

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

KOMPLEXNÍ CHARAKTERIZACE LÉČIVÝCH ROSTLIN A JEJICH
POTENCIÁL PŘI VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU JAKO
ZDROJE FUNKČNÍCH KOMPONENT

COMPLEX CHARACTERIZATION OF MEDICAL HERBS AND STUDY OF
THEIR UTILIZATION IN FOOD INDUSTRY AS A SOURCE OF FUNCTIONAL
COMPONENTS

Zkrácená verze PhD Thesis

BRNO 2018

Ing. Lenka Burdějová

Obor: Potravinářská chemie

Školitel: Ing. Martin Polovka Ph.D.

Školitel specialista: Ing. Eva Vítová Ph.D.

Oponenti:

Datum obhajoby:

KLÍČOVÁ SLOVA

Léčivé rostliny, fenolické sloučeniny, antioxidační aktivita, barva, kovy, senzorická analýza

KEY WORDS

Medical plants, phenolic compounds, antioxidant activity, colour, metals, sensory analysis

MÍSTO ULOŽENÍ PRÁCE

Areál knihovny FCH VUT v Brně, Purkyňova 118, Brno

OBSAH

1	PŘEHLED ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	5
1.1	Léčivé rostliny.....	5
1.2	Základní parametry ovlivňující kvalitu léčivých rostlin	5
1.3	Chemické složení studovaných léčivých rostlin	6
1.4	Aplikace léčivých rostlin do potravin	9
2	CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	10
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	11
3.1	Vzorky léčivých rostlin.....	11
3.2	Extrakce léčivých rostlin.....	11
3.3	Použité metody.....	11
3.4	Výroba sirupového základu a sirupů.....	12
3.5	Senzorické hodnocení bylinných nápojů a sirupů.....	12
3.6	Statistické zpracování dat.....	13
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	13
4.1	Komplexní charakterizace léčivých rostlin.....	13
4.1.1	<i>Vliv extrakčních podmínek na celkový obsah fenolických sloučenin.....</i>	<i>13</i>
4.1.2	<i>Vliv extrakčních podmínek na radikál-zhášecí aktivitu</i>	<i>15</i>
4.1.3	<i>Vliv extrakčních podmínek na konkrétní fenolické sloučeniny</i>	<i>17</i>
4.1.4	<i>Vliv extrakčních podmínek na obsah vybraných prvků.....</i>	<i>19</i>
4.1.5	<i>Vliv úpravy vzorku, geografie a roku produkce na všechny parametry ethanolových extraktů</i>	<i>19</i>
4.2	Aplikace léčivých rostlin do potravin	21
4.3	Optimalizace extrakce a výroba extraktů.....	21
4.4	Senzorická analýza jednodruhových sirupů.....	22
4.4.1	<i>Výběr vhodné receptury a příchutě pomocí pořadového testu</i>	<i>22</i>
4.4.2	<i>Hodnocení jednodruhových sirupů pomocí stupnic hedonického typu.....</i>	<i>22</i>
4.4.3	<i>Profilový test chuti</i>	<i>23</i>
4.5	Senzorická analýza dvoudruhových sirupů.....	24
4.5.1	<i>Výběr vhodné receptury a příchutě pomocí pořadového testu</i>	<i>24</i>
4.5.2	<i>Párová porovnávací zkouška dvoudruhových sirupů bez a s přídatkem aróniového koncentrátu.....</i>	<i>24</i>
5	ZÁVĚRY	25
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	28
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	33
8	ŽIVOTOPIS AUTORKY	34
9	PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORKY	35

ABSTRAKT

Předložená dizertační práce se zabývá komplexní charakterizací extraktů z léčivých rostlin pomocí spektroskopických a chromatografických technik s důrazem na vliv rozpouštědla, posklizňové úpravy vzorku, lokality a roku produkce na vybrané parametry. Část práce je věnována aplikaci vybraných extraktů z léčivých rostlin ve vhodné formě do nápojů. Tematicky je práce rozdělena do dvou částí.

