

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Analýza biologicky aktivních látek v lichořeřišnici

**Karel Bartoš**

Bakalářská práce

2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Karel Bartoš**  
Osobní číslo: **C16007**  
Studijní program: **B2802 Chemie a technická chemie**  
Studijní obor: **Chemie a technická chemie**  
Název tématu: **Analýza biologicky aktivních látek v lichořeřišnici**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na analýzu významných biologicky aktivních látek obsažených v lichořeřišnici. Věnujte se především způsobům extrakce a dále samotné analýze výsledných extraktů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a spojení s hmotnostní spektrometrií. Pozornost věnujte rovněž metodám stanovení antioxidační kapacity se zaměřením na látky obsažené v lichořeřišnici.
2. Na základě poznatků z literatury vyberte pro experimentální část vhodnou metodu pro stanovení antioxidační kapacity extraktů z lichořeřišnice.
3. Výsledky experimentálně zjištěné a prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucí práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

**5. února 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2019

---

Karel Bartoš

## **ANOTACE**

Cílem této bakalářské práce je stanovení biologicky aktivních látek v lichořeřišnici pomocí moderních analytických technik. V teoretické části jsou shrnuty informace o lichořeřišnici a biologicky aktivních látkách v ní obsažených. Dále jsou zde informace o pozitivních účincích této rostliny na zdraví člověka. Dále jsou popsány analytické metody vhodné pro stanovení zdraví prospěšných látek v lichořeřišnici. Praktická část bakalářské práce je věnována stanovení celkového obsahu fenolických látek a antioxidační kapacity pomocí spektrofotometrických technik u vodně metanolicých extraktů připravených z mražené rostliny a běžně dostupných kapek z lichořeřišnice.

### **Klíčová slova**

Lichořeřišnice, DPPH, ABTS, antioxidační aktivita, antioxidanty, Folin-Ciocalteu metoda

### **Title**

Analysis biological activity in nasturtium flower

## **ANNOTATION**

The aim of this bachelor thesis is the determination of biologically active compounds in nasturtium using modern analytical techniques. In the theoretical part, the information about nasturtium and biologically active compounds presented in this plant are summarized. There is also information about the positive effects of this plant on human health. Further, the analytical methods suitable for the determination of health-promoting compounds in nasturtium are discussed. The practical part of the bachelor thesis is devoted to the determination of the total content of phenolic compounds and antioxidant capacity by means of spectrophotometric techniques for water-methanolic extracts prepared from frozen plants and commonly available drops from nasturtium.

### **Keywords**

Nasturtium, DPPH, ABTS, antioxidant activity, antioxidants, total phenolic contents

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěl bych poděkovat paní doc. Ing. Lence Česlové za získané nové vědomosti a užitečné rady, které mi poskytla v průběhu tvorby bakalářské práce.

## Seznam použitých zkratk

HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	Ultrafialová oblast
VIS	Viditelná oblast
IČ	Infračervená oblast
DAD	Detektor s diodovým polem
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
MS	Hmotnostní spektrometrie
TOF	Průletový analyzátor
FRAP	Antioxidační metoda založena na redukci železitých komplexů
LC	Kapalinová chromatografie
TPC	Celkový obsah fenolických látek

# OBSAH

Úvod .....	10
<b>1 Teoretická část .....</b>	<b>11</b>
1.1 Lichořeřišnice ( <i>Tropaeolum majus</i> L.) .....	11
1.1.1 Biologicky aktivní látky v lichořeřišnici .....	12
1.1.2 Využití lichořeřišnice v medicíně .....	12
1.2 Antioxidanty .....	13
1.3 Fenolické sloučeniny .....	14
1.4 Stanovení antioxidačních vlastností.....	14
1.4.1 Metoda ABTS .....	15
1.4.2 Metoda DPPH .....	15
1.5 Celkový obsah fenolických látek .....	16
1.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	16
1.6.1 Kolony a stacionární fáze .....	16
1.6.2 Mobilní fáze .....	17
1.6.3 Čerpadla .....	18
1.6.4 Dávkovací zařízení .....	18
1.6.5 Detektory ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii .....	19
1.7 Extrakce .....	20
1.7.1 Extrakce z pevné látky do kapaliny .....	21
1.7.2 Extrakce kapaliny kapalinou .....	22
1.8 Hmotnostní spektrometrie.....	22
1.8.1 Iontový zdroj.....	23
1.8.2 Hmotnostní analyzátory .....	23
1.8.3 Detektory .....	24
1.9 Stanovení biologické aktivních látek v lichořeřišnici.....	24
1.9.1 Zpracování rostliny .....	24
1.9.2 Spektrofotometrické metody.....	24
1.9.3 HPLC analýza .....	25
<b>2 Experimentální část .....</b>	<b>27</b>
2.1 Použité chemikálie .....	27

2.2	Použité přístroje .....	27
2.3	Použité vzorky lichořeřišnice.....	28
2.4	Použité vzorky bylinných kapek.....	28
2.5	Pracovní postupy.....	29
2.5.1	Metoda ABTS .....	29
2.5.2	Metoda DPPH .....	29
2.5.3	Stanovení množství fenolických látek .....	29
<b>3</b>	<b>Výsledky a diskuze.....</b>	<b>30</b>
3.1	Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS a DPPH .....	30
3.2	Stanovení celkového obsahu fenolických látek .....	32
	<b>Závěr .....</b>	<b>35</b>
	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>36</b>

## ÚVOD

V posledních letech byl pozorován velký zájem v oblasti antioxidantů vyskytujících se v rostlinách. Jedním populárním zástupcem této rostliny je lichořeřišnice větší (*Tropaeolum majus* L.). Lichořeřišnice je žluto-oranžově kvetoucí rostlina vyskytující se především v andském pohoří v Jižním Americe. Její výjimečnost tkví v obsahu mnoha léčivých látek. Jedná se především o glukotropaeolin, kyselinu askorbovou, flavanoidy, antokyaniny, karotenoidy či fenolické sloučeniny. Podstatou těchto léčivých látek je zabránění oxidativnímu stresu vlivem volných radikálů. Léčivé účinky lichořeřišnice však byly objeveny už mnohem dříve. Lichořeřišnice se pyšní antimikrobiálními, dezinfekčními a protizánětlivými vlastnostmi.

Způsoby separace a analýzy látek z rostliny jsou již dnes fundamentálně popsány. Stanovení jednotlivých látek je zpravidla provedeno pomocí kapalinové chromatografie, nejčastěji ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Lichořeřišnice (*Tropaeolum majus* L.)

*Tropaeolum majus* je kvetoucí rostlina z řádu brukvotvarých (Brassicales) a čeledi lichořeřišnicovitých (*Tropaeolaceae*) [1]. Vyskytuje se převážně v Andách v Jižní Americe [2] a Kolumbii [1]. Bylo popsáno již 80 druhů této rostliny [3]. Její vegetační období trvá od května do října. Patří do skupiny jednoletých rostlin, v jednom roce tedy vyklíčí, vyroste a zároveň vykvete, poté utvoří semena a zaniká. Po odkvětu vytváří trojpouzdrnou hnědě zbarvenou tobolku obsahující příčné semenné linie. Je pěstována jednak jako okrasná bylina, jednak pro své léčivé účinky. Rostlina kvete oranžově žlutě, vyznačuje se masitou lodyhou a dlouze řapíkatými listy. Její listy jsou téměř kruhového tvaru s několika žilkami vyzařujícími na hladce zaoblené nebo mírně lalokovité okraje [4].



Obrázek 1 Lichořeřišnice [5]

Užitečné jsou její nadzemní části, a sice list, květ a semeno, které se uchovávají po zamrazení tekutým dusíkem nebo lyofilizací [6]. V medicíně se využívá i její čerstvá šťáva, či extrakty připravené z různých částí čerstvé rostliny [4].

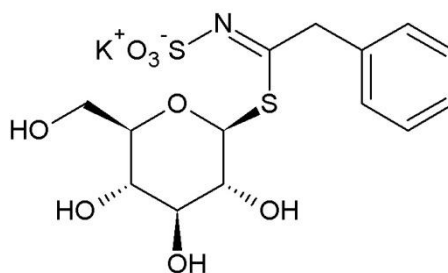
Zahradní lichořeřišnice představuje jeden z nejpopulárnějších zdrojů jedlých květů, a proto se přidává do polévek, masa, těstovinových pokrmů a pomazánek. Nerozvinutá poupata a zelená

semena se používají jako náhrada za kapary a nasekané nezralé plody lze použít místo křenu do tatarské omáčky [4].

### 1.1.1 Biologicky aktivní látky v lichořeřišnici

Významnou účinnou látkou lichořeřišnice je glukotropaeolin. Jedná se o sekundární metabolit skupiny glukosinolátů [7]. Struktura glukotropaeolinu je znázorněna na obrázku 2. Glukotropaeolin je štěpen enzymem skupiny hydroláz thioglukosidáza, známější pod názvem myrosináza (myrosin). Enzymatickým pochodem glukosinolátů je získáno hned několik produktů, jako jsou isothiokyanáty, thiokyanáty, nitrily a epithionitrily. Výzkumem bylo potvrzeno, že lichořeřišnice obsahuje pouze jeden hlavní glukosinolát, a to benzylglukosinolát.

Vzhledem k tomu, že jsou glukosinoláty někdy považovány za skladovací látky nebo prekurzory, je systém myrosinázy-glukosinolátu častěji považován za obranný systém proti býložravcům. Při orálním požití má totiž nahořklou až pepřovou chuť [8, 9].



Obrázek 2 Struktura sloučeniny glukotropaeolinu

Mezi další biologicky aktivní látky, obsažené v lichořeřišnici řadíme karotenoidy, fenolické kyseliny, anthokyaniny a flavonoidy (deriváty myricetinu, quercetinu akaempferolu) [1].

### 1.1.2 Využití lichořeřišnice v medicíně

*Tropaoleum majus* je široce využívána díky svým protizánětlivým, antiseptickým, antihypertenzivním a antidepresivním vlastnostem [10]. V lidovém léčitelství jsou její listy hojně využívány k léčbě kardiovaskulárních onemocnění [3]. Květy se pro obsah přírodních isothiokyanátů používají jako desinfekční prostředek i jako přírodní antiseptikum a antibiotikum na hojení ran [11, 12]. Dále se využívá při bakteriálních infekcích horních cest dýchacích a močového měchýře [13].

