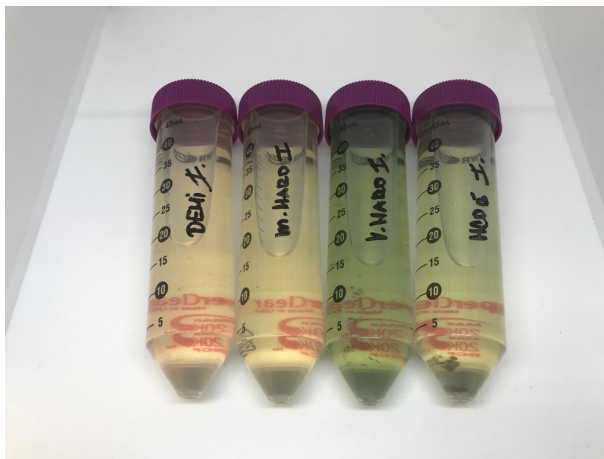
škály. Parametr a^* se pohybuje v záporných hodnotách a odpovídá tedy barvě zelené. Hodnoty parametru b^* jsou kladné, což odpovídá žluté barvě. Vzorčky připravené do VTV a HCO_3^- měly menší parametr a^* a větší parametr b^* , byly tedy více zelené a žluté. Parametr b^* zůstal po celou dobu skladování stejný, ale parametr a^* se mírně snižoval. Nálevy se postupem času stávaly zelenější. Hodnoty ΔE^* při porovnání nálevu připravených ve středně tvrdé vodě (STV) jsou nízké. Patrné změny nastaly u nálevu připravených do velmi tvrdé vody (VTV) a do uhličitánové vody (HCO_3^-). Hodnoty barevných odchylek STV jsou podle tabulky řazeny mezi rozdíly jako okem velmi nepatrné rozdíly. Vzorčky VTV oproti standardu vykazují okem velmi zřejmé rozdíly. Rozdíly STV v rámci všech dnů jsou nepatrné, naopak barevná odchylka VTV a HCO_3^- se zvyšuje s dobou ponechání připravených nálevů.

Tabulka 10 Barevnost připravených nálevů v barevném prostoru $L^*C^*h^\circ$

	L^*	C^*	h°	ΔH^*
1.den				
Nálev (DEMI)	94,75±0,11	7,92±0,18	95,56±0,23	standard
Nálev (STV)	^A 94,07±0,23	^B 14,82±0,64	^A 97,77±1,68	7,16±0,44
Nálev (VTV)	^B 93,12±0,85	^B 17,4±2,12	^A 95,75±1,20	13,55±2,92
Nálev (HCO_3^-)	^A 94,00±0,13	^B 15,09±0,26	^A 96,33±0,35	6,05±2,43
2.den				
Nálev (DEMI)	94,53±0,23	18,19±0,17	95,82±0,12	standard
Nálev (STV)	^A 93,77±0,16	^A 16,54±1,93	^A 98,64±0,76	8,59±1,59
Nálev (VTV)	^B 90,29±1,34	^A 18,76±5,71	^B 123,18±6,21	12,72±5,74
Nálev (HCO_3^-)	^A 93,23±0,24	^A 17,7±3,76	^A 100,50±6,71	10,53±2,90
3.den				
Nálev (DEMI)	94,44±0,27	11,2±4,44	97,30±2,26	standard
Nálev (STV)	^A 93,63±0,14	^A 19,40±0,71	^A 98,90±0,49	8,39±3,84
Nálev (VTV)	^B 90,28±1,32	^A 19,31±6,61	^B 128,16±3,48	12,69±8,97
Nálev (HCO_3^-)	^B 92,59±0,33	^A 15,94±0,45	^A 101,72±2,87	7,45±3,78
4.den				
Nálev (DEMI)	94,57±0,06	12,63±2,23	96,52±1,17	standard
Nálev (STV)	^B 93,58±0,14	^B 20,38±1,38	^A 106,12±1,80	11,01±0,91
Nálev (VTV)	^B 89,49±1,46	^B 21,27±2,76	^B 133,64±2,16	15,01±1,93
Nálev (HCO_3^-)	^B 91,48±0,40	^A 16,40±2,38	^B 108,97±3,25	9,15±6,15

Demi, demineralizovaná voda; STV, středně tvrdá voda; VTV, velmi tvrdá voda; HCO_3^- , roztok hydrogenuhličitanu sodného; aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Index A značí statistickou shodu se standardem, index B značí statistickou neshodu se standardem, (N=4).

Hodnota C^* udávající sytost barvy roste se zvyšující se tvrdostí vody. Hodnoty se blíží více nule, což odpovídá šedé části. Sledovaný odstín (h°) se pohybuje v rozmezí 95,56–133,64 vzorek tedy přechází ze žluté barvy na zelenou barvu. Hodnoty stínových odchylek ΔH^* vykazují vysoké rozdíly mezi standardy a vzorky. Nejvyšší rozdíl byl zaznamenán u nálevu připravený do velmi tvrdé vody. Změna barevnosti nálevů je znázorněna na Obrázku 18.



Obrázek 18 (z leva do prava): Demi, demineralizovaná voda; STV, středně tvrdá voda; VTV, velmi tvrdá voda; HCO_3^- , roztok hydrogenuhličitanu sodného

Ghosh a kolektiv publikovali článek, kde sledovali senzorní vlastnosti čajového nálevu pomocí voltametrových senzorů. Izolovali z černého čaje dvě fenolické látky obsažené v nejvyšších koncentracích, a to theaflavin a thearubigin. Na těchto látkách byl sledován vliv použité vody a pH na barevnost nálevů. Použitá voda na přípravu nálevu byla demineralizovaná voda (pro slepý vzorek), síran vápenatý (simulace trvalé tvrdé vody) a voda, která se svým složením a tvrdostí se přibližovala námi použité uhličitanové vodě (množství CaCO_3 simulovalo dočasně tvrdou vodu). Uhličitanová voda byla jako jediná před použitím povařena, aby nedošlo k výraznému snížení dočasné tvrdosti. Při přípravě do roztoku síranu vápenatého nedocházelo k žádné významné změně složení fenolických látek ani v senzorních vlastnostech. Při přípravě nálevu do uhličitanové vody bylo zjištěno, že dochází k výrazné změně barevnosti nálevu. Výsledky ukazují, že použití uhličitanové vody po varu jednak snižovalo hodnoty theaflavinu (autooxidace) ale také zvyšovalo hodnoty thearubiginu, kdy docházelo ke změně celkové barvy připraveného nálevu. Konkrétně byly tyto změny spojeny se zvýšením intenzity barvy (zvýšená disociace na thearubiginové anionty při vyšším pH) a pokles jasů (v důsledku snížení podílu barvy theaflavinu) [109].

Vzhledem k tomu, že k největším barvovým odchylkám docházelo zejména u nálevu připraveným do VTV a HCO_3^- -vod, lze předpokládat pouze vliv pH, nikoliv tvrdosti vody. Proto byly připraveny nálevy pouze v demineralizované vodě a uhličitanové, u kterých bylo

upraveno výsledné pH pomocí 6M NaOH na hodnotu 9,0. Byla sledovaná barevnost první až čtvrtý den (Tabulka 11).

Tabulka 11 Barevnost připravených nálevů v barevném prostoru L*a*b*

	L*	a*	b*	ΔE*
1.den				
Nálev (DEMI)	96,64±0,06	-0,85±0,05	9,55±0,25	standard
Nálev (DEMI_pH=9)	^B 93,56±0,32	^B -7,62±0,40	^B 24,59±1,12	16,79±1,01
Nálev (HCO₃⁻)	94,09±0,28	-1,99±0,34	14,68±0,69	standard
Nálev (HCO₃⁻_pH=9)	^B 91,91±0,16	^B -7,96±0,45	^B 27,75±0,45	14,57±0,72
2.den				
Nálev (DEMI)	96,52±0,09	-0,73±0,04	9,55±0,03	standard
Nálev (DEMI_pH=9)	^B 86,93±0,06	^B -15,54±0,15	^B 19,74±1,01	20,38±0,42
Nálev (HCO₃⁻)	93,35±0,52	-2,85±0,25	14,57±1,31	standard
Nálev (HCO₃⁻_pH=9)	^B 84,10±1,41	^B -16,82±1,12	^B 21,85±0,88	18,37±0,63
3.den				
Nálev (DEMI)	96,56±0,14	-0,72±0,04	9,55±0,08	standard
Nálev (DEMI_pH=9)	^B 84,58±0,32	^B -17,65±0,11	^B 17,44±1,11	22,20±0,58
Nálev (HCO₃⁻)	92,73±0,48	-3,79±0,10	14,72±1,52	standard
Nálev (HCO₃⁻_pH=9)	^B 80,88±1,55	^B -19,32±0,60	^A 19,58±0,54	20,19±0,52
4.den				
Nálev (DEMI)	96,47±0,21	-0,74±0,05	9,66±0,21	standard
Nálev (DEMI_pH=9)	^B 83,27±0,24	^B -18,26±0,54	^B 15,96±1,20	22,83±0,74
Nálev (HCO₃⁻)	91,44±1,32	-4,92±0,39	15,35±1,95	standard
Nálev (HCO₃⁻_pH=9)	^B 78,52±1,41	^B -20,17±0,06	^A 18,66±0,17	20,31±0,54

Demi, demineralizovaná voda; STV, středně tvrdá voda; VTV, velmi tvrdá voda; HCO₃⁻, roztok hydrogenuhličitanu sodného; aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Index A značí statistickou shodu se standardem, index B značí statistickou neshodnu se standardem, (N=4).

Hodnota jasu L* se pohybuje v rozmezí 78,52–96,64 vzorky tedy spadají do světlé části škály. Parametr a* se pohybuje v záporných hodnotách a nacházejí se v zelené oblasti. Hodnoty parametru b* jsou kladné, proto se nacházejí ve žluté oblasti. Parametr a* se výrazně snižuje (zesiluje zelená barva), naopak parametr b* se zvyšuje (zesiluje žlutá barva), a to i pro nálev připravený do DEMI vody a následně alkalizovaný pomocí 6M NaOH na pH = 9,0. Během skladování dochází k výrazné změně u nálevů zalkalizovaných na pH=9. Parametr a* i parametr b* se snižují. Patrně díky úniku CO₂ dochází během skladování ke snižování pH

nálevů. Hodnoty barevných odchylek (ΔE^*) při pH = 9 vykazují v porovnání se standardy vysoké rozdíly. Nejvyšší rozdíly byly zaznamenány u nálevu připravených do demineralizované vodě. Podle tabulky se změna barevnosti řadí jako okem zřejmý rozdíl.

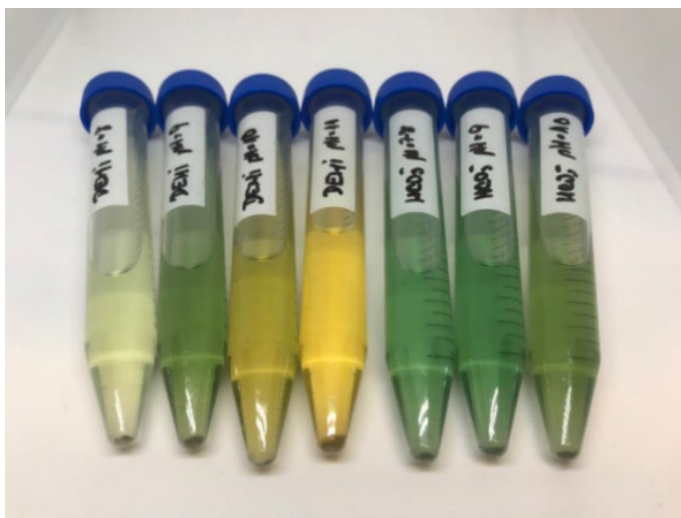
Tabulka 12 Barevnost připravených nálevů v barevném prostoru $L^*C^*h^\circ$

	L^*	C^*	h°	ΔH^*
1.den				
Nálev (DEMI)	96,64±0,06	9,59±0,25	95,04±0,17	standard
Nálev (DEMI_pH=9)	^B 93,56±0,32	^B 25,75±0,94	^B 107,23±1,58	23,51±1,50
Nálev (HCO ₃ ⁻)	94,09±0,28	14,82±0,64	97,77±1,68	standard
Nálev (HCO ₃ ⁻ _pH=9)	^B 91,91±0,16	^B 28,87±0,31	^B 106,02±1,12	17,72±4,93
2.den				
Nálev (DEMI)	96,52±0,09	9,58±0,03	94,36±0,21	standard
Nálev (DEMI_pH=9)	^B 86,93±0,06	^B 25,13±0,70	^B 128,24±1,70	27,37±0,72
Nálev (HCO ₃ ⁻)	93,35±0,52	14,85±1,24	101,15±1,92	standard
Nálev (HCO ₃ ⁻ _pH=9)	^B 84,10±1,41	^B 27,60±0,01	^B 127,59±2,98	24,22±0,16
3.den				
Nálev (DEMI)	96,56±0,14	9,58±0,08	94,31±0,30	standard
Nálev (DEMI_pH=9)	^B 84,58±0,32	^B 24,81±0,86	^B 135,38±1,65	29,47±0,92
Nálev (HCO ₃ ⁻)	92,73±0,48	15,2±1,50	104,5±1,06	standard
Nálev (HCO ₃ ⁻ _pH=9)	^B 80,88±1,55	^B 27,51±0,04	^B 134,62±1,68	26,49±0,20
4.den				
Nálev (DEMI)	96,47±0,21	9,69±0,21	94,34±0,40	standard
Nálev (DEMI_pH=9)	^B 83,27±0,24	^B 24,23±1,20	^B 138,88±1,32	30,14±1,05
Nálev (HCO ₃ ⁻)	91,44±1,32	16,12±1,97	107,80±0,81	standard
Nálev (HCO ₃ ⁻ _pH=9)	^B 78,52±1,41	^B 27,48±0,08	^B 137,23±0,36	23,78±5,30

Demi, demineralizovaná voda; STV, středně tvrdá voda; VTV, velmi tvrdá voda; HCO₃⁻, roztok hydrogenuhličitanu sodného; aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Index A značí statistickou shodu se standardem, index B značí statistickou neshodu se standardem, (N=4).

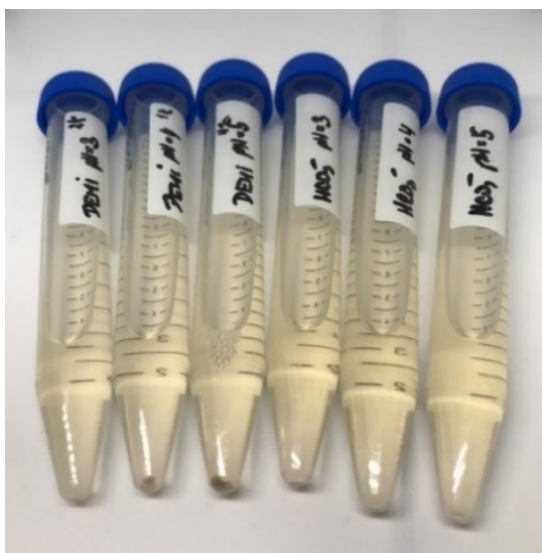
Hodnota C^* udávající sytost barvy roste se zvyšujícím pH vody. Hodnoty se blíží k nule, ty odpovídá šedé části. Podle hodnot je zřejmé, že při zvyšujícím se pH dochází ke zvyšování intenzity jasu. Sledovaný odstín (h°) se pohybuje v rozmezí 94,31–138,88, vzorek tedy přechází ze žluté barvy na zelenou barvu. Hodnoty stínových odchylek (ΔH^*) při pH=9 opět vykazují v porovnání se standardy vysoké rozdíly. Nejvyšší rozdíly byly zaznamenány u nálevu připravených do demineralizované vodě.