V první části práce byly pomocí kombinace metod elektronové paramagnetické rezonance, ultrafialové viditelné spektroskopie, kapalinové chromatografie a optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem charakterizovány vodné, ethanolové a dimethylsulfoxidové extrakty z 10 vybraných druhů léčivých rostlin, které byly sbírány ve dvou různých lokalitách v průběhu dvou let (2015, 2016) a posklizňově upravovány dvěma způsoby (zmražení, sušení). Celkově bylo sledováno 39 parametrů: konkrétně obsah celkových fenolických látek, flavonoidů, 14 konkrétních fenolických sloučenin, barevné charakteristiky v systému CIE $L^*a^*b^*$ (L^* , a^* , b^* , C^* , h° , BI), radikál-zhášecí aktivita s využitím kation radikálu 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonové kyseliny), antioxidační/prooxidační aktivita technikou spinových lapačů v systému 5,5-dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO)/peroxodisíran draselný a obsah 15 minerálních látek (Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb, Zn). Výsledky prokázaly, že sledované parametry jsou různou mírou ovlivňovány použitým extrakčním systémem, posklizňovou úpravou vzorků, rokem produkce, původem vzorků (lokalitou) i druhovou skladbou. Bylo prokázáno, že druh extrakčního činidla výrazně ovlivňuje složení extraktů. Na základě analýz byl jako nejvhodnější systém pro potravinářskou aplikaci – izolaci hlavních funkčních složek (fenolických látek, flavonoidů), vybrán 50% ethanol, úprava rostlin sušením a z jednotlivých druhů máta peprná, meduňka lékařská, třezalka tečkovaná a šalvěj lékařská.

Druhá část práce spočívá v aplikaci vybraných extraktů do nápojů. Pro aplikaci byly vybrány výše zmíněné rostliny a 25% ethanol místo 50% ethanolu (vzhledem k limitaci obsahu ethanolu v konečném produktu). V první fázi byla optimalizována extrakce. Byl vybrán vhodný poměr materiálu a rozpouštědla (1:10), doba extrakce (8 h) a zjištěna nasákavost bylin (50–62 %). Vyrobený extrakt byl aplikován k sirupovému základu ve vybraných poměrech a sensoricky testován za účelem výběru vhodné receptury, příchutě a základu pro výrobu dvoudruhových sirupů. Sensoricky nejpříjemnějším byl vyhodnocen mátový sirup a šalvějový sirup byl vybrán jako základ pro dvoudruhové sirupy. V rámci dalšího testování byla vybírána nejvhodnější receptura dvoudruhového sirupu, sensoricky nejvhodnější příchutě a testováno zda by bylo vhodné vybrané dvoudruhové sirupy dobarvovat. Nejchutnějším a celkově nejpříjemnějším dvoudruhovým sirupem byl vybrán šalvějovo-mátový sirup. Preferenčně bylo zjištěno, že sirupy není nutno dobarvovat.

1 PŘEHLED ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

1.1 LÉČIVÉ ROSTLINY

Léčivé rostliny, často označované souhrnně léčivé, aromatické a kořeninové rostliny (LAKR), jsou z potravinářského hlediska rostliny, které se používají ke zlepšení chuti, vůně a vzhledu potravin, ke snížení spotřeby soli, tuku a ke konzervaci potravin. Řadí se mezi nutraceutika, funkční potraviny, fytopotraviny. Čerstvé a sušené léčivé rostliny, zpracovávané pro potravinářské účely, podléhají požadavkům, které vymezuje potravinářská legislativa. Kontrolním orgánem v této oblasti je Státní zemědělská a potravinářská inspekce [1, 2].

Základním parametrem kvality LAKR je optická kvalita produktu: odpovídající barva, bez černých skvrn a jiných posunů barevnosti. Druhým parametrem jakosti je typická vůně, kterou si každá surovina zachovává v případě správného procesu sušení. Kvalita léčivých rostlin je značně ovlivněna způsobem sklizně, transportu, skladování a zpracování, proto je v případě kontroly jakosti stále diskutována správná zemědělská a výrobní praxe [2].

1.2 ZÁKLADNÍ PARAMETRY OVLIVŇUJÍCÍ KVALITU LÉČIVÝCH ROSTLIN

Při zpracování léčivých rostlin je nezbytně nutné zabezpečit jejich kvalitu a dodržet základní pěstitelské a technologické postupy. V následujícím přehledu jsou uvedena všeobecná doporučení:

- **Pěstování** na otevřených, slunných a vzdušných lokalitách.
- **Sklizně** – podzemní orgány se sklízí v zimě; natě a listy v období květu; květy před tvorbou semen v plném květu; semena před dosažením zralého stavu [3].
- **Posklizňové ruční oddělení částí**, které jsou poškozené od hmyzu, plísní aj.
- **Posklizňové umytí rostlin** pod tekoucí vodou.
- **Posklizňové sušení** u většiny LAKR při 30–60 °C, u LAKR s obsahem esenciálních olejů při 40 °C, u sprejových sušících technik při 100–200 °C, 1 minutu [4].
- **Mikrobiální dekontaminace** ozařováním s použitím gama a rentgenového záření o energii 5–10 MeV a dávkováním až do 10 kG, ošetření pomocí páry při 100–200 °C, následné vysušení horkým vzduchem a rychlé ochlazení, nebo pomocí plazmy [5].
- **Mletí, rozdrcení** za účelem snížení velikosti částic před samotnou extrakcí, kontrola umletého materiálu a případné ruční odstranění nečistot.
- **Skladování** sušených rostlin v pytlích z pytloviny, papíru, ve stinných a suchých skladech, zajistit oddělení druhů s vysokým obsahem vonných látek, doporučená max. lhůta pro skladování u listů, výhonků, květů a plodů 12–18 měsíců, u kůry a kořenů 12–36 měsíců; čerstvé léčivé rostliny by se měly skladovat při 2–8 °C; mražené výrobky při teplotě –18 °C [3, 4].

1.3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ STUDOVANÝCH LÉČIVÝCH ROSTLIN

Léčivé rostliny jsou bohatým zdrojem výživových a biologicky aktivních látek. Hlavní výživové složky jsou sacharidy, bílkoviny, aminokyseliny, lipidy, mastné kyseliny, organické kyseliny a minerály. Biologicky aktivními sloučeninami, tzv. funkčními složkami, které mají příznivé účinky na zdraví (antibakteriální, protirakovinové, detoxikační, antioxidační), jsou neškrobové polysacharidy (vláknina), fenolické sloučeniny, vitaminy, karotenoidy, fytosteroly, alkaloidy, terpeny, fytoestrogeny aj. Funkční složky LAKR, vzhledem ke svým pozitivním účinkům, mohou být využity při léčbě a prevenci různých onemocnění. Výzkum léčivých rostlin se proto v současnosti zaměřuje především na identifikaci, izolaci a stanovení biologické aktivity funkčních složek a na jejich možnou roli při prevenci a/nebo léčbě rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění, diabetu, vysokého krevního tlaku, popálenin a dalších onemocnění [6, 7].

Z hlediska výzkumu je největší pozornost věnována antioxidantům léčivých rostlin. Největší skupinou látek s antioxidačním účinkem v léčivých rostlinách jsou fenolické sloučeniny (flavonoidy, taniny, chalkony, kumariny, fenolické kyseliny a stilbeny). Kromě těchto sloučenin antioxidační potenciál vykazují některé vitaminy (C, E), β -karoten a karotenoidy. Dokonce některé prvky, Cu, Fe, Mn, Zn a Se, které tvoří metaloenzymy, jsou důležité při ochraně buněk před volnými radikály [8, 9].

Ze širokého sortimentu léčivých rostlin bylo vybráno 10 druhů, z nichž všechny lze snadno pěstovat v klimatických podmínkách České republiky. Každý druh je výjimečný obsahem funkčních komponent. V následujícím přehledu je důraz kladen na zastoupení fenolických sloučenin, antioxidantů a minerálů léčivých rostlin, které byly sledovány v rámci komplexní charakterizace v této práci. Z Tab. 1 a 2 je zřejmé, že chemické složení LAKR se značně liší u jednotlivých druhů, dále se může lišit u konkrétních rodů, čeledí, odrůd. Je značně ovlivněno environmentálními a geografickými faktory. Může se lišit v rámci ontogeneze, vliv může mít množství živin, podmínky při pěstování, vitalita a stáří rostliny. Dále může mít vliv příprava materiálu, podmínky skladování nebo doba sklizně, proto pro další průmyslové aplikace je nutné brát do úvahy všechny zmíněné faktory [10].