Její schopnost je také inhibovat rozvoj rakoviny s buněčnou proliferací, pozastavení buněčného cyklu a navození apoptózy [14]. Lze jí použít i externě, a to v dermatologii a kosmetice pro léčbu onemocnění kůže, nehtů a vlasů (lupy se svěděním a loupáním) a v neposlední řadě na popáleniny [4].

Dle nových studií může být potenciálním terapeutickým činidlem pro prevenci a léčbu obezity, jelikož inhibuje akumulaci lipidů [11].

## 1.2 Antioxidanty

Antioxidanty [14, 15] jsou sloučeniny, které již v nízké koncentraci mohou zabránit biomolekulám (cukry, lipidy, bílkoviny) oxidativnímu poškození volnými radikály. Zpomalují nebo zabraňují oxidaci jiné molekuly, a proto mohou být označovány jako redukční činidla. Deaktivují volné radikály, působící prostřednictvím přenosu atomů vodíku nebo jednotlivých elektronů. Inhibují oxidační řetězec několika reakčními pochody, inhibují také enzymy a chelatující ionty [16].

Volné radikály nebo reaktivní formy kyslíku vznikají kontinuálně díky normálnímu metabolismu a funkcím těla. Mechanismus prevence tvorby volných radikálů závisí na schopnosti antioxidantu zachytit nebo poskytnout protony, které mohou bránit volnému šíření. Zatímco zdravé tělo je schopno udržet rovnováhu mezi antioxidanty a volnými radikály vznikajícími během buněčného metabolismu, jakákoli forma narušení systému může vést k oxidačnímu stresu, který se zase podílí na vzniku různých onemocnění (poškození buněk a tkání, které může způsobit astma, Alzheimerovu chorobu, rakovinu atd.) [17].

Tyto antioxidanty jsou obsaženy především v ovoci, zelenině i ostatních částech rostlin. Většina výzkumů ukazuje, že zdravotní přínosy spojené s vysokou konzumací potravin bohatých na antioxidanty jsou právě způsobené jejich antioxidantní aktivitou [16].

Antioxidanty jako takové lze rozdělit do dvou kategorií, a to primární a sekundární antioxidanty. Primární aktivně inhibují oxidační reakce, sekundární inhibují oxidaci nepřímou. Jde především o mechanismy zachycování kyslíku nebo vazebné prooxidanty [15].

Vlastností antioxidantů se využívá také v potravinářství. Některé potravinářské výrobky je nutno konzervovat kvůli prodloužení trvanlivosti a udržení kvality. V současné době je snaha nahradit syntetické konzervačními látky přírodními látkami s antioxidantními vlastnostmi. Proto se dnes věnuje přírodním antioxidantům velká pozornost. Antioxidantní aktivita

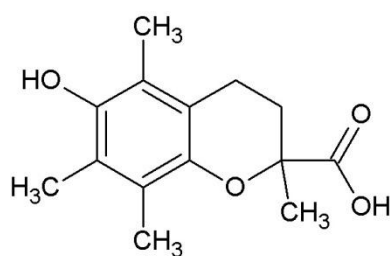
přírodních antioxidantů je závislá na faktorech prostředí jako je pH, iontová síla, nebo hydrofilní a lipofilní rovnováha [15, 16].

### 1.3 Fenolické sloučeniny

Fenolické látky jsou v přírodě jedny z nejvýznamnějších a nejrozšířenějších antioxidačních složek. Chemicky se jedná o různorodé deriváty fenolu. Jejich antioxidační aktivita souvisí právě s molekulární strukturou. Příjmem fenolických látek ve stravě či ve formě léčivých doplňků si organismus udržuje přirozenou homeostázu a účinně tak bojuje proti volným radikálům [18].

### 1.4 Stanovení antioxidačních vlastností

Antioxidační aktivita [19-21] je obecně vyjádřena jako schopnost sloučeniny inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin. Stanovit antioxidační aktivitu [19, 22] lze fyzikálními nebo chemickými metodami. Chemické metody jsou založeny na použití chemických činidel. Nejčastěji využívanou metodou je TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), kde se jako standardní látka využívá Trolox (Obrázek 3) a antioxidační kapacita vzorku se pak vyjadřuje jako počet molů Troloxu odpovídající 1 g nebo 1 ml stanovované látky. Mezi metody založené na eliminaci stabilních radikálů řadíme ABTS a DPPH, dále se často využívá metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), kde dochází k eliminaci kyslíkového radikálu.



Obrázek 3 Strukturální vzorec Troloxu

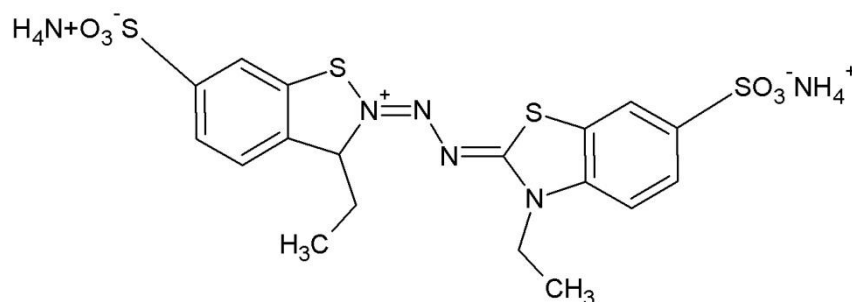
Další chemickou metodou je metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), která je založena na redukčních schopnostech stanovovaných látek. Principem je redukce komplexu TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazinu) s železitými ionty na železnaté, což se projeví modrým zbarvením. Intenzita zbarvení je úměrná redukčním schopnostem stanovované látky. Nevýhodou této metody je měření při velmi nízkém pH.

Fyzikální metody sledují změnu fyzikálních vlastností, jako je např. elektronová spinová rezonance, stanovení redoxního potenciálu či chemiluminiscence. Nejsou však založeny na sledování chemické reakce či změně obsahu látek.

Výše uvedené metody je možno vyhodnotit spektrofotometricky v UV/VIS oblasti [19-22].

### 1.4.1 Metoda ABTS

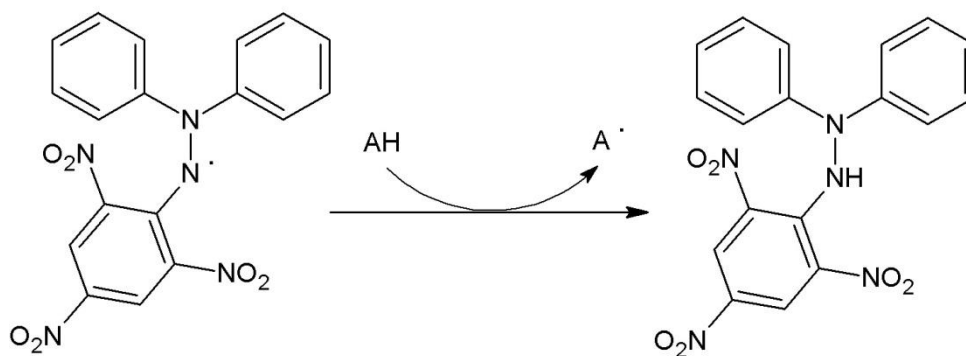
Metoda ABTS [19, 21, 23, 24] je jednou z nejpoužívanějších metod stanovení celkové antioxidační aktivity. Radikál kationt  $ABTS^{+\cdot}$  vzniká oxidací ABTS diamonné soli (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfsulfonová kyselina), obrázek 4) pomocí peroxidisíranu draselného, oxidu mangančitého či systému  $H_2O_2$ /peroxidáza. Působením antioxidantů dochází k odbarvení původně zeleného roztoku. Intenzita zbarvení je monitorována při vlnové délce 734 nm a odpovídá míře antioxidačních vlastností dané látky. ABTS metoda je řazena do metod TEAC, jelikož získaná antioxidační aktivita vzorků je přepočítána na ekvivalentní množství standardu Trolox.



Obrázek 4 Strukturní vzorec molekuly ABTS

### 1.4.2 Metoda DPPH

Princip metody je založen na reakci DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) stabilního radikálu s testovanou látkou. Tento stabilní radikál reaguje s donory vodíku, radikál se redukuje a vzniká DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Schéma této reakce je uvedeno na obrázku 5. V porovnání s metodou ABTS je DPPH radikál selektivnější, nereaguje s některými antioxidanty. Po proběhnutí reakce dojde k odbarvení původně fialového roztoku. Míra odbarvení je sledována spektrofotometricky při vlnové délce 515 nm [21, 23, 24].



Obrázek 5 Reakce molekuly DPPH

## 1.5 Celkový obsah fenolických látek

Ke stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin se používá Folin-Ciocalteauovo činidlo (směs kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové). Metoda je založena na redukci činidla fenolickými látkami v zásaditém prostředí za vzniku modrého zbarvení. Měří se absorpce při vlnové délce 760 nm, která je úměrná koncentraci polyfenolů. Pro stanovení celkových polyfenolů se jako standard používá kyselina gallová [16, 25].

## 1.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie [26-28] je separační metoda spočívající na fyzikálně-chemických principech, při kterých dochází k postupnému a opakovanému vytváření rovnovážných stavů mezi dvěma fázemi. Fáze, kterou je kolona naplněna, se nazývá stacionární (SF), kdežto fáze, která unáší separované látky přes stacionární fázi, se označuje jako mobilní (MF).

Kapalinovou chromatografii lze klasifikovat dle polaritvy použitých fází na chromatografii s normálními fázemi, kdy je mobilní fáze nepolární (např. hexan) a stacionární fáze polární a na chromatografii s obrácenými fázemi (RP-HPLC), kdy se využívá polární mobilní fáze (tetrahydrofuran, methanol nebo acetonitril s vodou) a nepolární stacionární fáze, nejčastěji oktadecylsilikagel.