Z obrázku 19 je patrné, že při pH=7–8 u nálevu DEMI nedocházelo k zabarvení a u nálevu HCO_3^- již při tomto pH začal nálev měnit barvu ze žluté na zelenou. Jak u DEMI, tak u uhličitanového nálevu při pH=9 došlo k nárustu zelené barvy. V obou případech při pH=10 postupně docházelo ke snižování zabarvení a k přechodu zpět do žluté barvy. U nálevu DEMI byla vyzkoušena alkalizace až do pH=11 a to došlo ke změně barvy na původní barvu nálevu.



Obrázek 19 Změna barevnosti nálevu v alkalickém pH (zleva doprava: DEMI (pH=8, 9, 10, 11), HCO_3^- (pH=7–8, 9, 10) Demi, demineralizovaná voda; HCO_3^- , roztok hydrogenuhličitanu sodného)

Změna barevnosti nálevu byla také sledovaná při okyselování nálevu pomocí 6M HCl. Při snižování pH docházelo k úbytku zabarvení, až došlo k úplnému odbarvení nálevu (Obrázek 20).



Obrázek 20 Změna barevnosti v kyselém pH (zleva doprava: DEMI (pH=3, 4, 5), HCO_3^- (pH=3, 4, 5) Demi, demineralizovaná voda; HCO_3^- , roztok hydrogenuhličitanu sodného)

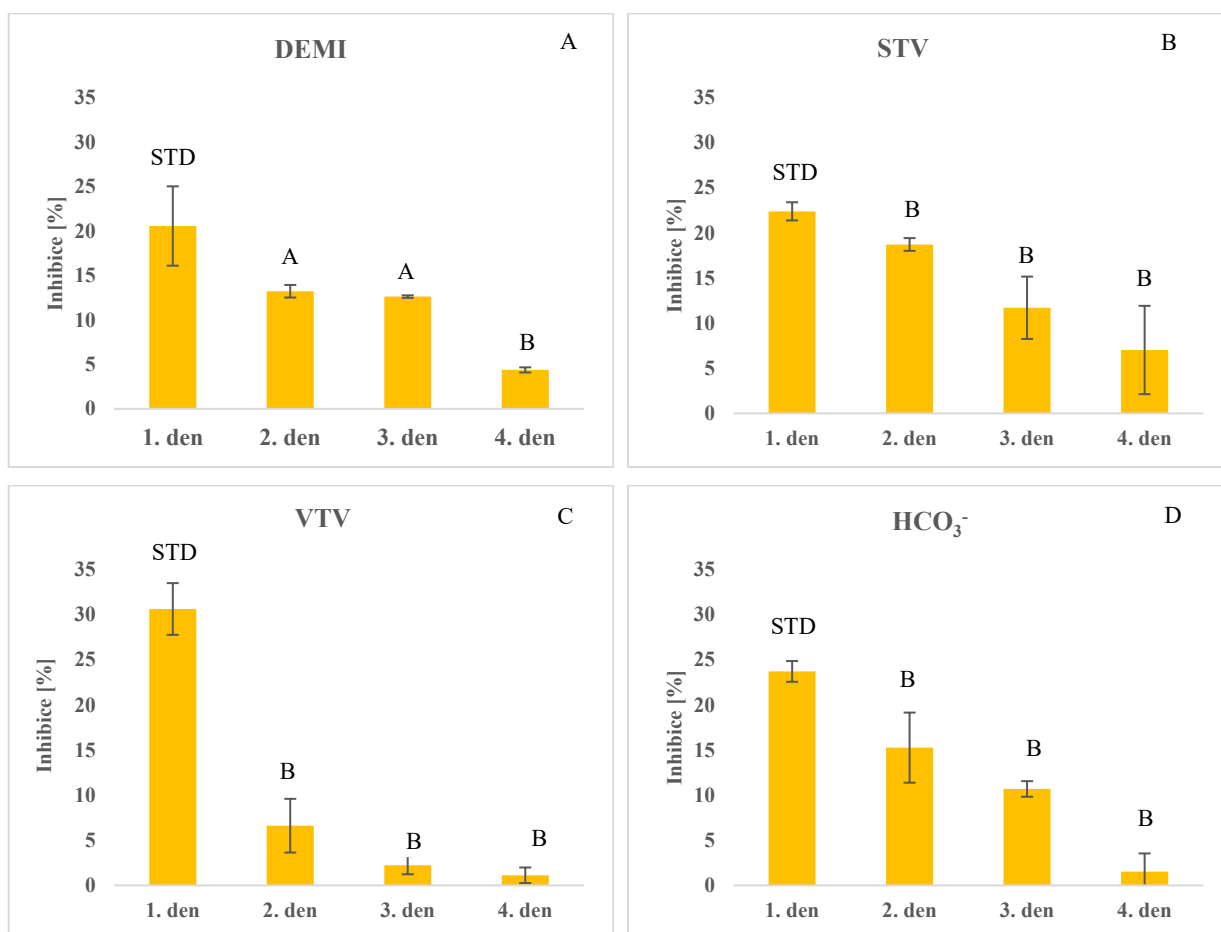
3.4 Antioxidační charakteristika nálevů z kořene omanu pravého

Pro jednotlivé analýzy byly připraveny nálevy do demineralizované vody, středně tvrdé vody, velmi tvrdé vody a uhličitánové vody. Jednotlivé výsledky představují aritmetický průměr, a to celkem ze dvou měření dvou nálevů připravených do shodné vody. Měření probíhalo v průběhu čtyř dnů. Písmena ^A a ^B označují statisticky významný rozdíl t-testu na hladině $\alpha=0,05$. Nálev použitý jako standard je označený jako ^{STD}.

3.4.1 Chelatační aktivita

Při stanovení chelatační aktivity byla změna aktivity vyjádřena v procentech inhibice. V případě porovnání měření vůči standardu je zřejmé, že u připravených nálevů dochází k poklesu inhibice se vzrůstajícím počtem dnů. U nálevu připravený do demineralizované vody (DEMI) došlo statisticky k významnému poklesu až čtvrtý den (Graf 1A). U STV, VTV a uhličitánové vody došlo k významnému poklesu hned druhý den. Největší pokles nastal ve čtvrtém dni u nálevu VTV a uhličitánové, a to až o 96 % (Graf 1 A–D). Byl sledován vliv použitého ferrozinu na pH. Snížení aktivity docházelo při snižování pH, a to v hodnotě 4,5. Ve čtvrtém dnu bylo zaznamenáno kyselé pH pouze u demineralizované vody, kde však pokles chelatační aktivity nebyl významný. Jelikož antioxidanty jsou schopné redukovat ionty železa, je možné, že díky tomuto došlo i ke snižování chelatačních látek ve vzorku. Za následek snížení aktivity může tedy buďto změna pH, pravděpodobnější je však snížení chelatačních látek obsažených ve vzorku. Nejvýznamnější změna v rámci dnů nastala u VTV

Graf 1 A-D Chelatační aktivita nálevů omanu připravených do DEMI, STV, VTV, HCO₃⁻

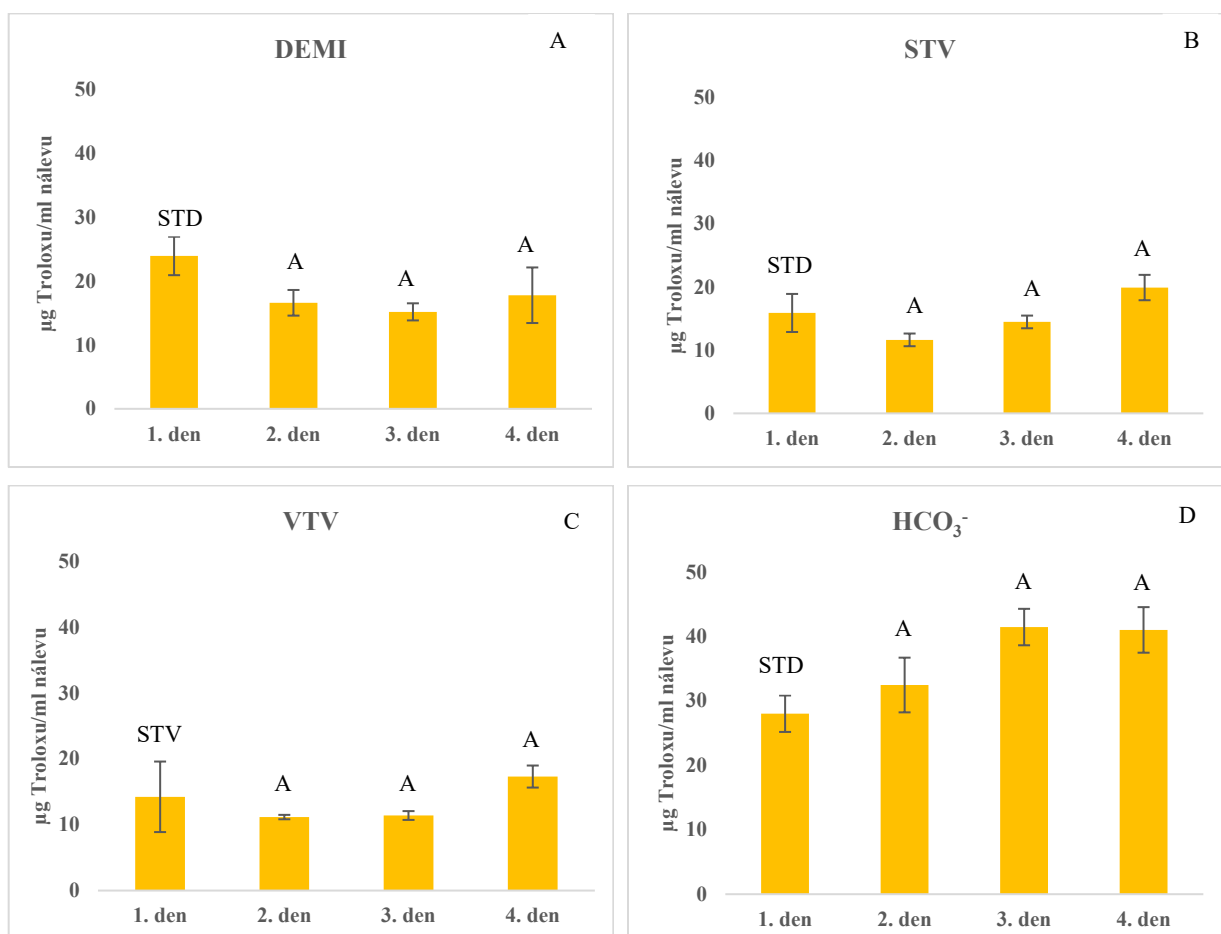


Demi, demineralizovaná voda; STV, středně tvrdá voda; VTV, velmi tvrdá voda; HCO₃⁻, roztok hydrogenuhličitanu sodného; aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Index A značí statistickou shodu se standardem, index B značí statistickou neshodu se standardem, (N=4).

3.4.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Při spektrofotometrickém stanovení antioxidační aktivity se uplatňuje nespočet mechanismů. Tyto metody mají však jeden společný, a to redukci elektronem – takzvaný SET mechanismus (single electron transfer). Uplatnění SET mechanismu je závislé na řadě faktorů, a to na chemické struktuře antioxidantu a rozpouštědle (pH). Přenos elektronu probíhá nejrychleji v zásadité oblasti pH. Toto tvrzení je i potvrzeno metodou DPPH. Výsledky stanovení antioxidační aktivity jsou vyjádřeny v μg Troloxu/ml. V uhličitánové vodě, která vykazovala nejvyšší pH, byla stanovena největší antioxidační aktivita. Aktivita antioxidantů v připraveném nálevu 1.–4. den na hladině $\alpha=0,05$ nebyla významná. Rozsah aktivity se pohybuje v rozmezí 11,2–41,4 μg Troloxu na ml nálevu. Konkrétně u uhličitánové vody se aktivita pohybovala v rozsahu 28,2–41,4 μg Troloxu na ml nálevu (Graf 2 A–D).

Graf 2 A–D Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH u DEMI, STV, VTV, HCO₃⁻

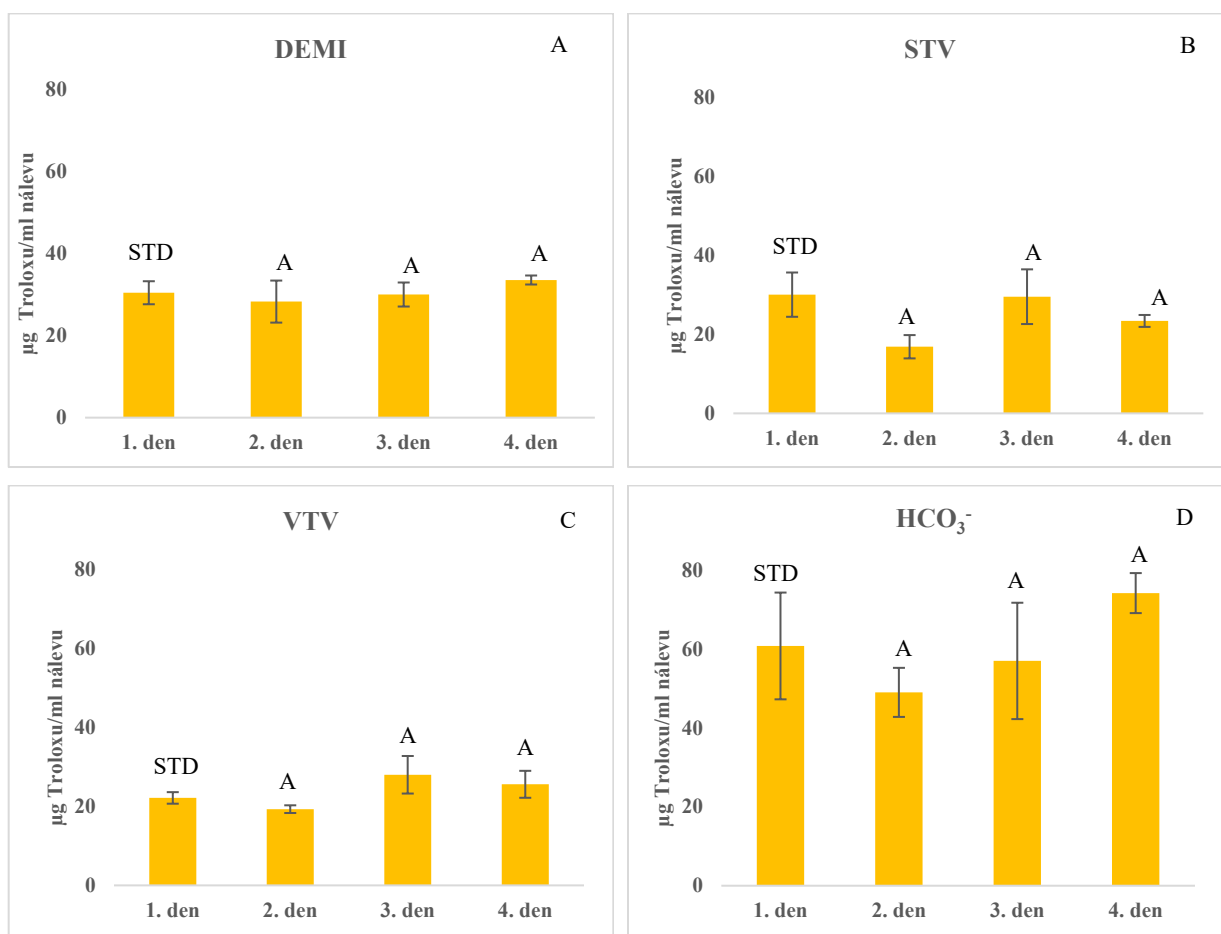


Demi, demineralizovaná voda; STV, středně tvrdá voda; VTV, velmi tvrdá voda; HCO₃⁻, roztok hydrogenuhličitanu sodného; aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Index A značí statistickou shodu se standardem, index B značí statistickou neshodu se standardem, (N=4).