Tab. 1: Zastoupení fenolických sloučenin, antioxidantů a minerálů ve studovaných léčivých rostlinách

Léčivá rostlina	Fenolické sloučeniny	Antioxidanty	Minerály
Levandule	ferulová, rosmarýnová, <i>p</i> -kumarová, <i>o</i> -kumarová, <i>p</i> -hydroxybenzoová, protokatechová, sinapová, kávová, vanilová, chlorogenová, kvercetin, apigenin [11, 12]	1,8-cineol, limonen, anthokyany, fenolické kyseliny, kumariny, flavonoidy [11]	K, Ca, Mg, Na [13]
Měsíček	kvercetin, isorhamnetin, isokvercetin, narcissin, kalendoflasid, kalendoflavosid, myricetin, kalendoflavobiosid, rutin, isoquercitrin, neohesperidosid, hesperidin, fisetin, kvercetin-3-O- rutinosid, kaemferol, luteolin, apigenin, katechin, chlorogenová, kávová, ferulová a rozmarýnová kyselina [14, 15]	fenolické kyseliny, flavonoidy, karotenoidy, tokoferoly, kumariny [16]	Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Cr a stopové množství Co, Pb a Cd [17]
Třezalka	hyperosid, rutin, isokvercitrin, kvercitrin, kvercetin, amentoflavon, luteolin, kaemferol, biapigenin a epigallokatechin gallát, chlorogenová, neochlorogenová, kryptochlorogenová, kávová, ferulová, <i>p</i> -hydroxybenzoová, vanilová, rozmarýnová, <i>p</i> -kumarová kyselina [18, 19]	karotenoidy, vitamin C, E, kumarin, flavonoidy fenolické kyseliny [20]	K, Mg, Mn, Pb, Zn, Co, Cr, Li, Ni, Na, Ca, Cu, Fe a Se [21]
Šalvěj m.	kávová, rozmarýnová, karnosová, kvercetin, luteolin, apigenin, diosmetin, rhamnetin, genkwanin a methylkarnosát [22]	fenolické kyseliny, flavonoidy taniny, tokoferoly [23]	Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, P, Pb, S, Ti a Zn [24]
Meduňka	gallová, chlorogenová, metrilová, kávová, <i>m</i> -kumarová, rozmarýnová, protokatechová, <i>p</i> -kumarová kyselina, erio-dictyol-7-O- glukosid, naringin, hesperidin, naringenin, apigenin, hesperetin, kvercitrin, rhamnocitin, luteolin [25, 26]	fenolické kyseliny, karotenoidy, vitamin C, taniny, monoterpeny, seskviterpeny [25, 26]	Al, Ca, Na, P, S a nižší obsahy Ag, B, Ba, Bi, Cd, Co, Mn, Ni, Pb, Sr, Tl a V [27]

Tab. 2: Zastoupení fenolických sloučenin, antioxidantů a minerálů ve studovaných léčivých rostlinách – pokračování

Léčivá rostlina	Fenolické sloučeniny	Antioxidanty	Minerály
Máta	kávová, rozmarýnová, protokatechová, gallová, vanilová, syringová, ferulová, chlorogenová, sinapová, <i>p</i> -hydroxybenzoová, skořicová, <i>o</i> -kumarová kyselina, luteolin, rutin isorhoifolin, linarin, pebrellin, naringin hesperidin, narirutin, katechin, epikatechin, kvercetin [28]	karotenoidy, lutein, β -karoten, tokoferoly, vitamin C, fenolické sloučeniny, menthol, betain [29]	Ca, Mg, Na, K a P; Cu, Fe, Mn, Zn, Al, B, Ba, Ni ve stopových množstvích Cr, I, Cd, Ag a Se [27, 30]
Šalvěj l.	kyselina kávová, chlorogenová, rozmarýnová, ferulová, karnosová, salvianová, ursolová, ellagová, epikatechin, epikatechin gallát, methyl karnosát, kvercetin, karnosol, rosmanol, rosmadial, epirosmanol, rutin, luteolin, 6-methoxygenkwannin, genkwanin, hispidulin, salviginin [31, 32]	kumariny, flavonoidy, taniny, vitamin C, glykosidy flavonoidů [33]	Ca, K, Mg, Na a P nižší obsahy Al, Ni, B, Ba, Cu, Fe, Mn, Sr, Zn, Co a Cr [27, 34]
Yzop	kyselina ferulová, gallová, gentisová, chlorogenová, kávová, kaftarová, <i>p</i> -hydroxybenzoová, vanilová, <i>p</i> -kumarová, protokatechová, gentisová, rozmarýnová, syringová, apigenin, kvercetin, kvercitrin, isokvercitrin, katechin, acacetin, diosmin, luteolin a jejich glykosidy [35, 36]	flavonoidy, fenolické kyseliny, taniny, karotenoidy, vitamin C [37]	Ca, K, Na, P, Mg, Fe, Cu, Zn a Mn [38]
Jestřabina	ferulová, <i>p</i> -kumarová, salicylová, chlorogenová, kávová, vanilová, gallová kyselina, rutin, kvercetin, naringin, myricetin, kaemferol, genistein, apigenin, luteolin [39]	flavonoidy, taniny, vitamin C, β -karoten, fytoosteroly [39, 40]	P, K, Na, Ca, Mg, B, Ni, Cu, Zn, Mn, Fe, Cr, Cd a Pb [41]
Ostropěstřec	taxifolin, apigenin, kvercetin, kaemferol, rutin, luteolin, kyselina protokatechová, kávová, <i>p</i> -kumarová, ferulová, chlorogenová, cichorová, cinarová, rozmarýnová [42, 43]	flavonoidy, fenolické kyseliny, tokoferoly, betain, silymarin, silybin [42]	Ca, Mg, Na, P, S a K, a nižší obsahy Cu, Fe, Mn, Li a Cl [44]