### 1.6.1 Kolony a stacionární fáze

Chromatografické kolony jsou rovné trubice s hladkým vnitřním povrchem, které jsou vyrobeny z odolného materiálu a jsou rovnoměrně naplněny pórovitým materiálem s částicemi o určitém průměru. Jsou namáhány fyzikálně (vysokými tlaky) i chemicky

(působením organických rozpouštědel). Materiál pro konstrukci kolon bývá z antikorozi oceli, speciálně tvrzeného borosilikátového skla, nebo z vysoce inertních plastů. Délka kolon se pohybuje v rozmezí 5 až 30 cm a vnitřní průměr 2 až 4 mm [26-28].

Stacionární fáze [29, 30] představuje nepohyblivou část kolony, jíž protéká mobilní fáze se vzorkem. Výběr stacionární fáze je velice důležitý pro celkový výsledek separace. Náplně jsou klasifikovány dle typu na monolitický, porézní a povrchově porézní. Jako nosič se nejčastěji používá silikagel, dále lze využít oxid křemičitý, oxid hlinitý, oxid zirkoničitý, či organické polymery (polyethylenglykolmetakrylát, styren-divinylbenzen), které vykazují vyšší stabilitu vůči bazickým mobilním fázím. Na nosič jsou chemicky navázány různé skupiny, kterými je ovlivněna polarita stacionární fáze. Vysoce polární stacionární fáze se připravují modifikací amino- nebo diol- skupinami, středně polární nitro- či nitril skupinami. Nepolární stacionární fáze obsahují ve své struktuře vázané nepolární alkylové řetězce (oktyl-oktadecyl-). Obecně platí, že čím menší částice náplně jsou, tím je separace účinnější a rychlejší. Moderní sorbenty tvoří plně pórovité částice o velikosti menší než 7  $\mu\text{m}$ .

### 1.6.2 Mobilní fáze

Mobilní, pohyblivá fáze [30] je v kapalinové chromatografii hlavním parametrem ovlivňujícím separaci předložené směsi. Z tohoto důvodu je na výběr vhodné mobilní fáze kladen velký důraz. Pro stopovou analýzu je základním parametrem čistota mobilní fáze, která je zaručena buď komerčně dostupnými rozpouštědly o čistotě pro HPLC, nebo je nutná její předběžná úprava (filtrace, destilace). Organická rozpouštědla používaná v systémech s normálními fázemi musí být prostá vody a pro jejich sušení se využívá např. molekulových sít. Dalším parametrem ovlivňující separaci je obsah rozpuštěného kyslíku. Kyslík totiž zvyšuje absorpci v UV oblasti (až k 230 nm), což vede ke snížené citlivosti použitého UV detektoru. Dále musí být mobilní fáze odplyněna, buď pomocí inertního plynu či vakua, nebo jednoduše v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze se skládá z jednoho či více rozpouštědel, avšak obecně platí, že čím jednodušší složení má, tím snadněji se s ní zachází. Při výběru vhodné mobilní fáze je nutné brát v úvahu následující faktory: rozpustnost daného vzorku v mobilní fázi, její polaritu, index lomu, viskozitu, bod varu, absorpci záření, čistotu a stabilitu, bezpečnost atd.

Posouzení polaritý rozpouštědel je dáno relativní polaritou. Nejnížší vykazují organická rozpouštědla jako hexan, pentan, toluen, dichlormethan, delší alkoholy, tetrahydrofuran, polárnější jsou aceton, dioxan, ethanol, methanol a nejvíce polární je voda.

Na základě složení mobilní fáze se během chromatografického procesu rozlišuje:

- Izokratická eluce, kdy v průběhu celého procesu je složení mobilní fáze konstantní. Nevýhodou je však rozmývání píky déle eluujících složek směsi.
- Gradientová eluce, při které dochází v průběhu procesu ke změnám složení, resp. změnám polaritý mobilní fáze. Díky tomu je eluce složek rychlejší a píky ve výsledném chromatogramu ostřejší.

Při detekci pomocí UV detektoru je nutné volit takové mobilní fáze, které vykazují nízkou absorpenci při sledovaných vlnových délkách. Na absorpci rozpouštědel mohou mít vliv i organické či anorganické nečistoty, které ji obecně posouvají k vyšším vlnovým délkám.

Používá-li se refraktometrický detektor, je nutné vybrat takovou mobilní fázi, aby vykazovala index lomu vzdálený indexu lomu vzorku. Tím je možno dosáhnout lepší citlivosti a nižších detekčních limitů.

Hodnota pH mobilní fáze má vliv na selektivitu a rozlišení zkoumaných vzorků. Samozřejmostí je odolnost mobilní fáze vůči tepelným a chemickým vlivům a její inertnost.

### **1.6.3 Čerpadla**

Na čerpadla jsou kladeny vysoké nároky, jelikož musí být konstruovány z materiálů odolných vůči korozi. Musí být schopny dávkovat mobilní fázi bez kolísání tlaku a vnitřní objem čerpadel má být co nejmenší [26-28].

### **1.6.4 Dávkovací zařízení**

Vzorek se dávkuje na kolonu nejčastěji pomocí šesticestného dávkovacího ventilu. Ten umožňuje kontinuální dávkování, aniž by došlo k přerušení toku mobilní fáze. Dávkovaný objem je dán vnitřním objemem smyčky. Tento typ dávkovače je dvupolohový, kde v poloze LOAD (poloha plnění) dochází k proplachu smyčky vzorkem, zatímco jinou cestou proudí ventilem mobilní fáze. V poloze INJECT (poloha dávkování) dochází k výplachu vzorku ze smyčky mobilní fází a vzorek je tak převeden na kolonu.

Automatické dávkovače, neboli autosamplery jsou vhodné pro sériové rutinní analýzy, protože dávkovač je řízen počítačem bez zásahu obsluhy [26-28].

### 1.6.5 Detektory ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii

Detektory slouží ke sledování koncentrace separovaných složek v eluátu, tj. poskytují signál úměrný koncentraci látek. Můžeme je rozdělit na selektivní detektory, kde je signál úměrný pouze koncentraci analyzované látky a univerzální detektory, které poskytují signál úměrný určité vlastnosti eluátu. Hlavním požadavkem je, aby detektor poskytl okamžitou a lineární koncentrační odezvu v co nejširším rozmezí koncentrací stanovované látky. Dalšími nároky jsou stálost odezvy při změně teploty, dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou, vysoká citlivost a možnost využití gradientové eluce.

#### ➤ Spektrofotometrické detektory

Tento typ detektoru se řadí k citlivějším. Detekce barevných vzorků je založená na absorpci záření vlnové délky použité k detekci. Hodí se velmi dobře pro gradientovou eluci. Velkou výhodou spektrofotometrických detektorů je možnost výběru z řady běžných rozpouštědel, které obecně nevykazují vysokou absorpci.

Široce využívaná je detekce zvaná DAD (Diode Array Detector), kde lze detekovat látku současně při řadě různých vlnových délek, a měřit spektrum látek v jakémkoliv okamžiku eluce.

#### ➤ Fluorimetrický detektor

Tato forma detekce se vyznačuje vysokou citlivostí a selektivitou, která je charakteristická fluorescenčním jevem. Látka je detekována v průtokové cele. Část záření se využije na excitaci elektronů v molekule vzorku, část záření je emitováno ve formě fluorescence o nižší energii a vyšší vlnové délce. Fotoelektrický násobič je umístěn kolmo na směr průchodu záření, aby bylo zajištěno dokonalé oddělení emisního a excitačního záření.

#### ➤ Refraktometrický detektor

Tento druh detektoru pracuje na principu měření indexu lomu. Je velmi důležité, aby rozdíl indexu lomu stanovované látky a rozpouštědla byl co největší. Protože pracuje na kompenzačním principu, nelze použít gradientová eluce. Patří mezi univerzální detektory, ale má o dva až tři řády menší citlivost než spektrofotometrický detektor. Velkou nevýhodou

je však závislost teploty na indexu lomu. Z tohoto důvodu jsou měřící cely opatřeny termostatem.

➤ Vodivostní detektor

Vodivostní detektor měří elektrickou vodivost eluátu vytékajícího z kolony mezi dvěma izolovanými elektrodami v průtokové cele. Je vhodný pro měření iontů, které zprostředkovávají vedení proudu v roztoku. Aby bylo zabráněno polarizaci, je vkládáno na elektrody střídavé napětí.

➤ Elektrochemický detektor

Elektrochemická detekce spočívá v měření proudu, který je vyvolán oxidačně-redukčním dějem látky v měrné cele. Cely jsou válcové, nebo kapilární. Nejčastěji se používá tříelektrodový systém složený z měrné elektrody, pracovní a srovnávací elektrody. Měrné elektrody jsou nejčastěji zhotoveny ze skelného uhlíku, grafitové pasty, platiny, niklu, nebo dokonce i potaženy amalgámy rtuti. Hlavní výhodou je nízká pořizovací cena, citlivost a selektivita. Zásadní nevýhodou je však zanášení povrchu tuhých elektrod (mechanické očišťování) a také vysoké nároky na čistotu mobilní fáze [26-28].

## 1.7 Extrakce

Extrakce [26, 28, 31] je separační metoda založena na přechodu složek ze směsi v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze. Metoda je podmíněna selektivní rozpustností látek v rozpouštědle. Tato selektivita působení rozpouštědla na látku je závislá na povaze sil, které při rozpouštění mezi molekulami vznikají a zanikají. Tyto síly mohou být například disperzní interakce, interakce dipól-dipól, indukční interakce a tvorba vodíkových můstků. Extrakce dělíme z hlediska typů extrakčních soustav podle skupenství obou fází na extrakci pevná látka-kapalina a extrakci kapalina-kapalina.

Typ extrakce kapalina-kapalina je popsán termodynamickou distribuční konstantou  $K_D$ , která je formulována Nernstovým distribučním zákonem. Pokud vyjádříme rozdělení fází pomocí rovnovážných koncentrací dostaneme koncentrační distribuční konstantu  $K_D'$ .

$$K_D' = \frac{[X]_2}{[X]_1}$$

Toto ideální vyjádření slouží pouze k popisu obecnému. Ve skutečnosti většina extrakčních systémů vykazuje odchylky od ideality. Jednou z odchylek je právě chemická reakce

extrahované složky v obou fázích nastávající spontánně, nebo vyvolané uměle. K reálnému popisu slouží rozdělovací poměr  $q$ :

$$q = \frac{c_2}{c_1}$$

kde  $c$  jsou celkové analytické koncentrace.