3.4.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP

Tvrzení z kapitoly (3.1.3.2) o vlivu pH na antioxidační látky bylo potvrzeno i metodou FRAP. Na grafu 3 A–D je vidět, že k největšímu nárůstu aktivity vykazoval nálev připravený do uhličitánové vody. Na hladině významnosti $p < 0,05$ se aktivita antioxidačních látek významně nelišila v rámci dnů. Z Grafu D (uhličitánová voda) je však viditelné, že k nárůstu došlo stejně jako u metody DPPH ve čtvrtém dnu. Aktivita antioxidačních látek u uhličitánové vody se pohybovala v rozsahu 49,0–77,7 µg Troloxu na ml nálevu.

Graf 3 A–D Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP u DEMI, STV, VTV, HCO₃⁻

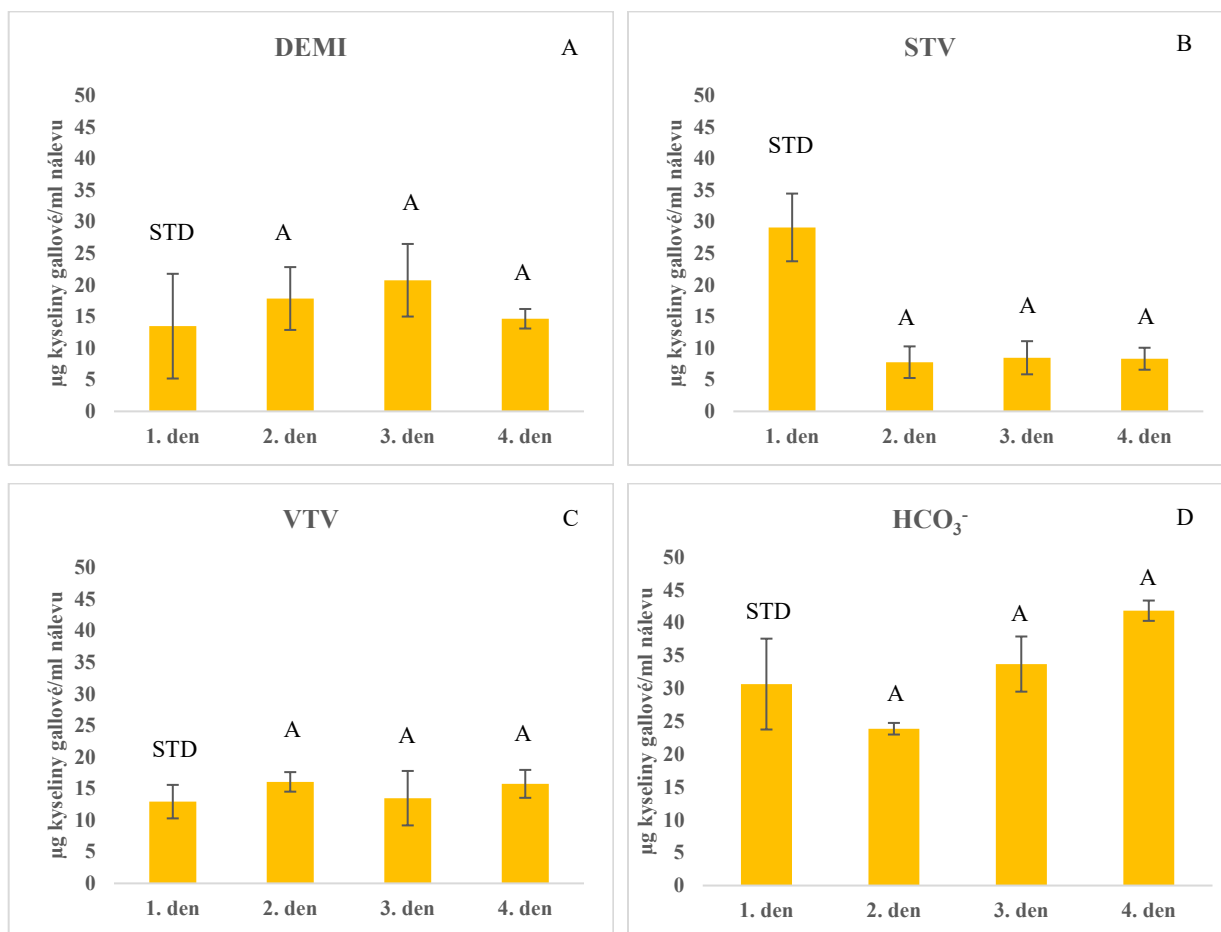


Demi, demineralizovaná voda; STV, středně tvrdá voda; VTV, velmi tvrdá voda; HCO₃⁻, roztok hydrogenuhličitanu sodného; aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Index A značí statistickou shodu se standardem, index B značí statistickou neshodnu se standardem, (N=4).

3.4.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Při stanovení docházelo k výrazné změně v obsahu fenolických látek v uhličitánové vodě. Na hladině významnosti $p < 0,05$ se fenolické látky významně nelišily v rámci dnů (Graf 4 A–D). Rozsah obsahu fenolických látek v uhličitánové vodě se pohybuje v rozmezí 23,88–41,84 µg kyseliny gallové na ml nálevu. Uhličitánové nálevy vykazovaly vyšší obsah fenolických látek. K nárůstu došlo třetí a čtvrtý den, i když statisticky nebyl významný. Mezi fenolické látky obsažené v kořenu omanu můžeme očekávat kyselinu kávovou, chlorogenovou, hydroxybenzoovou, nebo ferulovou (Kapitola 1.1.6).

Graf 4 A-D Stanovení fenolických látek u DEMI, STV, VTV, HCO₃⁻

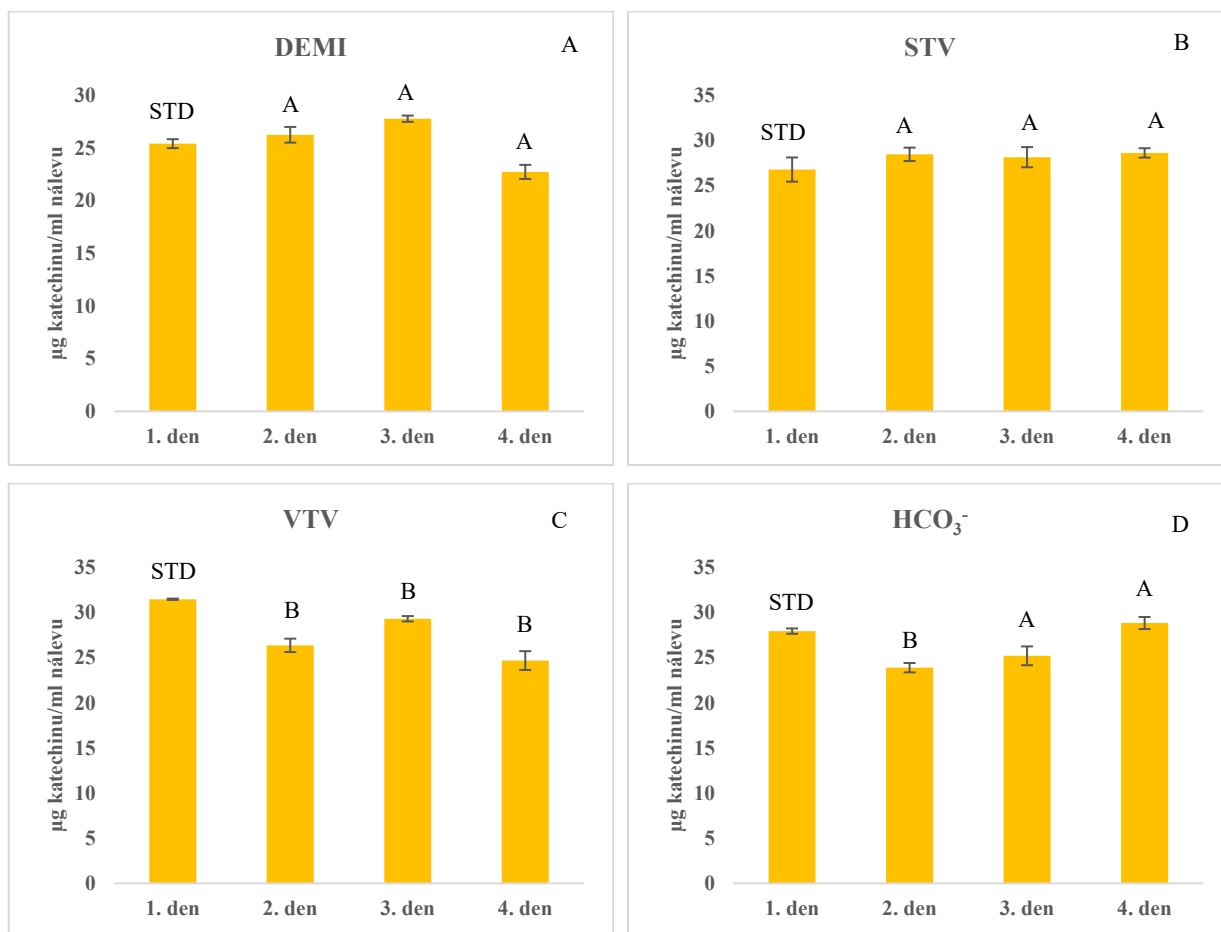


Demi, demineralizovaná voda; STV, středně tvrdá voda; VTV, velmi tvrdá voda; HCO₃⁻, roztok hydrogenuhličitanu sodného; aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Index A značí statistickou shodu se standardem, index B značí statistickou neshodu se standardem, (N=4).

3.4.5 Stanovení obsahu flavonoidů

Po vyhodnocení naměřených dat lze konstatovat, že nejlepších hodnot bylo dosaženo u nálevu VTV a HCO₃⁻. Obsah flavonoidů u nálevu VTV se pohybovala v rozmezí 24,68–31,47 µg katechinu na ml nálevu a u HCO₃⁻ 23,89–28,84 µg katechinu na ml nálevu. Na hladině významnosti $p < 0,05$ se obsahy flavonoidů vzorků DEMI a STV významně nelišily. Rozdíl v rámci dnů nastal až u nálevu VTV, kdy došlo k poklesu. Při změně pH použité vody tedy nedochází k výrazné změně obsahu flavonoidů (Graf 5 A–D). Mezi flavonoidy obsaženy v kořenu omanu můžou být katechiny, dále se může vyskytovat v menším zastoupení kvercetin a kemferol (Kapitola 1.1.6.3).

Graf 5 A-D Stanovení obsahu flavonoidů u DEMI, STV, VTV, HCO₃⁻

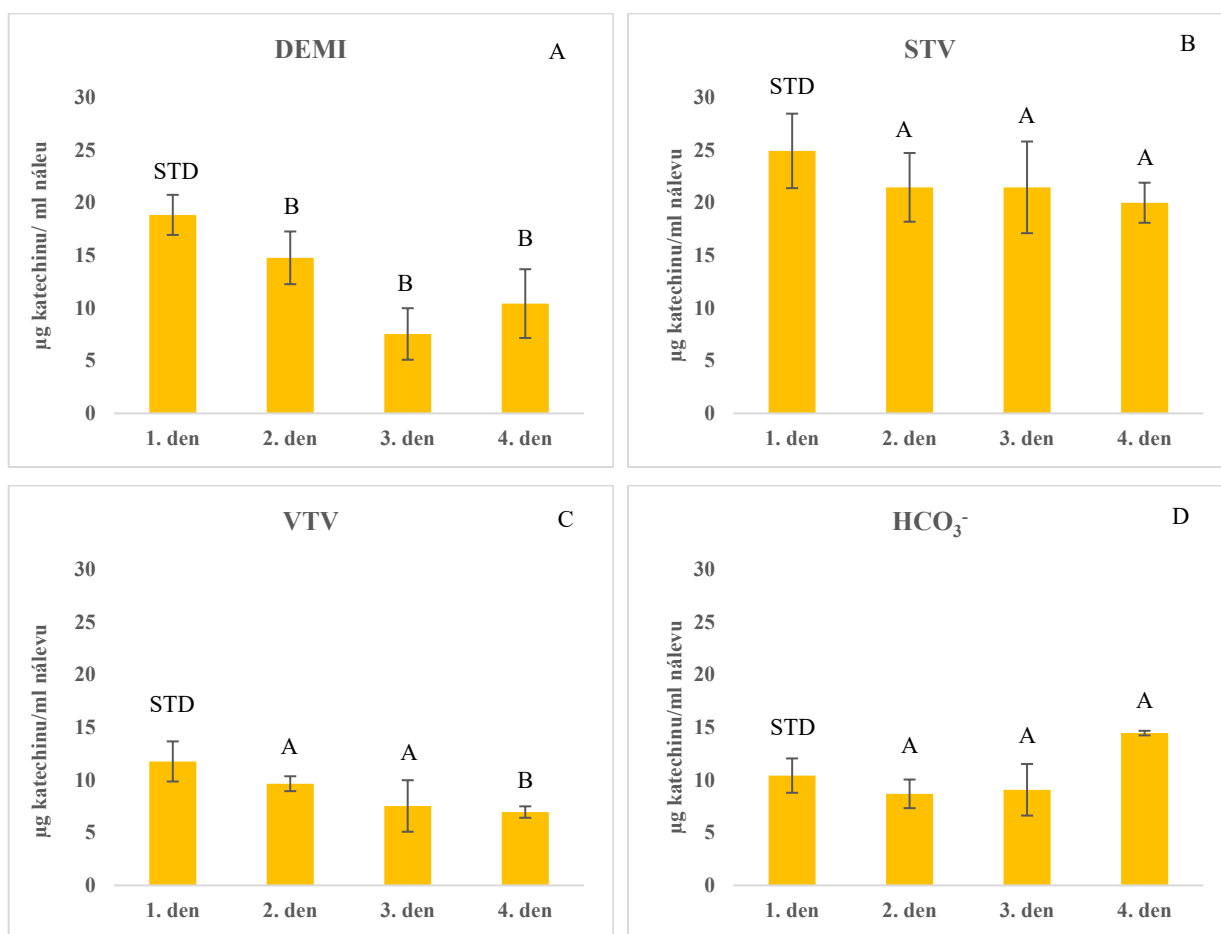


Demi, demineralizovaná voda; STV, středně tvrdá voda; VTV, velmi tvrdá voda; HCO₃⁻, roztok hydrogenuhličitanu sodného; aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Index A značí statistickou shodu se standardem, index B značí statistickou neshodu se standardem, (N=4).