### 1.7.1 Extrakce z pevné látky do kapaliny

Tento druh extrakce se vyznačuje přechodem látek obsažených v tuhé fázi do fáze kapalné. Tedy z pevné látky do rozpouštědla. Nejznámějším příkladem je příprava kávy nebo čaje, kdy jsou ve styku lístky čaje (pevná fáze) a horká voda (kapalná fáze). Další využití lze nalézt při získávání extraktu vanilky, pomerančů, citrónů, esencí z květin pomocí alkoholu.

Extrakce tuhých látek je pomalejší oproti extrakci kapalina-kapalina, jelikož difúze extrahované látky tuhou fází je pomalá. Pro extrakci látky z pevného vzorku do vhodného rozpouštědla se v laboratoři často používá kontinuální Soxhletův extraktor. Soxhletův extraktor se skládá z destilační baňky, extraktoru a zpětného chladiče. Pod celým tímto extraktorem je umístěno topné hnízdo. Tuhá fáze je umístěna v patroně ze speciálního papíru. Při zahřívání destilační baňky dochází ke stoupání par rozpouštědla postranní trubicí do horní části extraktoru, kde vlivem ochlazení zpětným chladičem kondenzují. Tento typ extrakce je široce využíván, navíc nevyžaduje složitou instrumentaci. Používá se především k izolaci z přírodních materiálů, nebo technických produktů. Nevýhodou je však zmíněná časová zdlouhavost.

Časová náročnost je velice znatelná na procesu zvaný macerace, během kterého je pevná fáze máčena a ponechána v kapalně fázi po dobu několika hodin až dní pro získání výluhu. Tato metoda je vhodná pro získávání termolabilních látek. Kromě značné časové náročnosti je zde nevýhoda nízkých výtěžků.

Dalším metodou je perkolace, kdy je nasycené rozpouštědlo neustále nahrazováno čerstvým rozpouštědlem. Což má za následek větší účinnost extrakce než u procesu macerace, kdy kapalná fáze není obnovována.

Extrakce s použitím refluxu je metodou, ze které vychází kontinuální extrakce Soxhletovým extraktorem. Vyžaduje méně rozpouštědla než macerace a perkolace, ale nemůže být použita pro extrakci termolabilních látek, neboť dochází k zahřívání kapalně fáze obsahující tuhou fází, ze které jsou extrahovány látky [32, 33].

## 1.7.2 Extrakce kapaliny kapalinou

Podmínkou této extrakce je použití dvou prakticky nemísitelných kapalin. Nejběžnější kombinací dvou zvolených fází je voda a organické rozpouštědlo, proto zde také využíváme termínů organická fáze a vodná fáze. Přechod částice přes fázové rozhraní popisuje Gibbsův zákon fází:

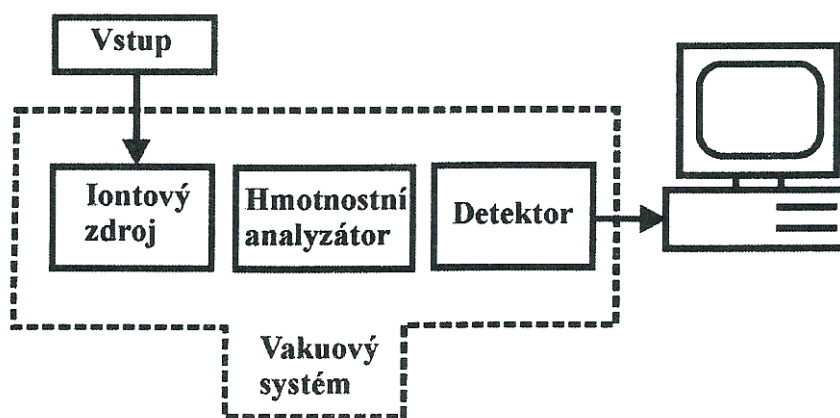
$$v + f = s + 2$$

, kde  $v$  je počet stupňů volnosti,  $f$  je celkový počet fází soustavy a  $s$  je počet složek. Extrakční systémy mohou být klasifikovány podle pracovní techniky na jednostupňové extrakce, nebo vícenásobné diskontinuální extrakce [26, 28, 31].

## 1.8 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie [26, 28, 35, 36] je separační metoda sloužící k určování hmotnosti atomů a molekul, z kterých pak stanovíme a identifikujeme chemickou látku. Využívá se pro zjišťování struktury neznámé látky.

Principem je převedení látky pomocí iontového zdroje na ionty. Vzniklé ionty jsou rozděleny hmotnostním analyzátozem dle poměru hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ). Usměrněný proud iontů proudí do detektoru, který udává signál úměrný počtu dopadajících iontů. Tento signál je následně veden do počítače, kde pomocí vhodného programu jsou zpracována naměřená data ve formě hmotnostního spektra. Výstupní spektrum je udáváno v závislosti intenzity iontů na poměru  $m/z$ .



Obrázek 6 Schéma hmotnostního spektrometru [28]

### 1.8.1 Iontový zdroj

Iontový zdroj je důležitou částí hmotnostního spektrometru. Slouží k převedení neutrálních molekul na ionty. Provádí se buď tzv. tvrdá ionizace, nebo měkká ionizace. Vzniklé ionty jsou urychleny elektrickým polem o vysoké intenzitě do hmotnostního analyzátoru.

Ionizace elektrosprejem je široce využívaná technika především ve spojitosti s HPLC/MS. Jedná se o měkkou ionizační techniku, která je vhodná pro látky středně polární až iontové. Hodí se pro stanovování peptidů, proteinů a dalších biochemických látek.

Chemická ionizace za atmosférického tlaku je vhodná především pro látky nepolární a středně polární povahy. Látky jsou ionizovány elektrodou, na kterou je vloženo vysoké napětí. Nejprve jsou ionizovány molekuly mobilní fáze, které předávají energii sledovanému analytu. K zamezení vzniku nežádoucích klastrů do analyzátoru slouží sušící plyn.

U obou zmíněných ionizací je pracováno za atmosférického tlaku.

### 1.8.2 Hmotnostní analyzátory

#### ➤ Kvadrupólový analyzátor

Tento typ analyzátoru se využívá často ve spojení s HPLC. Je tvořen čtyřmi kruhovými tyčemi, na které je současně vloženo střídavé a stejnosměrné napětí (na protilehlé tyče stejná polarita). Ionty po vniknutí do prostoru mezi tyče začnou oscilovat. Změnou velikosti stejnosměrného napětí a frekvence střídavého proudu se mění silové účinky pole. Touto změnou je způsobeno, že kvadrupólem projdou pouze ionty o určitém  $m/z$ .

Výhodou jsou rychlé změny hodnot napětí vkládané na tyče. Nevýhodou je náročnost na konstrukci detektoru.

#### ➤ Iontová past

Iontová past je obdoba kvadrupólového analyzátoru, kde se systém skládá ze tří elektrod. Dvě kruhové elektrody (vstupní a výstupní) jsou uzemněny a na třetí elektrodu je přiváděno vysokofrekvenční napětí. Princip spočívá v regulaci amplitudy střídavého napětí a vypuzování ionizovaných fragmentů na základě  $m/z$ , které jsou vedeny k detektoru.

#### ➤ Průletový analyzátor TOF

Analyzátor je tvořen evakuovanou trubicí, do které vstupují urychlené ionty, které získaly určitou hodnotu kinetické energie a směřují směrem k detektoru. Jedná se o nejjednodušší typ

analyzátoru. Doba průletu závisí hmotnosti jednotlivých fragmentů. Čím menší je hmotnost iontů, tím rychleji se pohybuje a má kratší dobu letu. Celý tento děj je pulzován. Výhodou tohoto zařízení je široký hmotnostní dosah, díky kterému lze analyzovat přes 10 000 atomů.

### **1.8.3 Detektory**

Detektory pro hmotnostní spektrometrii jsou dvojího druhu. První je pro přímé měření, které detekují proud přímým dopadem iontu. Druhým typem jsou detektory násobičové, které násobí efekt dopadených elektronů.

- Elektronásobičové detektory
- Fotonásobičové detektory

## **1.9 Stanovení biologické aktivních látek v lichořeřišnici**

### **1.9.1 Zpracování rostliny**

Čerstvá rostlina se zpracovává oddělením listů, květů a popř. semen od stonku. Květy a listy jsou mrazeny v kapalném dusíku a lyofilizovány (-80 °C). Pokud je potřeba získat čerstvou šťávu, využívá se ždímače šťáv. Rostlinný materiál lze také ihned zmrazit kapalným dusíkem, kdy dojde k naprostému ztuhnutí a následně je pak materiál rozmixován v mixéru [1, 4, 6, 9, 37].

Jednotlivé části rostliny je možné dále extrahovat vodně ethanolickým roztokem nebo acetonem. Macerace se zpravidla provádí delší dobu (7 dnů) a používá se koncentrovanější rozpouštědlo (90% ethanol). V předchozích studiích nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi účinky extraktů ze sušených a lyofilizovaných rostlin, avšak bylo dokázáno, že vodný extrakt působil statisticky významně slabším způsobem než hydroethanolový extrakt. Extrakty se zpravidla filtrují přes filtrační papír, nebo jsou centrifugovány. Zbytkové stopy acetonu je možno odstranit v odparce [1, 4, 6, 9, 38].

### **1.9.2 Spektrofotometrické metody**

S využitím ABTS metody bylo zjištěno, že listy lichořeřišnice vykazují vyšší antioxidační kapacitu než borůvky, které jsou jedním z nejbohatších uváděných antioxidantů a dokonce i vyšší než listy ostružin [9]. Metodou ABTS bylo navíc zjištěno, že fenoly se dvěma

hydroxylovými skupinami navázanými na aromatický kruh v orto poloze silněji zhášejí radikál ABTS<sup>•+</sup> než sloučeniny s hydroxylovými skupinami substituovanými na meta pozici [18].

Aktivita zachycování radikálů DPPH prokázala, že květy lichořeřišnice mají blízké hodnoty hodnotám pro brusinky a jahody [9].

Vzhledem k rozmanitosti druhů lichořeřišnice byl jeden z výzkumů založen na stanovení celkového obsahu fenolických látek v několika květech (červené, oranžové a žluté). Bylo zjištěno, že největší obsah fenolických látek byl v červených květech. Nejmenší obsah fenolických látek byl stanoven v žlutém květu, což bylo pravděpodobně zapříčiněno nízkým obsahem antokyaninů [9].

Stanovení obsahu flavanoidů je v principu stejné jako stanovení celkového obsahu fenolických látek, které se stanovují pomocí spektrofotometrických metod. Stanovované látky se rozpouštějí v ethanolu s přidávkem vodného roztoku chloridu hlinitého, octanu draselného a destilované vody. Jako standardní látka se používá quercetin. Nejvyšší obsah flavanoidů v lichořeřišnici byl stanoven v hydroethanolovém extraktu (26,0 %) a nejnižší v lisované šťávě (11,2 %) [4].

### 1.9.3 HPLC analýza

Pro HPLC analýzu glukosinolátů jsou nejčastěji využívány oktadecylsilikagelové stacionární fáze [40, 41], převážně s využitím před kolonky pro ochranu vlastní kolony [3]. Jako mobilní fáze se využívají směsi vody a acetonitrilu, nejčastěji s gradientovou elucí [41]. Detekce byla ve všech případech provedena spektrofotometrickým detektorem (s nastavenou vlnovou délkou v rozmezí 200-300 nm) [40].

V letech 2003-2005 bylo pro studie obsahu glukosinolátů přítomných v lichořeřišnici použito více než 200 rostlin. Obsah glukosinolátů a aktivita enzymu myrosinázy se výrazně lišily, nejspíše z důvodu rozdílné proměnlivosti počasí a počtu srážek v souvislosti s délkou vegetačního období v těchto studovaných letech. Výsledky jsou pro jednotlivé roky: 48, 60 a 78  $\mu\text{mol/g}$  sušené váhy [40].

Botanický institut zkoumal akumulaci glukosinolátů v kořenech lichořeřišnice a papáji. Byl zde porovnán rozdíl, kde byla část vzorků ošetřena kyselinou salicylovou a jasmonovou a část vzorků nebyla ošetřena vůbec. U neošetřených kořenů byly nalezeny pouze stopy

glukosinolátů. Naproti tomu u ošetřených kořenů byla akumulace glukosinolátu v kořeni znatelně vyšší [37].

Společně se stanovením glukosinolátu v lichořeřišnice se stanovuje obsah i dalších účinných látek, jako např. flavanoidů. Použitím techniky HPLC bylo zjištěno, že jsou v rostlině přítomny vysoké hladiny glykosidů quercetinu a kaempferolu. Autoři poukazují na to, že hypotenzní účinky, které rostlina má, jsou spojeny s vysokými hladinami isoquercitrinu v této rostlině [39]. Některé fenolické látky je možno izolovat jako sloučeniny esterifikované různými typy kyselin [42].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Použité chemikálie

V rámci této bakalářské práce byly použity tyto chemické látky:

- ABTS diamonná sůl (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) (Sigma Aldrich),
- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) (Sigma Aldrich, USA),
- 2M Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma Aldrich, USA),
- DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl) hydrazyl) (Sigma Aldrich, USA),
- kyselina mravenčí (Sigma Aldrich, USA),
- methanol (Sigma Aldrich, USA),
- deionizovaná voda (Merck, Německo),
- kyselina gallová (Sigma Aldrich, USA),
- peroxodisíran draselný (Lach-Ner, Neratovice).

### 2.2 Použité přístroje

V rámci práce byly k měření antioxidační kapacity a stanovení celkového množství fenolických látek používány tyto přístroje:

- UV/VIS spektrofotometr Shimadzu UV-2450 (Kyoto, Japonsko),
- předvážky (Kern, Německo),
- analytické váhy Sartorius (Ústí nad Labem),
- homogenizátor Ultra-Turrax T18 basic (IKA, Německo),
- centrifuga Universal 320 (Hettich, Německo),
- mikropipety Biohit-Proline (Biohit, Finsko).

## 2.3 Použité vzorky lichořeřišnice

Tabulka 1 Část rostliny použita k měření a její hmotnost

Číslo vzorku	Část rostliny	Hmotnost vzorku [g]	Datum sběru	Lokalita	Extrakce
1	květ	5,505	16.7. 2018	Svítkov - Pardubice	MeOH
2	list	5,018	16.7. 2018	Svítkov - Pardubice	MeOH
3	semeno	5,04	16.7. 2018	Svítkov - Pardubice	MeOH
4	stonek	4,43	16.7. 2018	Svítkov - Pardubice	MeOH
5	květ	5,376	16.7. 2018	Svítkov - Pardubice	MeOH + FA
6	list	5,011	16.7. 2018	Svítkov - Pardubice	MeOH + FA
7	semeno	5,06	16.7. 2018	Svítkov - Pardubice	MeOH + FA
8	stonek	4,86	16.7. 2018	Svítkov - Pardubice	MeOH + FA

FA = kyselina mravenčí, MeOH = methanol (70%)

## 2.4 Použité vzorky bylinných kapek

Tabulka 2 Názvy vzorků kapek a jejich výrobce

Číslo vzorku	Název	Výrobce
1	Lichořeřišnice větší, doplňěk stravy	NADĚJE
2	Bylinné kapky lichořeřišnice	GREŠÍK VALDEMAR
3	Lichořeřišnice větší, tinktura-kapky	TOPVET

## **2.5 Pracovní postupy**

Postupy na stanovení antioxidační aktivity byly převzaty z diplomové práce Terezy Šalomounové [34].

### **2.5.1 Metoda ABTS**

Tableta ABTS (10 mg) byla rozpuštěna v 5 ml destilované vody ( $c = 3,6 \text{ mmol/l}$ ), poté bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  ( $c = 0,064 \text{ mol/l}$ ). Roztok byl ponechán za nepřístupu světla při laboratorní teplotě 12 - 16 hodin. Ze zásobního roztoku ABTS bylo pipetováno 2,5 ml do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Ke 3 ml reakční směsi bylo přidáno 40  $\mu\text{l}$  vzorku a důkladně promícháno. Pro zjištění celkové oxidační kapacity byl měřen úbytek po 30 minutách. Úbytek absorbance byl vyjádřen v % a pomocí kalibrační křivky přepočítán na ekvivalentní množství Troloxu.

### **2.5.2 Metoda DPPH**

Do 25 ml odměrné baňky bylo naváženo 0,004 g DPPH a doplněno methanolem po rysku. Pracovní roztok byl dále methanolem naředěn v poměru 1:2. Ke 3 ml pracovního roztoku bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  vzorku a směs byla důkladně promíchána. Pro zjištění celkové oxidační kapacity byl měřen úbytek po 30 minutách. Úbytek absorbance byl pomocí kalibrační křivky přepočítán na ekvivalentní množství Troloxu.

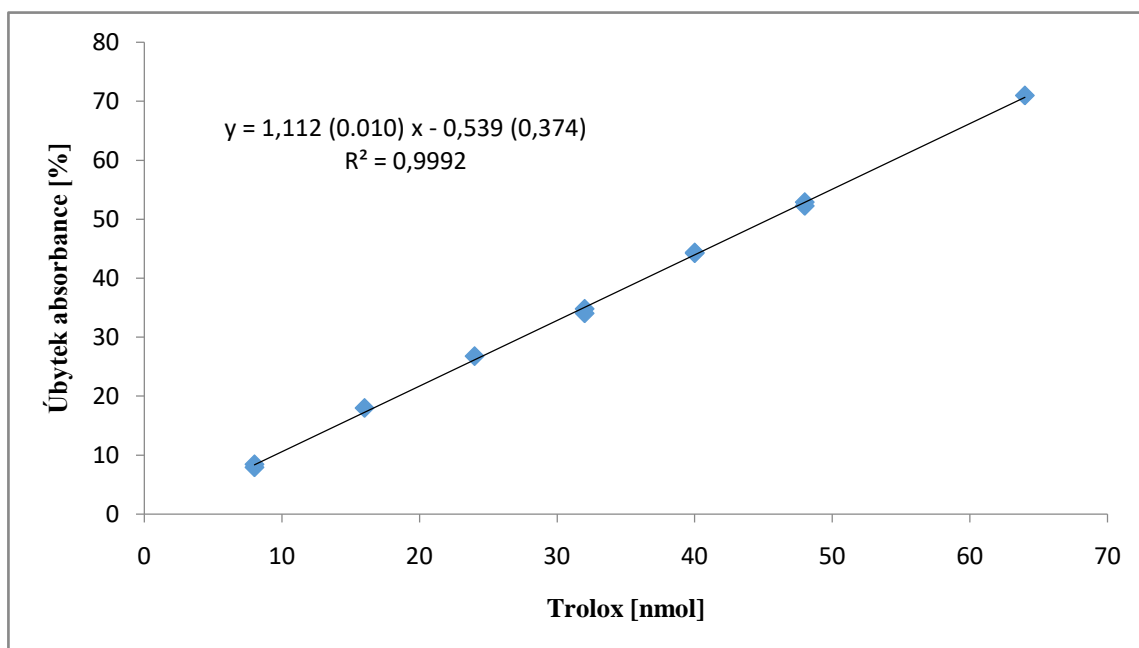
### **2.5.3 Stanovení množství fenolických látek**

Pracovní roztok pro stanovení celkového množství fenolických látek byl připraven naředěním 2 M Folin-Ciocalteuova činidla destilovanou vodou v poměru 1:20. Ke 2 ml činidla bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  vzorku. Směs byla promíchána a po 5 minutách byl přidán 1 ml 7,5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Nárůst absorbance byl po 30 minutách změřen při 750 nm a přepočítán pomocí kalibrační křivky na ekvivalentní množství kyseliny gallové.