3.4.6 Stanovení obsahu katechinů

Při stanovení katechinu došlo k výraznému snížení jejich obsahu při zvýšení pH (Graf 6 A–D). Vyšší pH způsobí oxidaci a polymeraci katechinů a jejich nestabilitu v nálevu, tím dojde ke snížení hodnot, a to převážně u nálevu VTV, HCO₃⁻, a to až na poloviční hodnoty vůči nálevu DEMI a STV. Na hladině významnosti $p < 0,05$ se obsah katechinů v rámci dnů významně liší pouze u nálevu připraveném do demineralizované vody. Obsah katechinů u STV se pohybuje v rozsahu 20,0–24,9 µg katechinu na ml nálevu na rozdíl od uhličitanové vody, kde se hodnoty pohybují v rozsahu 8,7–14,5 µg katechinu na ml nálevu. Průměrně nejnižší hodnoty byly naměřeny u VTV a HCO₃⁻. Mezi katechiny obsaženy v největším množství v kořenu omanu může být epikatechin a epikatechin galát (Kapitola 1.1.6.3).

Graf 6 A-D Stanovení obsahu katechinů u DEMI, STV, VTV, HCO₃⁻



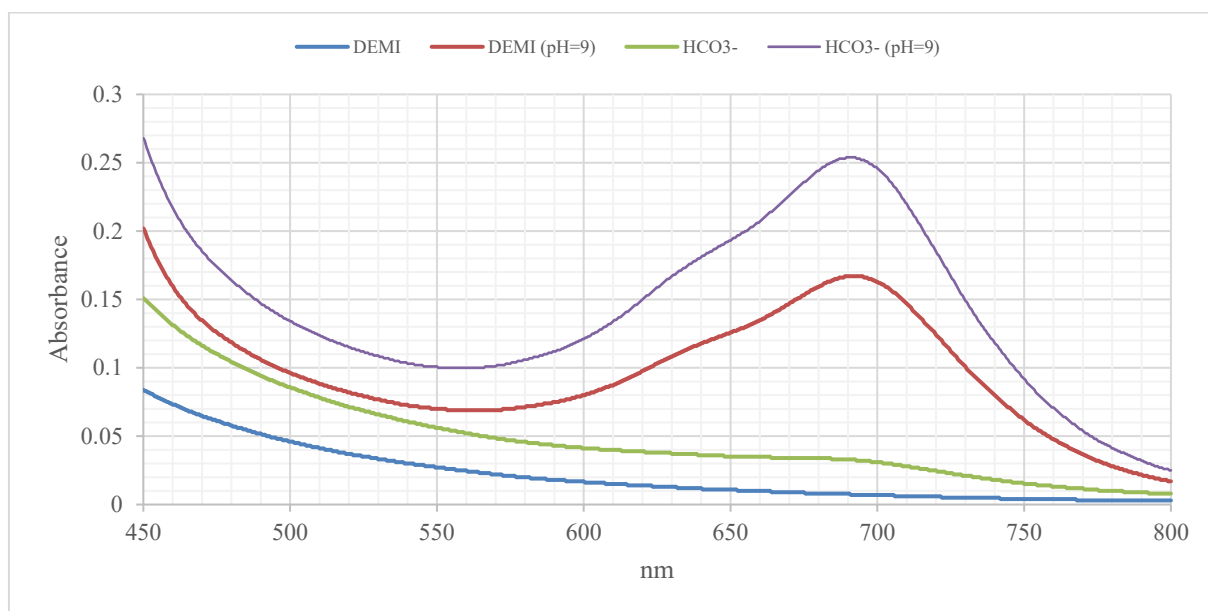
Demi, demineralizovaná voda; STV, středně tvrdá voda; VTV, velmi tvrdá voda; HCO₃⁻, roztok hydrogenuhličitanu sodného; aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Index A značí statistickou shodu se standardem, index B značí statistickou neshodu se standardem, (N=4).

3.5 VIS spektra

Byla proměřena spektra pomocí UltraScan VIS, a to připravených nálevů DEMI a HCO₃⁻. Z připravených nálevů byla ½ zalkalizovaná pomocí 6M NaOH a proměřena. Z grafu 7 je viditelné, že s rostoucím pH dochází ke zvyšování absorpance. Maximum absorpance u nálevu DEMI (pH=9) byla 0,167 a u nálevu HCO₃⁻ (pH=9) byla 0,253. U nálevu bez alkalizace, DEMI (pH=6,18) a HCO₃⁻ (pH=7,87) nedocházelo ke vzniku píku ani ke zvyšování absorpance. Na Grafu 8 jsou znázorněna naměřena VIS spektra pouze uhličitanového nálevu zalkalizovaného pomocí 6M NaOH na pH=9. Bylo zaznamenáno 10 měření po dvou hodinách, při vlnových délkách 450–800 nm. Maximum naměřené absorpance bylo 0,777. Z grafu je vidět nárůst absorpance z 0,287 na 0,777. Tyto hodnoty byly viditelné při vlnové délce 688–694 nm. Důsledkem může být deprotonace fenolické OH skupiny, případně dochází k tvorbě komplexů, které zvyšují absorpaci–barevnost. Tyto vlnové délky též mohou odpovídat odezvě vzniklého chlorofylu B. Měření probíhalo částečně

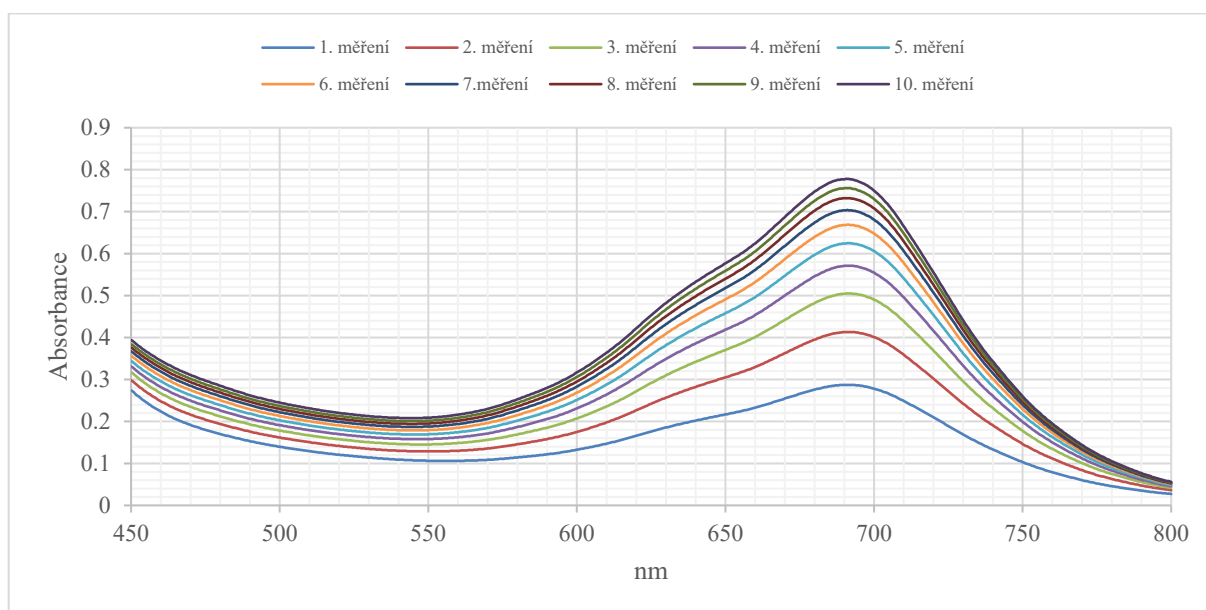
i ve tmě a v uzavřené kyvetě, a i přesto docházelo k nárůstu absorbance a barevnosti uhličitanového nálevu. To může potvrdovat, že přítomnost CO_2 v uhličitanovém nálevu měl vliv na stále probíhající fotosyntézu i bez přístupu denního světla. Vliv pH a přítomnost CO_2 na koncentraci chlorofylu publikovali Werdan K. a kolektiv v roce 1975. Byla sledována fixace CO_2 v závislosti na pH použitého média, a to jak za přístupu světla, tak bez přístupu světla. Bylo zjištěno, že pH v hodnotě 8,1 je nejprínosnější pro vliv CO_2 na změnu koncentrace chlorofylu, a to za přístupu světla. Bez přístupu světla zase bylo pozorováno, že při vyšších hodnotách pH (8,8) docházelo k alkalizaci stroma (výplňová a reakční část chloroplastu) a ke tvorbě chlorofylu. Pod hodnoty $\text{pH}=7,3$ a bez přístupu světla nebyla pozorována téměř žádná fixace CO_2 [110].

Graf 7 VIS spektra nálevů DEMI, DEMI (pH=9), HCO_3^- , HCO_3^- (pH=9)



Demi, demineralizovaná voda; HCO_3^- , roztok hydrogenuhličitanu sodného

Graf 8 VIS spektra nálevu HCO_3^- (pH=9) (10 měření po 2 hodinách)



HCO_3^- ; roztok hydrogenuhličitanu sodného

3.6 Infračervená spektroskopie

Na grafu 9 jsou znázorněná infračervená spektra připravených nálevů. Jako slepý vzorek bylo změřeno spektrum čistého inulinu. V oblasti $3000\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$ se vyskytují absorpční pásy: 3260 cm^{-1} valeční vibrace O-H, 2940 cm^{-1} způsobené vazbou C-H ve skupině CH_2 , 2870 cm^{-1} způsobené vazbou C-H ve skupině CH_3 . Široký pás s intenzitou při 1600 cm^{-1} není specifický pro inulin, ale v této oblasti mohou vznikat deformační vibrace (δ) vazby O-H, kdy dochází k absorpci vody. Oblast pod 1500 cm^{-1} můžeme označit jako „oblast otisku palce“. Spektrální oblast mezi 1200 a 900 cm^{-1} dominuje komplexní sekvence intenzivních píků způsobených především díky silné vazbě C-C, C-O, C-O-C a C-O-H. U všech sacharidů je nejintenzivnější široký pás o 1035 cm^{-1} způsobený vibracemi ν (valenční vibrace) (C-C) a ν (C-O). Další intenzivní pásy u sacharidů jsou v hodnotách 1125 cm^{-1} a 1040 cm^{-1} způsobený vibracemi skupin C-O-C v cyklické struktuře. Konkrétně dva absorpční pásy v rozmezí $1200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ naznačují existenci furanosy. Pásy při $930\text{--}820\text{ cm}^{-1}$ se řadí k existenci jak α tak β -konfigurace. Získané výsledky prokázaly, že hlavní dominantní složkou kořene *Inula helenium* byl fruktan inulinového typu. Oblast pod 600 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 (Tabula 13) [111].

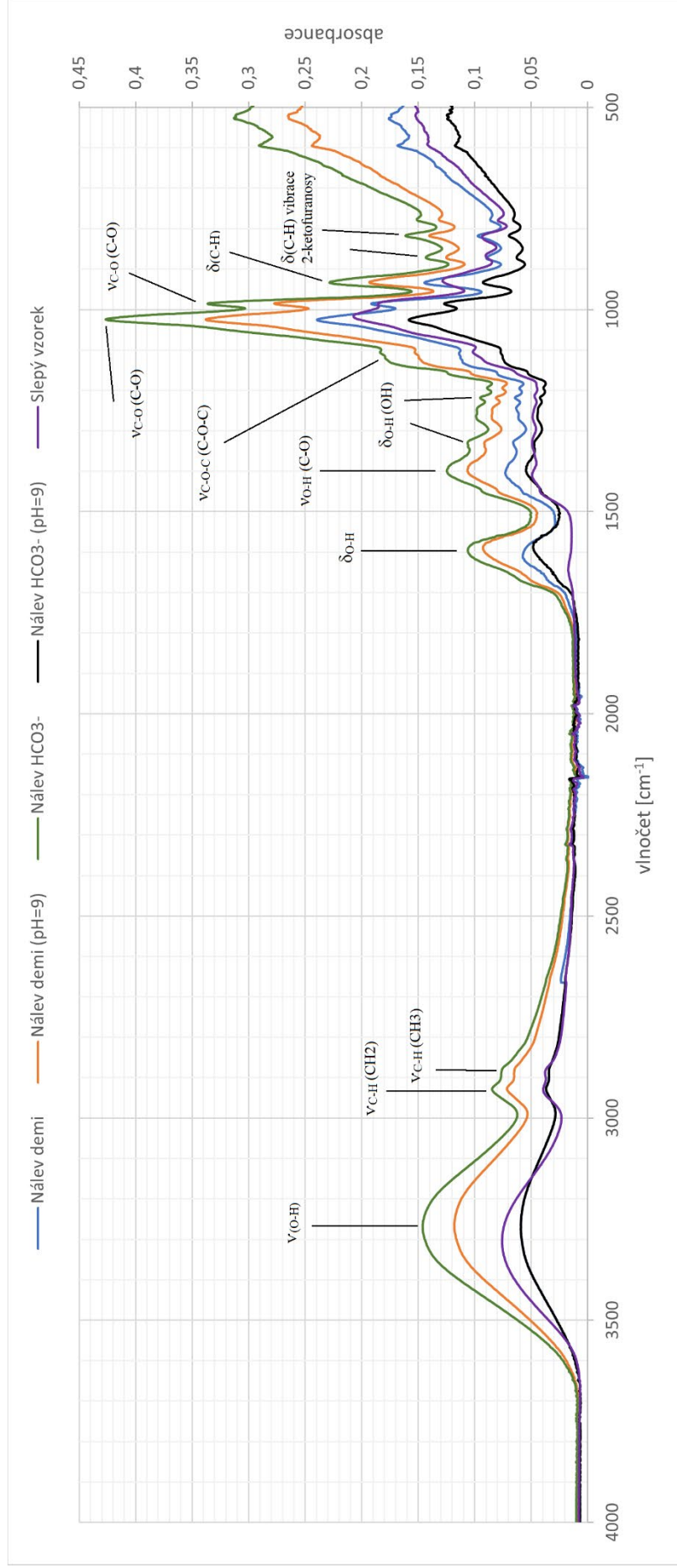
Tabulka 13 FT-IR spektrum vysušeného nálevu HCO_3^-

Vlnoččet [cm^{-1}]	Vlnoččet [cm^{-1}] experiment	Typ vibrace
3200–3400	3260	$\nu_{\text{O-H}}$; H vazba
2933–2981	2940	$\nu_{\text{C-H}}$ (CH ₂)
2859–2904	2870	$\nu_{\text{C-H}}$ (CH ₃)
1580–1650	1600	$\delta_{\text{O-H}}$ – Absorpce vody
1000–1500	1400	$\nu_{\text{O-H}}$ (C-O)
1335–1336	1335	$\delta_{\text{O-H}}$ (OH)
1225–1235	1230	$\delta_{\text{O-H}}$ (OH)
1125–1162	1125	$\nu_{\text{C-O-C}}$ (C-O-C)
1015–1060	1040	$\nu_{\text{C-O}}$ (C-O)
985–996	990	$\nu_{\text{C-O}}$ (C-O)
930	930	δ (C-H)
892–895	890	δ (C-H) 2-ketofuranosy
817	820	vibrace 2-ketofuranosy

*Experiment – experimentální hodnoty (Graf 13)

U připravených nálevů i při změně jejich pH došlo podle slepého vzorku pouze k nárstu absorbance, a to nejvíce u nálevu připravený do uhličitanové vody. Dále došlo k vytvoření pásu při 1600 cm^{-1} , který však náleží pouze deformačním vazbám O–H vznikající při absorpci vody. Z grafu je také viditelná změna obsahu inulinu ve vzorku. Změna tvorby nebo spotřeby inulinu může být důkaz probíhající fotosyntézy.