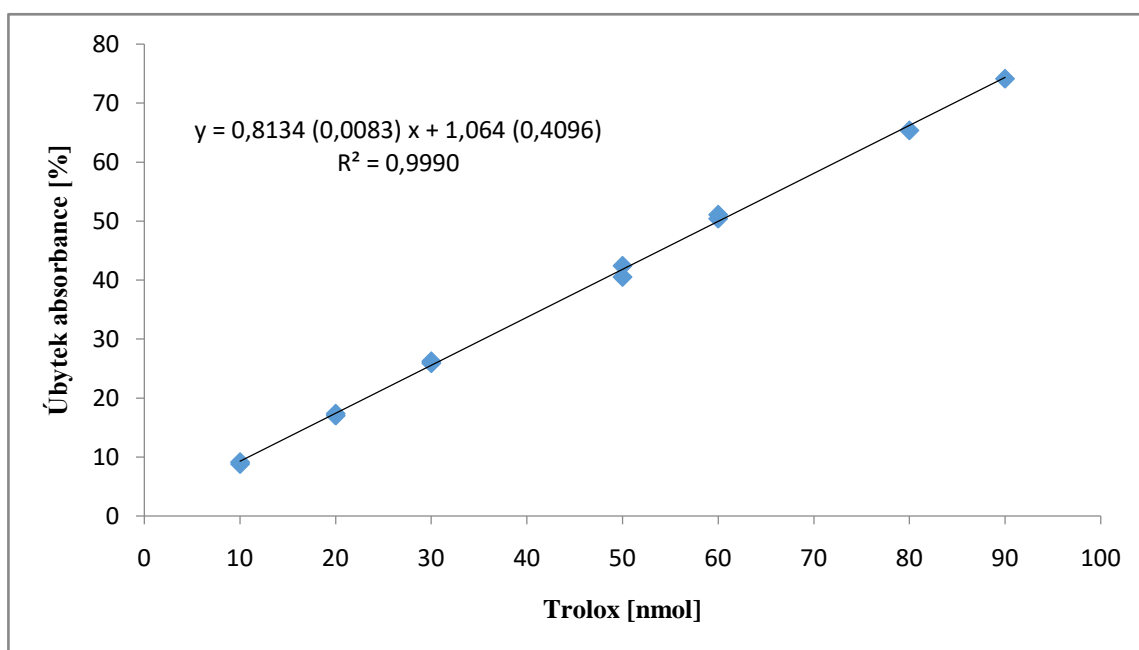
### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS a DPPH

Pro metodu ABTS a DPPH byly nejprve proměřeny kalibrační roztoky standardu Troloxu a sestrojena kalibrační závislost úbytku absorbance na ekvivalentním množství Troloxu (Obrázek 8 a 9).



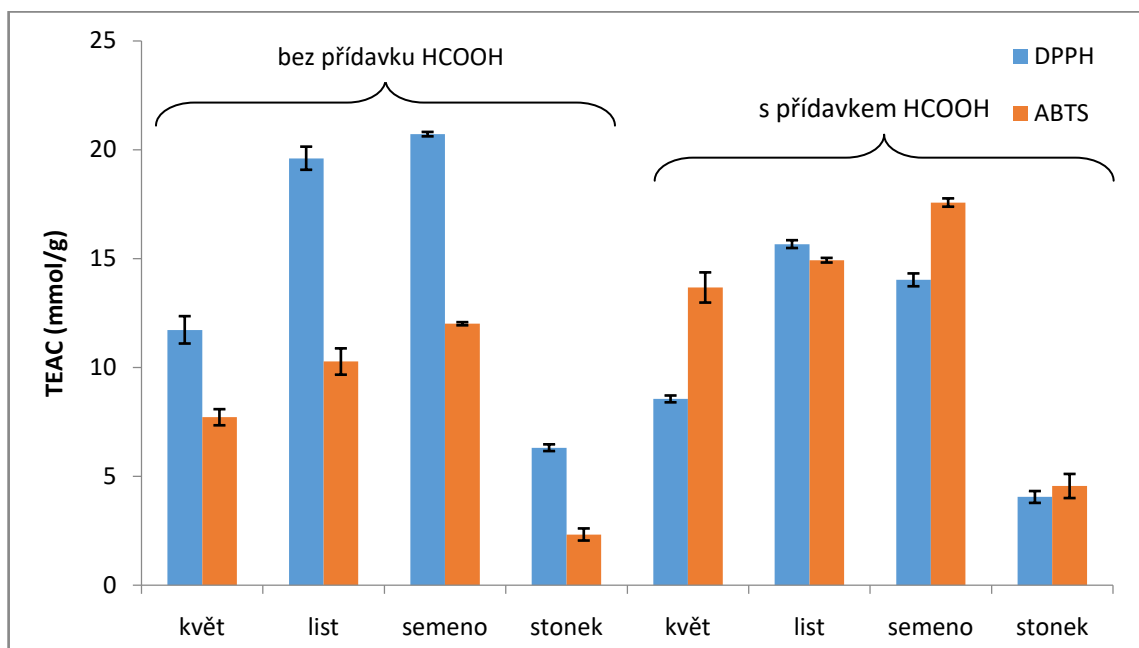
Obrázek 7 Kalibrační závislost pro metodu ABTS



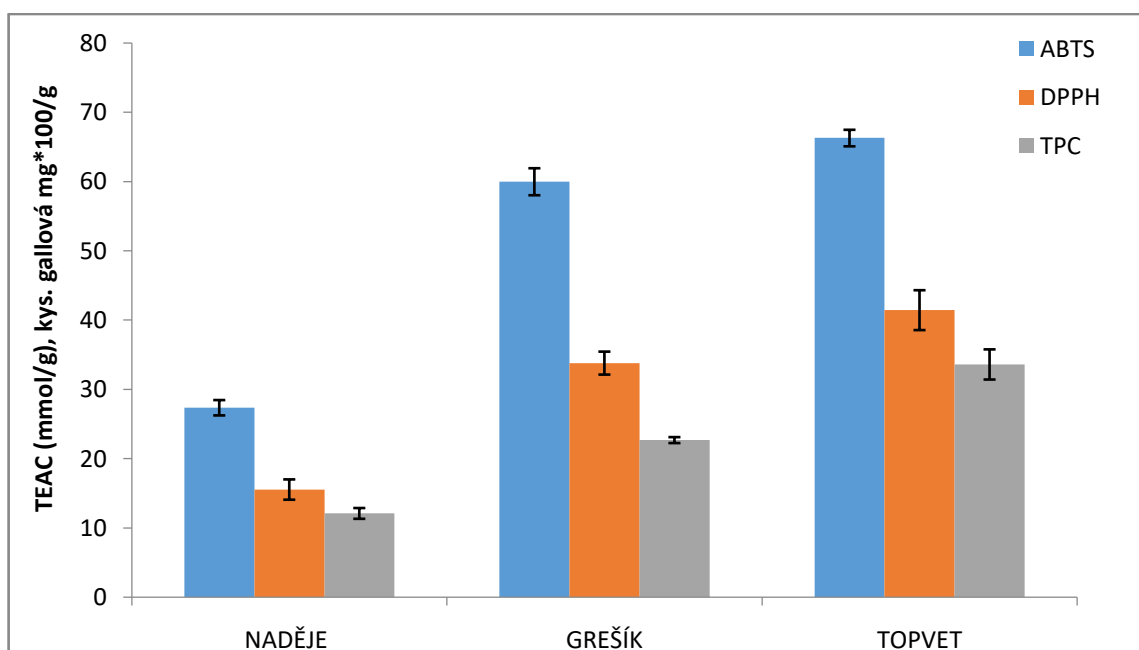
Obrázek 8 Kalibrační závislost pro metodu DPPH

Rovnice regrese přímky pro metodu ABTS a DPPH jsou uvedeny na obrázku 7 a obrázku 8. Vlivné body kalibrace byly odstraněny na základě grafických diagnostických testů pomocí programu QC Expert 2.9 (Trilobite, ČR).

Pomocí těchto kalibračních přímek byla vypočítána hodnota TEAC pro jednotlivé vzorky rostliny a vybraných kapek. Každý ze vzorků byl proměřen čtyřikrát. Byl také testován vliv přídavku kyseliny mravenčí do extrakčního činidla na účinnost extrakce antioxidantů.



Obrázek 9 Antioxidační kapacita extraktů z jednotlivých částí lichořeřišnice měřená metodami ABTS a DPPH.



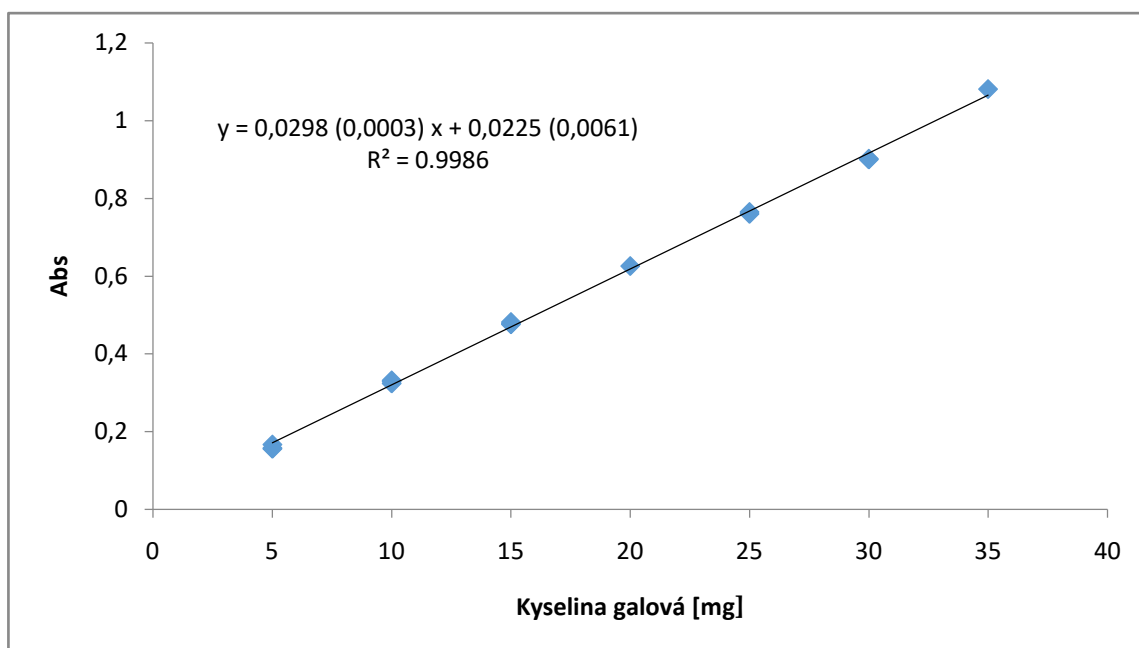
Obrázek 10 Antioxidační kapacita a celkový obsah fenolických látek (TPC) v kapkách.