Graf 9 Infračervená spektra nálevů DEMI, DEMI (pH=9), HCO₃⁻ (pH=9) a čistého inulinu

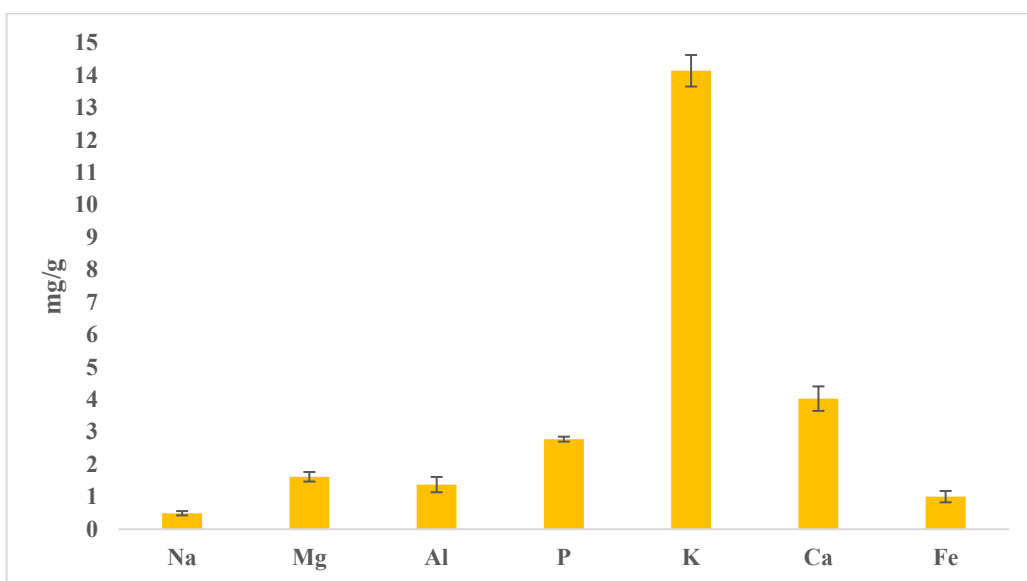


Demi, demineralizovaná voda; HCO₃⁻; roztok hydrogenuhličitanu sodného, slepý vzorek – čistý inulin z čekanky (Zdraví z přírody, Zlín, Česká republika)

3.7 ICP/MS

Pomocí ICP/MS byly stanoveny koncentrace jednotlivých kovů. Nejvýznamnější koncentrace byla naměřena u draslíku (14,14 mg/g). Dále byly zaznamenány vyšší koncentrace vápníku (4,02 mg/g), fosforu (2,78 mg/g), hořčíku (1,61 mg/g), hliníku (1,38 mg/g), železa (1,00 mg/g) a sodíku (0,49 mg/g). Nejvyšší naměřené hodnoty nalezených kovů jsou znázorněny v Grafu 10.

Graf 10 Minerální látky s nejvyšší koncentrací v nálevu z kořene omanu pravého stanoveny pomocí ICP/MS



aritmetický průměr ± směrodatná odchylka, (N=3).

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo připravit nálevy z kořene omanu pravého s použitím vody o různé tvrdosti a následně sledovat vliv tvrdosti na fyzikálně-chemické vlastnosti nápoje.

Nejprve byl vzorek prosetý sítem na požadovanou velikost. Z takto upraveného vzorku byly připraveny nálevy, a to do demineralizované, středně tvrdé, velmi tvrdé a uhličitánové vody. Jak u vody použité k přípravě nálevů, tak u samotných nálevů bylo změřeno pH, vodivost, barevnost (měřeny parametry L^* , a^* , b^* , C^* , h°) a chelatometricky stanovena celková tvrdost. U připravených nálevů docházelo v rámci dnů ke snižování pH, a to z důvodů pravděpodobného uvolňování aminokyselin a dalších organických kyselin. Nejvýznamnější změna barevnosti nálevu nastala u velmi tvrdé vody a uhličitánové vody. Barevnost se stupňovala s dobou ponechání připravených nálevů.

Mezi spektrofotometrickými metodami bylo zařazeno měření chelatační aktivity, antioxidační aktivity, stanovení celkového obsahu fenolických látek, flavonoidů a katechinů. Největší pokles chelatačních látek nastal u nálevu VTV a HCO_3^- . Antioxidační aktivita vzrostla u nálevu HCO_3^- oproti ostatním měřeným nálevům (DEMI, STV, VTV). U metody DPPH se hodnoty pohybovaly v rozmezí 28,2–41,4 μg Troloxu na ml nálevu a u metody FRAP se pohybovaly v rozmezí 49,0–77,7 μg Troloxu na ml nálevu. Změna aktivity v rámci doby ponechání nálevu nebyla statisticky významná. Celkový obsah fenolických látek a flavonoidů vzrostl také v uhličitánového nálevu, kdy opět nedocházelo k významně změně v rámci dnů ponechání nálevu. Hodnoty obsahu fenolických látek se pohybovaly v rozmezí 23,88–41,84 μg kyseliny gallové na ml nálevu. Hodnoty obsahu flavonoidů se pohybovaly v rozmezí 23,89–28,84 μg katechinů na ml nálevu. Naopak u katechinů byla potvrzena nestabilita ve vyšším pH, kdy u VTV a HCO_3^- došlo ke snížení obsahu a to až na polovinu hodnot oproti DEMI.

Při měření absorbance nálevů došlo k nárůstu u DEMI a HCO_3^- alkalizovaných na $\text{pH}=9$ oproti DEMI a HCO_3^- s pH 6,18 a 7,87. U infračervené spektrometrie bylo měřením potvrzeno, že jako hlavní složka kořene omanu pravého je fruktan inulinového typu. Složení kořene se neměnilo v rámci změny pH , docházelo však ke změně intenzity. Pomocí ICP/MS byly nalezeny koncentrace (mg/g) draslíku (14,14), vápníku (4,02), fosforu (2,78), hořčíku (1,61), hliníku (1,38), železa (1,00) a sodíku (0,49). Tyto prvky jsou přítomny v půdě a mohou být v kořenu nalezeny. Změna barevnosti nálevů mohla nastat při reakci inulinu s těmito prvky, zejména s fosforem a železem, to se však při měření nepotvrdilo z důvodu nepoměru těchto látek. Následně reakci nepotvrdila ani žádná dostupná publikace. Stejným případem byla možnost reakce fenolických látek se železitými ionty, kdy může vznikat

charakteristické zbarvení. To se však opět nepotvrdilo naměřenými hodnotami. Změnu barevnosti bychom však mohli přisuzovat k oxidaci fenolických látek, kdy vznikají barevné nenasycené konjugované ketony, nazývané chinony. Tato reakce je podstatou vzniku řady přírodních barviv a oxidace mohla být podpořena přítomností vyššího obsahu CO_2 v uhlíčitanovém nálevu. Dále se taky nabízí možnost vzniku chlorofylu. Intenzivnější vznik chlorofylu je podpořen přítomností CO_2 , což potvrzuje barevnost uhlíčitanového nápoje. Zároveň u uhlíčitanového nápoje došlo ke zvýšení obsahu inulinu. Ten jako polysacharid je přítomný v chloroplastech a je součástí fotosyntézy.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] TOBYN, Graeme, Alison DENHAM, Margaret WHITELEGG, et al. *Inula helenium*, elecampane: the effect of inulin on weight management and ectopic fat in subjects with prediabetes. *Medical Herbs* [online]. Elsevier, 2011, 2011, **12**(1), 201-210 [cit. 2022-03-05]. ISBN 9780443103445. ISSN 1743-7075. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-443-10344-5.00025-2
- [2] KARANOVIĆ, Dunja, Lana ZORIĆ, Bojan ZLATKOVIĆ, et al. Carpological and receptacular morpho-anatomical characters of *Inula*, *Dittrichia*, *Limbarda* and *Pulicaria* species (Compositae, Inuleae): Taxonomic implications. *Flora* [online]. Elsevier, 2016, 2011, **219**(1), 48-61 [cit. 2022-03-05]. ISBN 9780443103445. ISSN 03672530. Dostupné z: doi:10.1016/j.flora.2016.01.001
- [3] BUSSMANN, Rainer W., Ketevan BATSATSASHVILI, Zaal KIKVIDZE, et al. *Inula britannica* L. *Inula helenium* L. *Inula orientalis* L. *Asteraceae*: Taxonomic implications. *Ethnobotany of the mountain regions of central Asia and Altai* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020, 2020-04-01, **219**(1), 1-9 [cit. 2022-03-05]. Ethnobotany of Mountain Regions. ISBN 978-3-319-77087-1. ISSN 03672530. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-77087-1_74-1
- [4] BATSATSASHVILI, Ketevan, Naiba MEHDIYEVA, Zaal KIKVIDZE, et al. *Inula helenium* L. *Asteraceae*: taxonomic implications. *Ethnobotany of the Caucasus* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020, 2016-01-31, **219**(1), 1-5 [cit. 2022-03-05]. European Ethnobotany. ISBN 978-3-319-50009-6. ISSN 03672530. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-50009-6_89-1
- [5] RASULOVA, Mamurahon Obidjo Qizi. Study of the chemical composition of the *Inula helenium* plant. *European Scholar Journal (ESJ)* [online]. March 2021, (vol.2), 1-3 [cit. 2022-03-05]. ISSN 2660-5562. Dostupné z: <https://media.neliti.com/media/publications/340791-study-of-the-chemical-composition-of-the-c30f750d.pdf>
- [6] FERRI, Brittany. What Is Elecampane?: An herb used to help respiratory and digestive issues. Verywell health [online]. June 2020 [cit. 2022-03-20]. Dostupné z: <https://www.verywellhealth.com/elecampane-4766904>

- [7] ALAMGIR, A. N. M. Herbal drugs: Their collection, preservation, and preparation; evaluation, quality control, and standardization of herbal drugs. *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-09-08, 453-495 [cit. 2022-03-17]. Progress in Drug Research. ISBN 978-3-319-63861-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-63862-1_10
- [8] PORWAL, Omji, Sachin Kumar SINGH, Dinesh Kumar PATEL, Saurabh GUPTA, Rahul TRIPATHI a Shankar KATEKHAYE. cultivation, collection and processing of medicinal plants: their collection, preservation, and preparation; evaluation, quality control, and standardization of herbal drugs. *Bioactive Phytochemicals: Drug Discovery to Product Development* [online]. Cham: BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2020, 2020-10-26, 14-30 [cit. 2022-03-17]. Progress in Drug Research. ISBN 9789811464485. Dostupné z: doi:10.2174/9789811464485120010005
- [9] *WHO guidelines on good herbal processing practices for herbal medicines: World Health Organization* [online]. March 2018, (No.1010) [cit. 2022-03-20]. Dostupné z: https://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/publications/trs1010_annex1.pdf
- [10] CHEN, Shi-Lin, Hua YU, Hong-Mei LUO, Qiong WU, Chun-Fang LI a André STEINMETZ. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chinese Medicine* [online]. 2016, March 2018, 11(1) [cit. 2022-03-20]. ISSN 1749-8546. Dostupné z: doi:10.1186/s13020-016-0108-7
- [11] POÓS, T. a E. VARJU. Drying characteristics of medicinal plants. *International Review of Applied Sciences and Engineering* [online]. 2017, 8(1), 83-91 [cit. 2022-03-20]. ISSN 2062-0810. Dostupné z: doi:10.1556/1848.2017.8.1.12
- [12] ŽIVKOVIĆ, Jelena, Milan ILIĆ, Katarina ŠAVIKIN, Gordana ZDUNIĆ, Aleksandra ILIĆ a Dejan STOJKOVIĆ. Traditional use of medicinal plants in south-eastern Serbia (Pčinja district): ethnopharmacological investigation on the current status and comparison with half a century old data. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2020, March 2021, 11(vol.2), 1-3 [cit. 2022-03-05]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2020.01020
- [13] ZHENG, Xiaoqin, Zi WU, Jie XU, et al. Bioactive sesquiterpenes from *Inula helenium*: ethnopharmacological investigation on the current status and comparison with half a century

- old data. *Bioorganic Chemistry* [online]. 2021, March 2021, **114**(vol.2), 1-3 [cit. 2022-03-05]. ISSN 00452068. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioorg.2021.105066
- [14] LUBSANDORZHIEVA PB, Lubsandorzhieva, Rendyuk RENDYUK TD, Dashinamzhilov DASHINAMZHILOV ZH.B, Dargaeva DARGAEVA TD, Ferubko FERUBKO EV a Anna K. KISS. Pharmacognostic study of collection and study of its hepatoprotective Activity. *Pharmacognosy Journal* [online]. 2021, 2015, **13**(3), 713-721 [cit. 2022-03-05]. ISSN 09753575. Dostupné z: doi:10.5530/pj.2021.13.91
- [15] KENNY, Ciara-Ruth, Anna STOJAKOWSKA, Ambrose FUREY, Brigid LUCEY, Niko RADULOVIĆ a Anna K. KISS. From monographs to chromatograms: the antimicrobial potential of *Inula helenium* L. (elecampane) Naturalised in Ireland. *Molecules* [online]. 2022, 2015, **27**(4), 713-721 [cit. 2022-03-05]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27041406
- [16] BUSSMANN, Rainer W., Ketevan BATSATSASHVILI, Zaal KIKVIDZE, et al. *Inula britannica* L. *Inula helenium* L. *Inula orientalis* Lam. Asteraceae: ethnopharmacological investigation on the current status and comparison with half a century old data. *Ethnobotany of the mountain regions of central Asia and Altai* [online]. Cham: Springer international publishing, 2020, 2020-08-13, **114**(vol.2), 419-427 [cit. 2022-03-05]. Ethnobotany of mountain regions. ISBN 978-3-030-28946-1. ISSN 00452068. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-28947-8_74
- [17] PETKOVA, Nadezhda, et al.. *Antioxidant activity and fructan content in root extracts from elecampane (Inula helenium L.)* [online]. 2015, (4(1), 101-107 [cit. 2022-03-05]. ISSN 1314-6246. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/273633698_Antioxidant_activity_and_fructan_content_in_root_extract_from_elecampane_Inula_helenium_L
- [18] MUNJAL, Akul a Allam ABDALLÁH E. Indomethacin. *StatPearls [Internet]: Treasure Island (FL): StatPearls publishing* [online]. december 2021 [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555936/>
- [19] YAN, Huo, Shi HAIMING, Guo CHENG, et al. Chemical constituents of the roots of *Inula helenium*: Ethnopharmacological Investigation on the current status and comparison with half a century old data. *Chemistry of natural compounds* [online]. Cham: Springer international

- Publishing, 2012, 2020-08-13, **48**(3), 522-524 [cit. 2022-03-05]. Ethnobotany of mountain regions. ISBN 978-3-030-28946-1. ISSN 0009-3130. Dostupné z: doi:10.1007/s10600-012-0298-x
- [20] PETKOVA, Nadezhda, Ivan IVANOV, Radka VRANCHEVA, Panteley DENEV, Atanas PAVLOV, Guang LIU, Xiaojun TANG a Xuchao JIA. Ultrasound and microwave-Assisted extraction of elecampane (*Inula helenium*) Roots. *Natural product communications* [online]. 2017, **12**(2) [cit. 2022-03-10]. ISSN 1934-578X. Dostupné z: doi:10.1177/1934578X1701200207
- [21] NAMJIL, Erdenechimeg, Oyundari GANZORIG, Orgilmaa BAYARSAIKHAN, et al. Possibility of obtaining inulin from the tubers of *Helianthus tuberosus* L and *Inula helenium* L: Ethnopharmacological investigation on the current status and comparison with half a century old data. *Mongolian Journal of Agricultural Sciences* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2021, 2020-08-13, **31**(3), 174-179 [cit. 2022-03-05]. Ethnobotany of mountain regions. ISBN 978-3-030-28946-1. ISSN 2524-0722. Dostupné z: doi:10.5564/mjas.v31i3.1552
- [22] DYAKOVA, N A, S P GAPONOV, A I SLIVKIN, et al. Elaboration of an express technique for inulin extraction from the roots of elecampane (*Inula helenium* L.): Ethnopharmacological investigation on the current status and comparison with half a century old data. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2021, 2020-08-13, **640**(5), 419-427 [cit. 2022-03-05]. Ethnobotany of mountain regions. ISBN 978-3-030-28946-1. ISSN 1755-1307. Dostupné z: doi:10.1088/1755-1315/640/5/052021
- [23] SAVYCH, Alona, Svetlana MARCHYSHYN, Halyna KOZYR, et al. Determination of inulin in the herbal mixtures by GC-MS method: Ethnopharmacological investigation on the current status and comparison with half a century old data. *Pharmacia* [online]. Cham: springer international publishing, 2021, 2020-08-13, **68**(1), 181-187 [cit. 2022-03-05]. Ethnobotany of mountain regions. ISBN 978-3-030-28946-1. ISSN 2603-557X. Dostupné z: doi:10.3897/pharmacia.68.e55051
- [24] SHAN, Shan, Yi XIONG, Jianguo GUO, et al. Effect of an inulin-type fructan from *Platycodon grandiflorum* on the intestinal microbiota in rats exposed to PM2.5. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2022, **283** [cit. 2022-03-05]. ISSN 01448617. Dostupné z:

doi:10.1016/j.carbpol.2022.119147

- [25] GUESS, Nicola D., Anne DORNHORST, Nick OLIVER, et al. A Randomised Crossover Trial: The effect of enulin on glucose homeostasis in subtypes of prediabetes. *Annals of nutrition and metabolism* [online]. 2016, **68**(1), 26-34 [cit. 2022-03-05]. ISSN 0250-6807. Dostupné z: doi:10.1159/000441626
- [26] POURGHASSEM GARGARI, Bahram, Parvin DEHGHAN, Akbar ALIASGHARZADEH, et al. Effects of high herformance inulin supplementation on glycemic control and antioxidant status in women with type 2 diabetes: The effect of inulin on glucose homeostasis in subtypes of prediabetes. *Annals of Nutrition and Metabolism* [online]. 2013, **37**(2), 26-34 [cit. 2022-03-05]. ISSN 2233-6079. Dostupné z: doi:10.4093/dmj.2013.37.2.140
- [27] GUESS, Nicola D., Anne DORNHORST, Nick OLIVER, et al. A randomized controlled trial: the effect of inulin on weight management and ectopic fat in subjects with prediabetes. *Annals of Nutrition and Metabolism* [online]. 2015, **12**(1), 26-34 [cit. 2022-03-05]. ISSN 1743-7075. Dostupné z: doi:10.1186/s12986-015-0033-2
- [28] DEHGHAN P, POURGHASSEM Gargari B, ASGHARIJAFARABADI M. Effects of high performance inulin supplementation on glycemic status and lipid profile in women with type 2 diabetes: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Health Promot Perspect.* 2013;**3**(1):55-63. Published 2013 Jun 30. doi:10.5681/hpp.2013.007
- [29] KOSAKOWSKA, O., K. BĄCZEK, J. PRZYBYŁ, M. EJDYS, P. KUŹMA, M. OBIEDZIŃSKI a Z. WĘGLARZ. Intraspecific variability in the content of phenolic compounds, essential oil and mucilage of small-leaved lime (*Tilia cordata* Mill.) from Poland. *Industrial Crops and Products* [online]. 2015, **78**, 58-65. ISSN 09266690. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.10.002.
- [30] SPIRIDON, Iuliana, Constantin NECHITA, Marius NICULAU, Mihaela SILION, Alice ARMATU, Carmen-Alice TEACĂ a Ruxanda BODÎRLĂU. Antioxidant and chemical properties of *Inula helenium* root extracts. *Open Chemistry* [online]. 2013, **11**(10), 1699-1709 [cit. 2022-03-06]. ISSN 2391-5420. Dostupné z: doi:10.2478/s11532-013-0295-3
- [31] STOJANOVIĆ-RADIĆ, Zorica, Marina DIMITRIJEVIĆ, Marija GENČIĆ, Milica PEJČIĆ, Niko RADULOVIĆ a Anna K. KISS. Anticandidal activity of *Inula helenium* root essential oil: Synergistic potential, anti-virulence efficacy and mechanism of action. *Industrial Crops*

- and Products* [online]. 2020, 2015, **149**(3), 713-721 [cit. 2022-03-05]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2020.112373
- [32] TAYINI, M., ARER, E. (2014). Isolation and quantification of alantolactone/isoalantolactone from the roots of *Inula helenium* subsp. *turcoracemosa*.;2013; 10 (3), 447-452, 2013
- [33] LIU, Xin, Lijuan BIAN, Xiaoqin DUAN, Xinming ZHUANG, Yujie SUI, Longfei YANG, Michaela A. DIPPOLD a Mutez Ali AHMED. Alantolactone: A sesquiterpene lactone with diverse pharmacological effects. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2021, 98(6), 1131-1145 [cit. 2022-03-15]. ISSN 1747-0277. Dostupné z: doi:10.1111/cbdd.13972
- [34] RASUL, Azhar, Muhammad KHAN, Muhammad ALI, Jiang LI, Xiaomeng LI, Longfei YANG, Michaela A. DIPPOLD a Mutez Ali AHMED. Targeting apoptosis pathways in cancer with alantolactone and isoalantolactone: A sesquiterpene lactone with diverse pharmacological effects. *The Scientific World Journal* [online]. 2013, 2013(6), 1-9 [cit. 2022-03-15]. ISSN 1537-744X. Dostupné z: doi:10.1155/2013/248532
- [35] GIERLIKOWSKA, Barbara, Wojciech GIERLIKOWSKI, Katarzyna BEKIER, Krystyna SKALICKA-WOŹNIAK, Monika E. CZERWIŃSKA a Anna K. KISS. *Inula helenium* and *Grindelia squarrosa* as a source of compounds with anti-inflammatory activity in human neutrophils and cultured human respiratory epithelium. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2020, 2015, 249(4(1), 101-107 [cit. 2022-03-05]. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2019.112311
- [36] SOWNDHARARAJAN, Kandhasamy, Haeme CHO, Byoungsun YU, Jaeun SONG, Songmun KIM a Anna K. KISS. Effect of inhalation of essential oil from *Inula helenium* L. root on electroencephalographic (EEG) activity of the human brain. *European Journal of Integrative Medicine* [online]. 2016, 2015, 8(4), 453-457 [cit. 2022-03-05]. ISSN 18763820. Dostupné z: doi:10.1016/j.eujim.2016.01.005
- [37] LIVINT Popa L, DRAGOS H, PANTELEMON C, VERISEZAN Rosu O, STRILCIUC S. The role of quantitative EEG in the diagnosis of neuropsychiatric disorders. *J Med Life*. 2020;13(1):8-15. doi:10.25122/jml-2019-0085
- [38] LOBO, V, A PATIL, A PHATAK a N CHANDRA. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* [online]. 2010, 4(8) [cit. 2022-03-13]. ISSN 0973-7847. Dostupné z: doi:10.4103/0973-7847.70902

- [39] Engwa GA, EnNwekegwana FN, Nkeh-Chungag BN. Free radicals, oxidative stress-related diseases and antioxidant supplementation. *Altern Ther Health Med*. 2022 Jan;28(1):114-128. PMID: 32827401.
- [40] LI, Sen, Guowei CHEN, Chao ZHANG, Man WU, Shuyan WU a Qing LIU. Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. *Food Science and Human Wellness: Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [online]*. 2014, 3(3-4), 110-116 [cit. 2022-03-27]. ISSN 22134530. Dostupné z: doi:10.1016/j.fshw.2014.11.002
- [41] SHARIFI-RAD, Mehdi, Nanjangud V. ANIL KUMAR, Paolo ZUCCA, et al. Lifestyle, Oxidative stress, and antioxidants: back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Frontiers in Physiology [online]*. 2020, 11, 111-118 [cit. 2022-03-24]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2020.00694
- [42] ZLATIĆ, Iuliana, Constantin JAKOVLJEVIĆ, Marius STANKOVIĆ, Mihaela SILION, Alice ARMATU, Carmen-Alice TEACĂ a Ruxanda BODÎRLĂU. Temporal, plant part, and interpopulation variability of secondary metabolites and antioxidant activity of *Inula helenium L.* *Plants [online]*. 2019, 8(6), 1699-1709 [cit. 2022-03-06]. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants8060179
- [43] GAO, Shun-Hua, Tian-Rui ZHAO, Ya-Ping LIU, Yi-Fen WANG, Gui-Guang CHENG, Jian-Xin CAO a Ruxanda BODÎRLĂU. Phenolic constituents, antioxidant activity and neuroprotective effects of ethanol extracts of fruits, leaves and flower buds from *Vaccinium dunalianum* Wight. *Food Chemistry [online]*. 2022, 374(6), 1699-1709 [cit. 2022-03-06]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2021.131752
- [44] JAFARI, Saeid, Krongkan THONGMAT, Isaya KIJPATANASILP, Paramaporn KERDSUP, Phisut NAKNAEN, Malai TAWEECHOTIPATR a Kitipong ASSATARAKUL. Phenolic compound profile of probiotic (*Lacticaseibacillus rhamnosus* LR5) fortified vegetable tablet and probiotic survival in the simulated gastrointestinal tract. *Scientific Reports [online]*. 2022, 12(1), 1699-1709 [cit. 2022-03-06]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-022-04874-z
- [45] PANCHE, A. N., A. D. DIWAN, S. R. CHANDRA, et al. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science [online]*. 2016, 5, 111-118 [cit. 2022-03-24]. ISSN 2048-6790. Dostupné z: doi:10.1017/jns.2016.41

- [46] ZAITER, Ali, Loïc BECKER, Marie-Céleste KARAM a Amadou DICKO. Effect of particle size on antioxidant activity and catechin content of green tea powders. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2016, 53(4), 2025-2032 [cit. 2022-04-05]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-016-2201-4
- [47] NOVÁČEK, František. *Fytochemické základy botaniky*. Vyd. 2., dopl. Olomouc: Fontána, [2008]. ISBN 978-80-7336-457-1.
- [48] DENG, Yuanyuan, Yongxuan MA, Huijuan LIU, Yan ZHANG, Zhencheng WEI, Guang LIU, Xiaojun TANG a Xuchao JIA. Structure determination, bitterness evaluation and hepatic gluconeogenesis inhibitory activity of triterpenoids from the *Momordica charantia* fruit. *Food Chemistry* [online]. 2022, 372(1) [cit. 2022-03-10]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2021.131224
- [49] CHEN, Yu-Hong, Yan-Hong ZHANG, Gen-Sheng CHEN, Jun-Feng YIN, Jian-Xin CHEN, Fang WANG a Yong-Quan XU. Effects of phenolic acids and quercetin-3-O-rutinoside on the bitterness and astringency of green tea infusion. *Npj Science of Food* [online]. 2022, 6(1) [cit. 2022-03-10]. ISSN 2396-8370. Dostupné z: doi:10.1038/s41538-022-00124-8
- [50] NAZARI, Meisam. Plant mucilage components and their functions in the rhizosphere. *Rhizosphere* [online]. 2021, 18 [cit. 2022-03-15]. ISSN 24522198. Dostupné z: doi:10.1016/j.rhisph.2021.100344
- [51] NAZARI, Meisam, Sophie RIEBELING, Callum C. BANFIELD, Asegidew AKALE, Margherita CROSTA, Kyle MASON-JONES, Michaela A. DIPPOLD a Mutez Ali AHMED. Mucilage polysaccharide composition and exudation in maize from contrasting climatic regions. *Frontiers in plant science* [online]. 2020, 11 [cit. 2022-03-15]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2020.587610
- [x] KALAJI, Mohamed H., Vasilij N. GOLTSEV, Krystyna ZUK-GOLASZEWSKA, Marek ZIVCAK a Marian BRESTIC. *Chlorophyll fluorescence, understanding crop performance* [online]. 2017-05-23 [cit. 2022-04-23]. Dostupné z: doi:10.1201/9781315153605
- [52] Hardness of Water. Science for a changing world: Water Science School [online]. June 2018 [cit. 2022-03-20]. Dostupné z: <https://www.usgs.gov/special-topics/water-science-school/science/hardness-water>

- [53] Hard water. LibreTexts [online]. August 2020 [cit. 2022-03-20]. Dostupné z: [https://batch.libretexts.org/print/url=https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_and_Websites_\(Inorganic_Chemistry\)/Descriptive_Chemistry/Main_Group_Reactions/Hard_Water.pdf](https://batch.libretexts.org/print/url=https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_and_Websites_(Inorganic_Chemistry)/Descriptive_Chemistry/Main_Group_Reactions/Hard_Water.pdf)
- [54] CABRERA, Mica, Faizah TAHER, Alendre LLANTADA, Quyen DO, Tyeshia SAPP a Monika SOMMERHALTER. Effect of water hardness on catechin and caffeine content in green tea infusions. *Molecules* [online]. 2021, 26(12), 1-16 [cit. 2022-03-20]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26123485
- [55] XU, Yong-Quan, Chun ZOU, Ying GAO, Jian-Xin CHEN, Fang WANG, Gen-Sheng CHEN a Jun-Feng YIN. Effect of the type of brewing water on the chemical composition, sensory quality and antioxidant capacity of Chinese teas. *Food Chemistry* [online]. 2017, October 2016, 236, 142-151 [cit. 2022-03-22]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2016.11.110
- [56] VUONG, Quan V., John B. GOLDING, Costas E. STATHOPOULOS, et al. Effects of aqueous brewing solution pH on the extraction of the major green tea constituents. *Food Research International* [online]. 2013, July 2016, 53(2), 713-719 [cit. 2022-03-21]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2012.09.017
- [57] CAO, Qing-Qing, Yan-Qing FU, Cheng-Bin ZHANG, et al. Effect of brewing water on the antioxidant capacity of green tea infusion with DPPH Assay. *Journal of Chemistry* [online]. 2022, 2022, 1-8 [cit. 2022-03-24]. ISSN 2090-9071. Dostupné z: doi:10.1155/2022/7736117
- [58] MURUGESAN, P., G. VENKATESWARAN a V.A. SHANMUGA SELVAN. Effect of water hardness and free residual chlorine on black tea brew [online]. October 2016, vol.119 (11), 721-724 [cit. 2022-03-22]. Dostupné z: doi:10.5281/zenodo.1127623
- [59] FAN, Fang-Yuan, Meng SHI, Ying NIE, Yue ZHAO, Jian-Hui YE, Yue-Rong LIANG a Jun-Feng YIN. Differential behaviors of tea catechins under thermal processing: Formation of non-enzymatic oligomers. *Food Chemistry* [online]. 2016, October 2016, 196, 347-354 [cit. 2022-03-22]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.056
- [60] LI, Na, Lynne S. TAYLOR, Mario G. FERRUZZI, Lisa J. MAUER, Jian-Hui YE, Yue-Rong LIANG a Jun-Feng YIN. Kinetic study of catechin stability: effects of pH, concentration, and temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012, October