Na obrázku 9 jsou uvedeny výsledky po proměření extraktů pomocí metod ABTS a DPPH. Jak je z obrázku patrné, vyšších hodnot antioxidační kapacity bylo dosaženo metodou DPPH, ale pouze v případě čistě metanolických extraktů. Při přidavku kyseliny se antioxidační vlastnosti extraktů vyrovnaly a v některém případě metodou ABTS byly dokonce pozorovány větší hodnoty. To může být vysvětleno jednak jiným mechanismem reakce antioxidantu s různými radikály (ABTS reaguje s jinými látkami než DPPH), ale také jinou skladbou látek s antioxidačními účinky v jednotlivých částech rostliny. Při přidavku kyseliny do extrakčního činidla dochází ke zvýšení účinnosti extrakce pouze pro určité typy látek, některé se naopak extrahují hůře a poté dochází k ovlivnění antioxidačních vlastností extraktů. Z obrázku je dále patrné, že nejmenší antioxidační vlastnosti poskytuje stonek rostliny, v květech, listech a semenech je množství antioxidantů mnohem více.

Na obrázku 10 jsou uvedeny výsledky z měření komerčně dostupných kapek lichořeřišnice. Jak je z obrázku patrné, nejvyšších hodnot antioxidační kapacity dosahují kapky od firmy Topvet, následuje Grešík a poslední jsou kapky Naděje. Tyto výsledky korespondují s množstvím rostliny použité pro přípravu extraktů. U firmy Topvet bylo k přípravě kapek použito více rostliny než u ostatních dvou sledovaných vzorků.

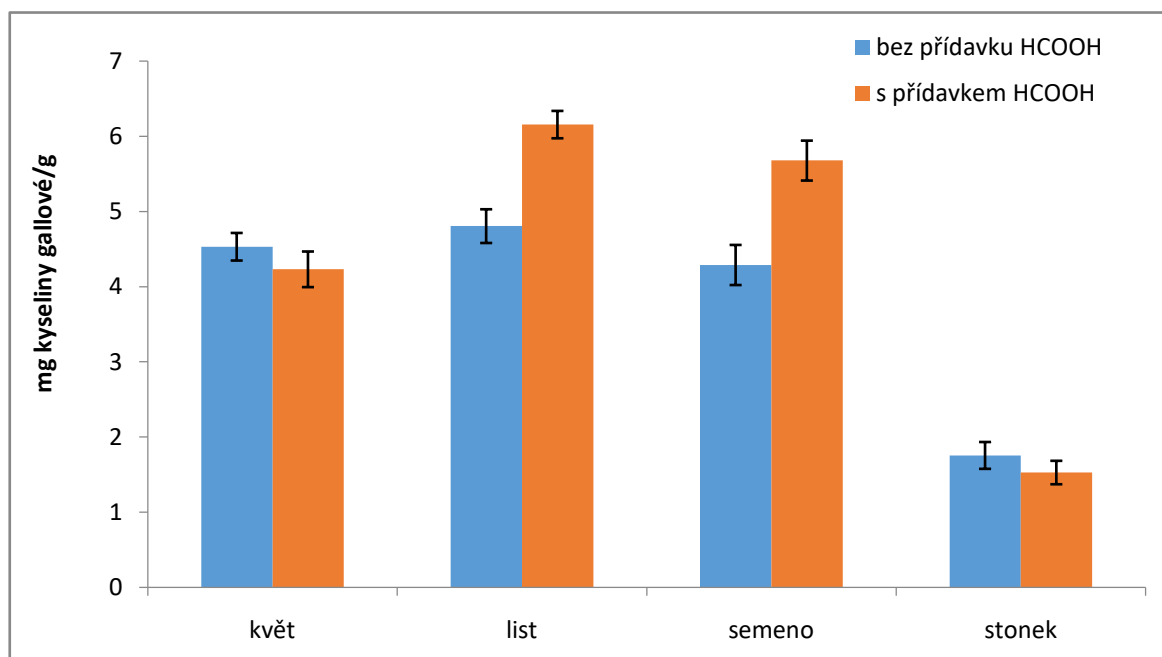
### **3.2 Stanovení celkového obsahu fenolických látek**

Celkový obsah fenolů v extraktu byl stanoven metodou Folin - Ciocalteu. Absorbance byla odečítána při 760 nm (po 30 minutách reakce při teplotě místnosti ve tmě). Každý ze vzorků byl proměřen čtyřikrát. Kyselina gallová byla použita jako standard pro konstrukci kalibrační křivky. Celkový obsah fenolů byl vyjádřen jako miligramy ekvivalentů kyseliny gallové na gram čerstvé hmotnosti extraktu.



Obrázek 11 Kalibrační řada při stanovení TPC

Z kalibrační křivky byla vytvořena rovnice regrese přímky, z které bylo vypočteno celkové množství fenolických látek v jednotlivých částech rostliny.



Obrázek 12 Stanovení celkového obsahu fenolických látek v lichořeřišnici

Výsledky měření jsou uvedeny na obrázku 13. Z tohoto obrázku je patrné, že stonek rostliny opět vykazuje nejmenší množství fenolických látek. Ostatní části rostliny vykazují podobné antioxidační vlastnosti. Vlivem přídavku kyseliny mravenčí do extrakčního činidla dochází

ke zvýšení množství fenolických látek u listu a u semene rostliny. U květů a stonku byl vliv přídatku zanedbatelný a v rámci chyby měření.

V případě komerčně dodávaných kapek bylo množství fenolických látek velmi malé. Na obrázku 10 je pro přehlednost uvedený obsah násoben 100. Výrazně menší hodnoty oproti extraktům námi připraveným je zřejmě způsoben menší koncentrací rostliny v kapkách. Opět byly kapky od firmy Topvet vyhodnoceny jako nejlepší, protože byl pozorován nejvyšší obsah fenolických látek. Následují kapky Grešík a poté Naděje.

## ZÁVĚR

Lichořeřišnice je oranžově žlutě kvetoucí rostlina, která je pěstována nejen jako okrasná bylina, ale především pro své léčivé účinky. Díky antioxidačním a léčivým vlastnostem má velmi široké využití v medicíně. Tyto léčivé vlastnosti má díky obsahu glukotropaeolinu, karotenoidů, antokyaniny, flavonoidů a dalším fenolickým látkám. Látky tohoto typu nazýváme antioxidanty. Antioxidanty v principu zabráňují oxidativnímu poškození volnými radikály. Antioxidační vlastnosti rostliny lze vyhodnotit na základě několika spektrofotometrických metod, jako jsou ABTS nebo DPPH.

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo zjistit antioxidační aktivitu a celkový obsah fenolických látek v jednotlivých částech lichořeřišnice a porovnat výsledky s komerčně dodávanými kapkami. Nejvyšší obsah fenolických látek a také nejvyšší antioxidační kapacita byla pozorována u extraktů z listů a semene lichořeřišnice. Dále byly pozorovány vysoké hodnoty u květů. Nejméně fenolických látek, a tudíž nejmenší antioxidační kapacitu měl extrakt ze stonku. Výsledky do jisté míry ovlivňuje i množství vody v jednotlivých částech rostliny, protože se navažovala rostlina v čerstvém stavu. V rámci práce byl pozorován velký vliv přídavku kyseliny na extrakci fenolických látek a jiných antioxidantů. V případě komerčně dostupných kapek lichořeřišnice nejlépe ve všech metodách obstály kapky značky Topvet, což je způsobeno vyšším množstvím rostliny použitým pro přípravu kapek.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Garzón, G. A., Manns, D. C., Riedl, K., Schwartz, S. J., Zakour, O.P. Identification of Phenolic Compounds in Petals of Nasturtium Flowers (*Tropaeolum majus*) by High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry and Determination of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2015**, 63, 1803–1811. DOI: 10.1021/jf503366c.
- [2] Korbelář, J., Endris, Z., Krejča, J. Naše rostliny v lékařství. Praha: Avicenum zdravotnické nakladatelství, 1974, 493 s. ISBN: 08-006-74.
- [3] Junior, A. G., Prando, T. B. L., Gebara, K. S., Gasparotto, F. M., Lívero, F. A. R., Lima, D. P., Gomesand, R. S., Lourenço, E. L. B. Protective Cardiorenal Effects Of *Tropaeolum majus* L. In Rats With Renovascular Hypertension. *Pharmaci. Journal of Young Pharmacists*. **2017**, 251–257. DOI: 10.5530/jyp.2017.9.49.
- [4] Bazyłko, A., Parzonko, A., Jeż, W., Osińska, E., Kiss, A. K. Inhibition of ROS production, photoprotection, and total phenolic, flavonoids and ascorbic acid content of fresh herb juice and extracts from the leaves and flowers of *Tropaeolum majus*. **2014** *Industrial Crops and Products*. 55,19–24.
- [5] Botany.cz - Zajímavosti ze světa rostlin [online]. Copyright © [cit. 01.04.2019]. Dostupné z: <https://botany.cz/foto/trop1.jpg>
- [6] Platz, S., Kühn, C., Schiess, S., Schreiner, M., Mewis, I., Kemper, M., Pfeiffer, A., Rohn, S. Determination of benzyl isothiocyanate metabolites in human plasma and urine by LC-ESI-MS/MS after ingestion of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2013**, 405, 7427–7436. DOI 10.1007/s00216-013-7176-7.
- [7] Kühn, C., Kupke, F., Baldermann, S., Klopsch, R., Lamy, E., Hornemann, S., Pfeiffer, A. F. H., Schreiner, M., Hanschen, F. S., Rohn, S. Diverse Excretion Pathways of Benzyl Glucosinolate in Human after Consumption of Nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) — A Pilot Study. *Molecular Nutrition & Research*. **2018**, 62, 800588. DOI: 10.1002/mnfr.201800588.

- [8] Andre'asson, E., Jørgensen, L. B., Höglund, A.-S., Rask, L., Meijer, J. Different Myrosinase and Idioblast Distribution in Arabidopsis and Brassicanapus. *Plant physiology*. **2001**, 127, 1750-1763. DOI: 10.1104/pp.127.4.1750.
- [9] Garzón, G.A., Wrolstad, R.E. Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*). *Food Chemistry*. **2009**, 114, 44–49.
- [10] Melo, A. C., Costa, S. C. A., Castro, A. F., Souza, A. N. V., Sato, S. W., Lívero, F. A. R., Lourenc, E. L. B., Baretta, I. P., Lovato, E. C. W. Hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* promotes anxiolytic effects on rats. *Pharmacognosy. Brazilian Journal of Pharmacognosy*. **2018**, 589–593. DOI: 10.1016/j.bjp.2018.06.006.
- [11] Kim, G.-C., Kim, J.-S., Kim, G.-M., Choi, S.-Y. Anti-adipogenic effects of *Tropaeolum majus* (nasturtium) ethanol extract on 3T3-L1 cells. *Food&Nutrition Research*. **2017**, vol. 61(1339555). DOI: 10.1080/16546628.2017.1339555.
- [12] Kaiser, S. J., Mutters, N. T., Blessing, B., Günther, F. Natural isothiocyanates express antimicrobial activity against developing and mature biofilms of *Pseudomonasaeruginosa*. *Fitoterapia*. **2017**, 57–63. DOI: 10.1016/j.fitote.2017.04.006.
- [13] ThiThuTran, H., Márton, M. R., Herz, C., Maul, R., Baldermann, S., Schreiner, M., Lamy, E. Nasturtium (Indian cress, *Tropaeolum majus nanum*) dually blocks the COX and LOX pathway in primary human immune cells. *Plant Science. Phytomedicine*. **2016**, 611–620. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.02.025.
- [14] Leopoldini, M., Marino, T., Toscano, N. R. M. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism. *The Journal of Physical Chemistry A*. **2004**, 108, 4916–4922. DOI: 10.1021/jp037247d.
- [15] Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., Pegg, R. B. Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*. **2012**, 11, 148-173. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00173.x.
- [16] Speisky, H., López-Alarcón, C., Gómez, M., Fuentes, J., Sandoval-Acuña, C. First Web-Based Database on Total Phenolics and Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Fruits Produced and Consumed with in the South Andes Region of South

- America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, 60, 8851-8859. DOI: 10.1021/jf205167k.
- [17] Xia, L., Xu, Ch., Huang, K., Lu, J., Zhang, Y. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant and antiproliferative activities of 31 grape cultivars with different genotypes. *Journal of Food Biochemistry*. **2018**, 43, 6, e12626. DOI: 10.1111/jfbc.12626.
- [18] Biskup, I., Golonka, I., Gamian, A., Sroka, Z. Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. *Postepy Higieny Medycyny Doświadczalnej Journal*. **2013**; 67: 958–963. DOI: 10.5604/17322693.1066062.
- [19] Šulc, M., Lachman, J., Hamouz, K., Orsák, M., Dvořák, P., Horáčková, V. Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické Listy*. **2007**, 101, 584–591.
- [20] Vitaly Roginsky, Eduardo A. Lissi. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*. **2005**, 92, 235–254.
- [21] Le, B., Golokhvast, K. S., Yang, S. H., Sun, S. Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Polysaccharides from *Ulva pertusa* and Evaluation of Their Antioxidant Activity. *Antioxidants*. **2019**, 8, 129. DOI: 10.3390/antiox8050129.
- [22] Mendelova Univerzita v Brně. University information system MENDLU [online]. Copyright © [cit. 23.06.2019]. Dostupné z: [https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz\\_cast.pl?cast=52974](https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52974)
- [23] Paulová, H., Bochořáková, H., Táborská, E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vivo. *Chemické Listy*. **2004**, 98, 174–179.
- [24] Alzate-Arbeláeza, A. F., Dortab, E., López-Alarcónb, C., Cortésc, F. B., Rojanao, B. A. Immobilization of Andeanberry (*Vaccinium meridionale*) polyphenols on nanocellulose isolated from banana residues: A natural food additive with antioxidant properties. *Food Chemistry*. **2019**, 294, 503–517. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.05.085.
- [25] Li, J., Qin, Y., Yu, X., Xiong, Z., Zheng, L., Sun, Y., Shen, J., Guo, N., Tao, L., Deng, Z., Liu, X. In vitro simulated digestion and in vivo metabolism of chlorogenic acid

- dimer from *Gynuraprocumbens* (Lour.) Merr.: Enhanced antioxidant activity and different metabolites of blood and urine. *Journal of Food Biochemistry*. **2019**, 43, e12654. DOI: 10.1111/jfbc.12654.
- [26] Churáček, J., Jandera, P., Krupčík, J., Polonský, J., Popl, M., Vláčil, F. *Analytická Separace Látek*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1990, 384 s. ISBN: 80-03-00569-8.
- [27] Churáček, J., Jandera, P. *Separace Látek, Kapalinová Vysokoučinná Kolonová Chromatografie*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1986, 140 s.
- [28] Štulík, K., Ševčík, J., Pacáková, V., Jelínek, I., Coufal, P. *Analytické Separční Metody*. Praha: Nakladatelství Karolinum, **2004**, 264 s. ISBN: 80-246-0852-9.
- [29] Kazakevich, Y., Lobrutto, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. [online]. [cit. 23.06.2019]. New Jersey: Wiley-Vch. **2007**, 1061s. ISBN-13: 978-0-471-68162-5. Dostupné z: [http://quimica.udea.edu.co/~carlopez/cromatohplc/stationary\\_phases\\_hplc\\_2007.pdf](http://quimica.udea.edu.co/~carlopez/cromatohplc/stationary_phases_hplc_2007.pdf)
- [30] Günzler, H., Williams, A., *Handbook of Analytical Techniques*. [online]. [cit. 23.06.2019]. Weinheim: Wiley-Vch. **2001**, 1196s. ISBN: 3-527-30165-8 Dostupné z: <http://web.uni-plovdiv.bg/plamenpenchev/mag/books/anchem/Handbook%20of%20Analytical%20Techniques,%20%20Volume%20Set.pdf>
- [31] Pedagogická fakulta Masarykovy univerzity, katedra chemie. Laboratorní technika. [online]. [cit. 23.06.2019]. Dostupné z: <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pages/extrakce.html>
- [32] Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., Ye, W.-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*. **2018**, 13,20. DOI: 10.1186/s13020-018-0177-x.
- [33] Chemistry LibreTexts. Overview of extraction. [online]. [cit. 18.06.2019]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Book%3A\\_Organic\\_Chemistry\\_Lab\\_Techniques\\_\(Nichols\)/4%3A\\_Extraction/4.1%3A\\_Overview\\_of\\_Extracti](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_Lab_Techniques_(Nichols)/4%3A_Extraction/4.1%3A_Overview_of_Extracti)

[on?fbclid=IwAR15MbQwuoYIy0\\_mNFBNpMN-0I0zLw5P4z1VRgFStvqw0yhw0FvY74\\_7WZI](https://www.facebook.com/IwAR15MbQwuoYIy0_mNFBNpMN-0I0zLw5P4z1VRgFStvqw0yhw0FvY74_7WZI)

- [34] Šalomounová, T. Analýza významných biologicky aktivních látek v různých částech lichořeřišnice větší s využitím HPLC/MS/MS. Pardubice, **2019**. *Diplomová práce*. Univerzita Pardubice. Chemicko-technologická fakulta. Katedra analytické chemie.
- [35] Holčapek, M. Hmotnostní spektrometrie [online], Mass spectrometry group, Univerzita Pardubice Copyright © [cit. 27.05.2019]. Dostupné z:[http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol\\_spek/Mol\\_spek\\_prednaska6\\_MS.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf)
- [36] Holčapek, M., Jirásko, R., Lísa, M., Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules. *Journal of Chromatography A*. **2010**, 1217 3908–3921.
- [37] Müller, J. L., Bennett, R. N., García-Garrido, M., Piché, Y., Vierheilig, H. Reduced arbuscular mycorrhizal root colonization in *Tropaeolum majus* and *Carica papaya* after jasmonic acid application can not be attributed to increased glucosinolate levels. *Journal of Plant Physiology*. **2002**, 159, 517–5.
- [38] Junior, A. G., Boffo, M. A., Lourenc, E. L. B., Stefanello, M. E. A., Kassuya, C. A. L., Marques, M. C. A. Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **2009**, 122, 517–522.
- [39] Junior, A. G., Gasparotto, F. M., Lourenc, E. L. B., Crestani, S., Stefanello, M. E. A., Salvador, M. J., da Silva-Santos, J. E., Marques, M. C. A., Kassuya, C. A. L. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L. Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *Journal of Ethnopharmacology*. **2011**, 134, 363–372.
- [40] Chter, M.K., Schnug, E., Selmard, D. The Glucosinolate-Myrosinase System in *Nasturtium* (*Tropaeolum majus* L.): Variability of Biochemical Parameters and Screening for Clones Feasible for Pharmaceutical Utilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, 56, 11165–11170. DOI: 10.1021/jf802053n.
- [41] Cuong, D. M., Park, Ch. H., Bong, S. J., Kim, N. S., Kim, J. K., Park, S. U. Enhancement of Glucosinolate Production in Watercress (*Nasturtium officinale*) Hairy

Roots by Overexpressing Cabbage Transcription Factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2019**, 67, 4860–4867. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b00440.

- [42] Ferreres, F., Llorach, R., Gil-Izquierdo, A. Characterization of the interglycosidic linkag in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. **2004**, 39, 312–321. DOI: 10.1002/jms.586