- 2016, 60(51), 12531-12539 [cit. 2022-03-22]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf304116s
- [61] Effects of high performance inulin supplementation on glycemic control and antioxidant status in women with type 2 diabetes. *Diabetes Metab J.* 2013 Apr;37(2):140-8. doi: 10.4093/dmj.2013.37.2.140. Epub 2013 Apr 16. PMID: 23641355; PMCID: PMC3638225.
- [62] OWUSU APENTEN, Richard, Prince ASARE, Sahil GUPTA, Jasvinder SINGH a Anupurna KOUL. A FRAP Assay at pH 7 unveils Extra antioxidant activity from green, black, white and rooibos tea but not apple tea: A Review. *Food and Nutrition Report* [online]. 2015, 1(1), 16-23 [cit. 2022-03-29]. ISSN 20598564. Dostupné z: doi:10.24218/fnr.2015.03
- [63] MITSUHASHI, Tomiko a Mariko TAJIMA. Effect of water hardness on green tea infusions [online]. July 2016 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: doi:10.11402/cookeryscience.49.216
- [64] ZHANG, Haihua, Yulan JIANG, Yangjun LV, et al. Effect of water quality on the main components in Fuding white tea infusions. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2017, July 2016, 54(5), 1206-1211 [cit. 2022-03-21]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-017-2571-2
- [65] PÉREZ-BURILLO, S., R. GIMÉNEZ, J.A. RUFÍAN-HENARES, et al. Effect of brewing time and temperature on antioxidant capacity and phenols of white tea: Relationship with sensory properties. *Food Chemistry* [online]. 2018, 248, 111-118 [cit. 2022-03-24]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2017.12.056
- [66] MALEKI, Afshin et al. Effect of brewing time and water hardness on fluoride release FROM DIFFERENT IRANIAN TEAS. *Fluoride* [online]. 2016, vol. 49, no. 3, s. 263-273. ISSN 00154725.
- [67] JAJOO, Anjana, Milán SZABÓ, Ottó ZSIROS, Győző GARAB a Marian BRESTIC. Low pH induced structural reorganization in thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2012, 2017-05-23, 1817(8), 1388-1391 [cit. 2022-04-23]. ISSN 00052728. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbabi.2012.01.002
- [68] MORRIS, Rob, Ethan B. DYER, Jessica L. FEIG, Anna L. CHIEN a Sandra DEL BINO. Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry. *Current Protocols Essential*

- Laboratory Techniques* [online]. 2015, **11**(1), 3-12.e1 [cit. 2022-03-29]. ISSN 1948-3430. Dostupné z: doi:10.1002/9780470089941.et0201s11
- [69] *Světlo: Elektromagnetické vlnění, spektrum a fotony: Vlastnosti elektromagnetického záření a fotonů* [online]. [cit. 2022-04-03]. Dostupné z: <https://cs.khanacademy.org/science/obecnachemie/xefd2aace53b0e2de:atomy-a-jejich-vlastnosti/xefd2aace53b0e2de:fotoelektronova-spektroskopie/a/light-and-the-electromagnetic-spectrum>
- [70] LY, Bao Chau K., Ethan B. DYER, Jessica L. FEIG, Anna L. CHIEN a Sandra DEL BINO. Research techniques made simple: cutaneous colorimetry. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2020, **140**(1), 3-12.e1 [cit. 2022-03-29]. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jid.2019.11.003
- [71] M.V.RAJA, Pavan a Andrew R.BARRON. Using UV-Vis for the detection and characterization of silicon quantum dots. *LibreTexts* [online]. March 2021 [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_\(Barron\)/08%3A_Structure_at_the_Nano_Scale/8.05%3A_Using_UV-Vis_for_the_detection_and_characterization_of_silicon_quantum_dots](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/08%3A_Structure_at_the_Nano_Scale/8.05%3A_Using_UV-Vis_for_the_detection_and_characterization_of_silicon_quantum_dots).
- [72] LU, Renfu a Haiyan CEN. Measurement of Food Optical Properties. Hyperspectral imaging technology in food and agriculture [online]. New York, NY: Springer New York, 2015, 2015, 203-226 [cit. 2022-03-29]. Food Engineering Series. ISBN 978-1-4939-2835-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2836-1_8
- [73] MACDOUGALL, D.B, Guowei CHEN, Chao ZHANG, Man WU, Shuyan WU a Qing LIU. Colour measurement of food: principles and practice. *Colour measurement: treasure island (FL): StatPearls Publishing* [online]. Elsevier, 2010, 2010, **3**(3-4), 312-342 [cit. 2022-03-27]. ISBN 9781845695590. ISSN 22134530. Dostupné z: doi:10.1533/9780857090195.2.312
- [74] SISWANTORO, Joko, Guowei CHEN, Chao ZHANG, Man WU, Shuyan WU a Qing LIU. Application of color and size measurement in food products inspection: principles and practice. *Indonesian journal of information Systems: Treasure Island (FL): StatPearls Publishing* [online]. Elsevier, 2019, 2010, **1**(2), 90-107 [cit. 2022-03-27]. ISBN 9781845695590. ISSN 2623-2308. Dostupné z: doi:10.24002/ijis.v1i2.1923
- [75] MARKOVIC, Ivana et al.; Color measurement of food products using CIE L*a*b* and RGB

color space.” *Journal of Hygienic Engineering and Design* 4 (2013): 50-53.

- [76] BOTEK, M. Měření barevných souřadnic materiálu v průmyslové výrobě. Zlín, 2014. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [77] PANÁK, O. Věda pro papírové artefakty: Měření barevnosti. Univerzita Pardubice, 2015. ISBN 8073959178.
- [78] Spectrophotometry [online]. LibreTexts, January 2022 [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <https://chem.libretexts.org/@go/page/1431>
- [79] Color Measurement in Food Industry [online]. 2019 [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <http://www.measuringcolor.com/colour-measurement-food.html>
- [80] Reflectance Measurements: Specular included versus Specular Excluded. HunterLab [online]. Dostupné také z: <https://support.hunterlab.com/hc/en-us/articles/203993775-Reflectance-Measurements-Specular-Included-versus-Specular-Excluded-an04-01r2>
- [81] FERNÁNDEZ-GARCÍA, Aránzazu, Florian SUTTER, Lucía MARTÍNEZ-ARCOS, Christopher SANSOM, Fabian WOLFERTSTETTER a Christine DELORD. Equipment and methods for measuring reflectance of concentrating solar reflector materials: Comparison of different food classification systems. *Solar energy materials and solar cells* [online]. New York, NY: Springer New York, 2017, 2015, **167**(4), 28-52 [cit. 2022-03-29]. Food Engineering Series. ISBN 978-1-4939-2835-4. ISSN 09270248. Dostupné z: doi:10.1016/j.solmat.2017.03.036
- [82] DE ARAÚJO, Taissa Pereira, Milena Miranda DE MORAES, Cláudia AFONSO, Cristina SANTOS a Sara S. P. RODRIGUES. Food processing: comparison of different food classification systems. *Nutrients* [online]. New York, NY: Springer New York, 2022, 2015, **14**(4), 203-226 [cit. 2022-03-29]. Food Engineering Series. ISBN 978-1-4939-2835-4. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu14040729
- [83] Wong FC, Yong AL, Ting EP, Khoo SC, Ong HC, Chai TT. Antioxidant, metal chelating, anti-glucosidase activities and phytochemical analysis of selected tropical medicinal plants. *Iran J Pharm Res.* 2014;13(4):1409-1415.
- [84] SUDAN, Rasleen, Madhulika BHAGAT, Sahil GUPTA, Jasvinder SINGH a Anupurna

- KOUL. Iron (FeII) Chelation, ferric reducing antioxidant power, and immune modulating potential of arisaema jacquemontii (Himalayan Cobra Lily): A Review. *BioMed Research International* [online]. 2014, **2014**(7), 1-7 [cit. 2022-03-29]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2014/179865
- [85] MUNTEANU, Irina Georgiana a Constantin APETREI. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(7), 757-781 [cit. 2022-03-29]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22073380
- [86] *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 22. 2021 [cit. 2022-03-29]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/7/3380>
- [87] SHAHIDI, Fereidoon a Ying ZHONG. Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods* [online]. 2015, **18**, 757-781 [cit. 2022-03-29]. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2015.01.047
- [88] ADJIMANI, Jonathan P., Prince ASARE, Sahil GUPTA, Jasvinder SINGH a Anupurna KOUL. Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators: A Review. *Toxicology Reports* [online]. 2015, **2**(7), 721-728 [cit. 2022-03-29]. ISSN 22147500. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxrep.2015.04.005
- [89] Aparadh, V.T., Naik, V.V. and Karadge, B.A. 2012. Antioxidative properties (TPC, DPPH, FRAP, Metal chelating ability, reducing power and TAC) within some cleome species. *Annali di Botanica*. 2, (May 2012), 49–56. DOI:<https://doi.org/10.4462/annbotrm-9958>.
- [90] NEUGEBAUEROVÁ J., a VÁBKOVÁ J. Antioxidační aktivita a látky fenolické povahy v rodu máta (mentha l.) [online]. Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta, Ústav zelinářství a květinářství, 2011, 395-401 [cit. 2022-03-30]. ISSN 0139-6013. Dostupné z: <http://www.cbks.cz/rostliny2011/prispevky/NeugebauerovaVabkova.pdf>
- [91] S. SHAROPOVA, Farukh, Michael WINKA a William N. SETZER. Radical scavenging and antioxidant activities of essential oil components – an experimental and computational investigation [online]. 2015 [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: doi:10.1177/1934578X1501000135
- [92] ZHONG, Y., F. SHAHIDI, Sahil GUPTA, Jasvinder SINGH a Anupurna KOUL. Methods for

- the assessment of antioxidant activity in foods¹¹. This chapter is reproduced to a large extent from an article in press by the authors in the *Journal of Functional Foods: A Review. Handbook of Antioxidants for Food Preservation* [online]. Elsevier, 2015, 2015, **1**(1), 287-333 [cit. 2022-03-29]. ISBN 9781782420897. ISSN 20598564. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9
- [93] PAVUN, Leosava, Predrag ĐURĐEVIĆ, Milena JELIKIĆ-STANKOV, Daniela ĐIKANOVIĆ a Snežana USKOKOVIĆ-MARKOVIĆ. Determination of flavonoids and total polyphenol contents in commercial apple juices. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta, Ústav zelinářství a květinářství, 2018, 2011, **36**(3), 233-238 [cit. 2022-03-30]. ISSN 12121800. Dostupné z: doi:10.17221/211/2017-CJFS
- [94] WAN, Huihua, Chao YU, Yu HAN, et al. Determination of flavonoids and carotenoids and their contributions to various colors of rose cultivars (*Rosa* spp.). *Frontiers in Plant Science* [online]. Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta, Ústav zelinářství a květinářství, 2019, 2011, **10**(3), 233-238 [cit. 2022-03-30]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2019.00123
- [95] Infrared Spectroscopy. *LibreTexts* [online]. August 15, 2020 [cit. 2022-03-30]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy#title](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy#title)
- [96] How an FTIR Spectrometer operates. *LibreTexts* [online]. December 3, 2020 [cit. 2022-03-30]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/How_an_FTIR_Spectrometer_Operates](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/How_an_FTIR_Spectrometer_Operates)
- [97] ZHAO, Ling-jia, Wei LIU, Su-hui XIONG, et al. Determination of total flavonoids contents and antioxidant activity of ginkgo biloba leaf by Near-Infrared reflectance method. *International Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2018, December 3, 2020, **2018**, 1-7 [cit. 2022-03-30]. ISSN 1687-8760. Dostupné z: doi:10.1155/2018/8195784
- [98] WANG, Xichang, Wei LIU, Su-hui XIONG, et al. Near-infrared spectroscopy for food

- quality evaluation. *Evaluation technologies for food quality* [online]. Elsevier, 2019, 2019, **2018**, 105-118 [cit. 2022-03-30]. ISBN 9780128142172. ISSN 1687-8760. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814217-2.00007-X
- [99] NAWROCKA, Agnieszka, Joanna LAMORSK, Su-hui XIONG, et al. Determination of food quality by using spectroscopic methods. *Advances in agrophysical research* [online]. InTech, 2013, 2013-07-31, **2018**, 105-118 [cit. 2022-03-30]. ISBN 978-953-51-1184-9. ISSN 1687-8760. Dostupné z: doi:10.5772/52722
- [100] ENGLERT, Christoph R., John M. HARLANDER, Charles M. BROWN, et al. Michelson interferometer for global high-resolution thermospheric imaging (MIGHTI): Instrument design and calibration. *Space Science Reviews* [online]. InTech, 2017, 2013-07-31, **212**(1-2), 553-584 [cit. 2022-03-30]. ISBN 978-953-51-1184-9. ISSN 0038-6308. Dostupné z: doi:10.1007/s11214-017-0358-4
- [101] PATOČKA, J. Využití ICP-MS ve spojení s ETV v analýze vzorků životního prostředí [online]. Pardubice, 2019. Disertační práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.
- [102] OTTERSON, David W. Tech Talk: (11) pH measurement and control basics. *Measurement and Control* [online]. 2015, **48**(10), 309-312 [cit. 2022-04-06]. ISSN 0020-2940. Dostupné z: doi:10.1177/0020294015600474
- [103] SARDARY, Hamidreza a Rudolf HOLZE. Conductometry: (11) pH measurement and control basics. *Encyclopedia of Applied Electrochemistry* [online]. New York, NY: Springer New York, 2014, 2014-9-25, **48**(10), 264-268 [cit. 2022-04-06]. ISBN 978-1-4419-6995-8. ISSN 0020-2940. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4419-6996-5_218
- [104] *UltraScan® VIS Supplemental Manual for EasyMatch® QC*; HunterLab [online]. Reston, Virginia 20190 USA, 5-11 [cit. 2022-04-07]. Dostupné z: <https://www.hunterlab.com/media/documents/ultrascan-vis-supplemental-manual-for-easymatch-qc-en.pdf>
- [105] DELTA E, DELTA H, DELTA T: WHAT DOES IT MEAN? [online]. 1-4 [cit. 2022-04-13]. Dostupné z: <https://pdf4pro.com/view/delta-e-delta-h-delta-t-what-does-it-mean-1ea720.html>
- [106] HLOUŠKOV, T. Chemické a fyzikální vlastnosti lipového sirupu [online]. Pardubice, 2021.

Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.

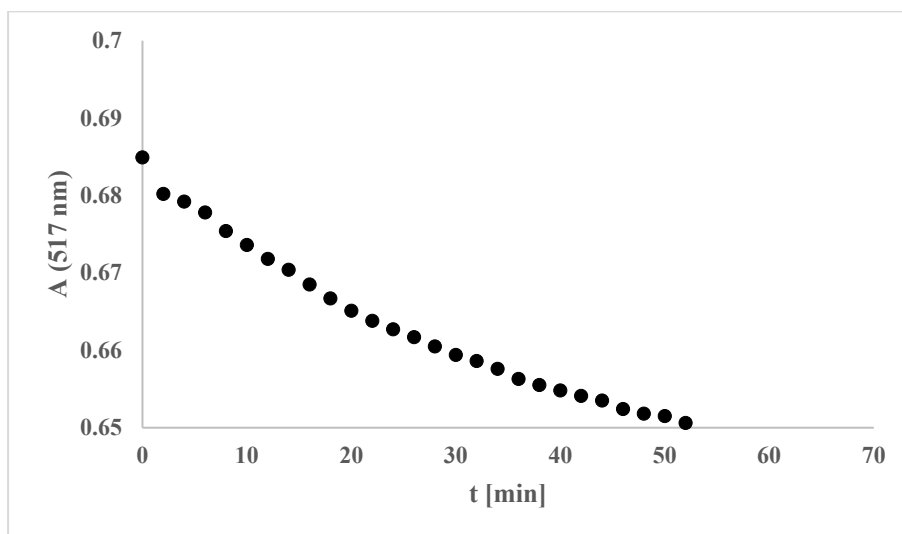
- [107] JELÍNKOVÁ, K. Vliv přísadků karobového prášku na antioxidační vlastnosti muffinů [online]. Pardubice, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.
- [108] *ICP-MS přístroje: 7900 ICP-MS* [online]. [cit. 2022-04-17]. Dostupné z: https://www.agilent.com/en/product/atomic-spectroscopy/inductively-coupled-plasma-mass-spectrometry-icp-ms/icp-ms-instruments/7900-icp-ms?fbclid=IwAR3iFg78YJ0JH0JBTtcefvOoEaJuNLj93vjxA92x2PioXm2JI9zp_5vVLnI
- [109] GHOSH, Arunangshu, Bipan TUDU, Pradip TAMULY, Nabarun BHATTACHARYYA a Rajib BANDYOPADHYAY. Prediction of theaflavin and thearubigin content in black tea using a voltammetric electronic tongue. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* [online]. 2012, **116**, 57-66 [cit. 2022-05-02]. ISSN 01697439. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemolab.2012.04.010
- [110] WERDAN, Karl, Hans W. HELDT, Mirjana MILOVANCEV, Nabarun BHATTACHARYYA a Rajib BANDYOPADHYAY. The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. Studies on CO₂ fixation in the light and dark. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 1975, **396**(2), 276-292 [cit. 2022-05-02]. ISSN 00052728. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2728(75)90041-9
- [111] GRUBE, M., M. BEKERS, D. UPITE, E. KAMINSKA a Rajib BANDYOPADHYAY. Infrared spectra of some fructans. *Spectroscopy* [online]. 2002, **16**(3-4), 289-296 [cit. 2022-05-02]. ISSN 0712-4813. Dostupné z: doi:10.1155/2002/637587

SEZNAM PŘÍLOH

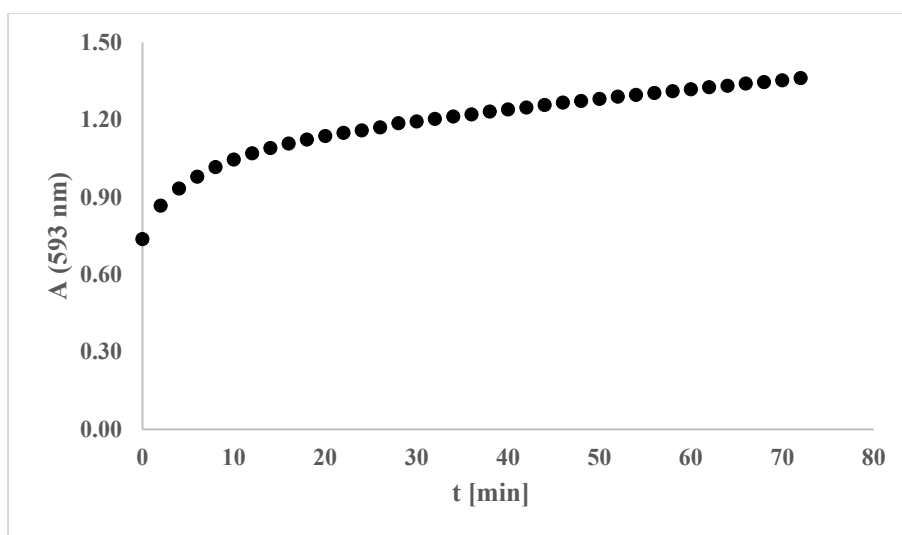
Příloha 1 Optimalizace metody DPPH	90
Příloha 2 Optimalizace metody FRAP	90
Příloha 3 Optimalizace metody pro stanovení fenolických látek	90
Příloha 4 Optimalizace metody pro stanovení obsahu flavonoidů	91
Příloha 5 Kalibrační křivka metody DPPH	91
Příloha 6 Kalibrační křivka metody FRAP	91
Příloha 7 Kalibrační křivka pro stanovení celkového obsahu fenolických látek.....	92
Příloha 8 Kalibrační křivka pro stanovení celkového obsahu flavonoidů.....	92
Příloha 9 Kalibrační křivka pro stanovení obsahu katechinů	92

PŘÍLOHA

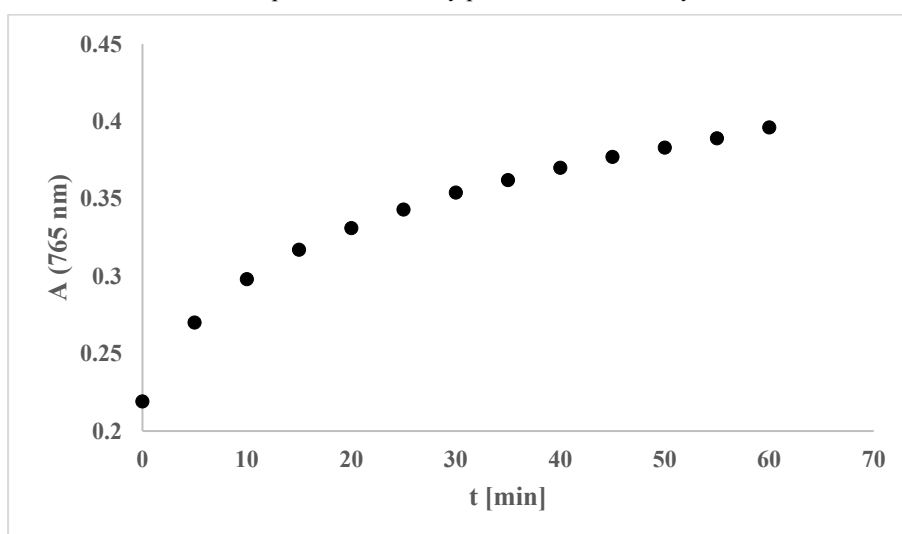
Příloha 1 Optimalizace metody DPPH



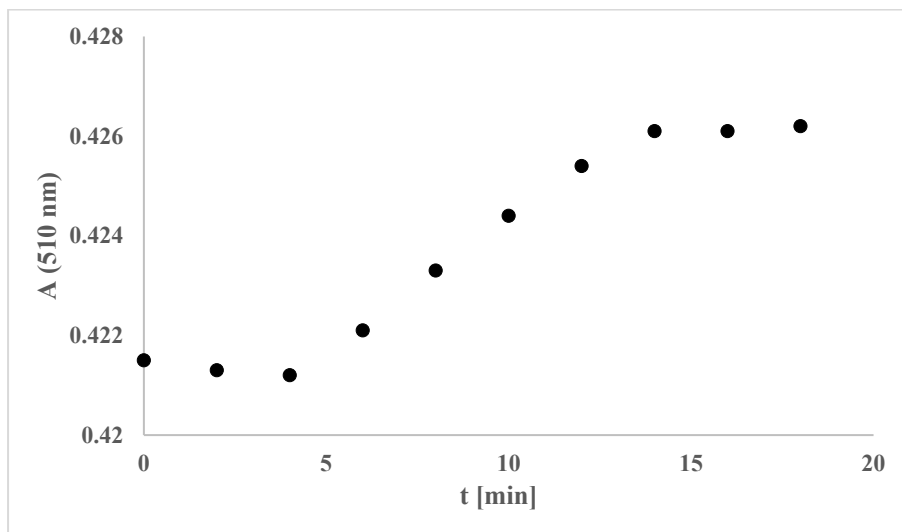
Příloha 2 Optimalizace metody FRAP



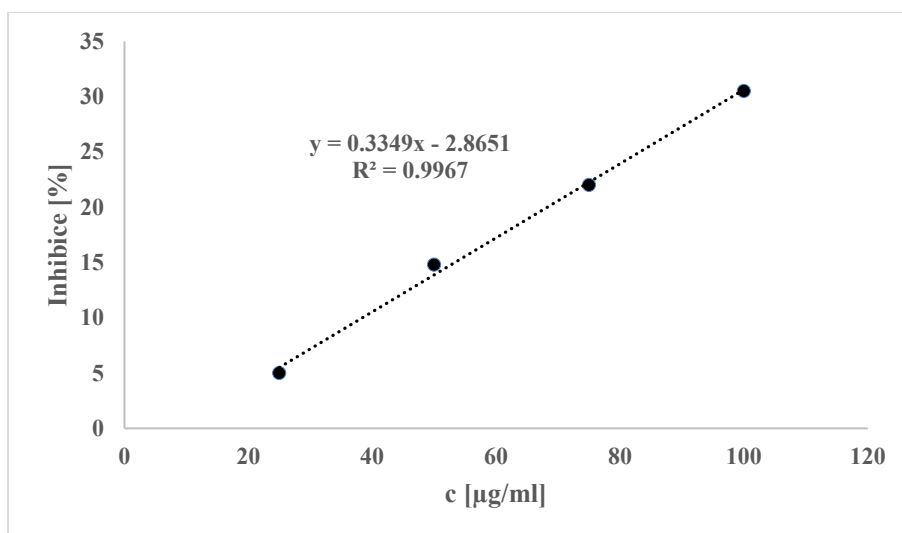
Příloha 3 Optimalizace metody pro stanovení fenolických látek



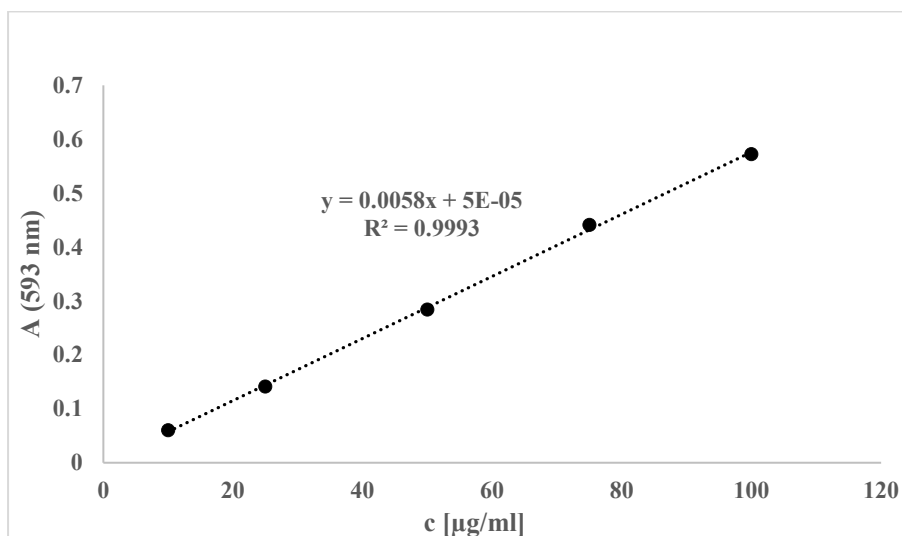
Příloha 4 Optimalizace metody pro stanovení obsahu flavonoidů



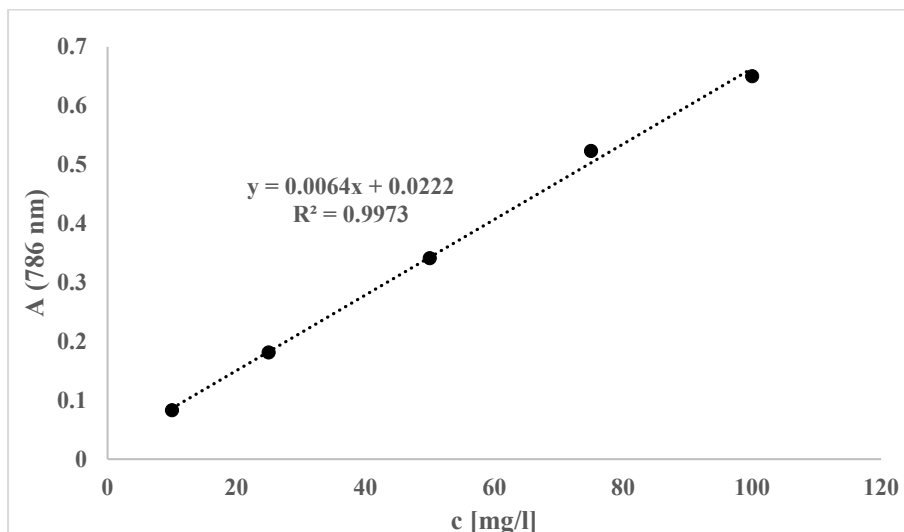
Příloha 5 Kalibrační křivka metody DPPH



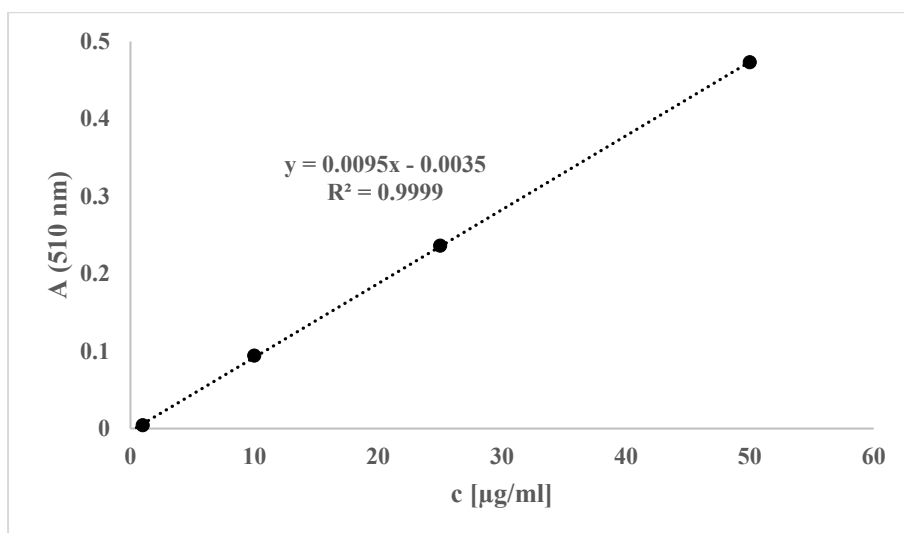
Příloha 6 Kalibrační křivka metody FRAP



Příloha 7 Kalibrační křivka pro stanovení celkového obsahu fenolických látek



Příloha 8 Kalibrační křivka pro stanovení celkového obsahu flavonoidů



Příloha 9 Kalibrační křivka pro stanovení obsahu katechinů