1.4 APLIKACE LÉČIVÝCH ROSTLIN DO POTRAVIN

Studované léčivé rostliny, vzhledem k obsahu řady biologicky aktivních látek, mají v potravinářství celou řadu využití. Používají se jako přísady do nealkoholických a alkoholických nápojů, pečiva, sušenek, želé, čokoládových, bonbónů, zmrzlin, bylinných čajů, koření, bylinných směsí a doplňků stravy. Jsou využívány jako chuťové, vonné ingredience, barviva a vzhledem k jejich antimikrobním a antioxidantním vlastnostem i jako přírodní konzervační látky. Z hlediska zachování biologicky aktivních látek je vhodné použití šetrné technologické operace a minimalizovat záhřev suroviny. Z tohoto důvodu se zdá být vhodná aplikace LAKR do potravin ve formě extraktů. V následujícím přehledu jsou shrnuty hlavní aplikace studovaných bylin do potravin.

Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*) se využívá jako vonná a chuťová ingredience ve formě esenciálního oleje pro aromatizaci žvýkaček, cukrovinek, nealkoholických a alkoholických nápojů, zmrzlin, jemného pečiva, salsy, džemů, želé, sirupů, pudinků nebo do vývarů [13].

Měsíček lékařský (*Calendula officinalis*) se využívá jako hlavní surovina a barvivo do kari koření, nápojů a sýrů. Extrakty byly aplikovány do melounových džusů a sirupy do sušenek [45, 46].

Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*) a její preparáty našly uplatnění jako doplňky stravy ve formě tablet, kapslí, čajů, tinktur a extraktů. Využívá se jako barvivo a ochucovadlo. Nálevy, alkoholické tinktury a extrakty třezalky se používají k ochucení a aromatizaci při výrobě hořkých likérů [47]. Do alkoholických nápojů se může přidávat za předpokladu, že koncentrace hypericinu v konečném produktu nepřesahuje $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [48].

Šalvěj muškátová (*Salvia sclarea*) se využívá ve formě extraktu jako aromatická přísada do nealkoholických a alkoholických nápojů, mražených mléčných výrobků, bonbónů, pečiva, želatiny [49].

Meduňka lékařská (*Melissa officinalis*) se využívá jako ingredience ke stabilizaci a konzervaci nápojů a potravin. Esenciální olej a extrakty meduňky mohou být použity jako přírodní antioxidanty a konzervanty pro prodloužení trvanlivosti nápojů, cukrovinek, pečiva a sýrů [50, 51]. Sirupy a extrakty z meduňky byly úspěšně aplikovány do kysaných mléčných nápojů [52].

Máta peprná (*Mentha piperita*) se ve formě extraktu používá k ochucení a aromatizaci cukrovinek, čokolády, bonbonů, žvýkaček a alkoholických i nealkoholických nápojů. Menthol se aplikuje při výrobě pastilek [28]. Sirupy z máty peprné byly aplikovány k ochucení kysaných mléčných nápojů [52]. Extrakty byly využity k přípravě nových limetkových nápojů [53] a také byly aplikovány pro zvýšení stability slunečnicového oleje během skladování [54].

Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*) se používá k aromatizaci potravin a jako přírodní konzervační činidlo. Může být přidávána do potravin za předpokladu, že koncentrace thujonů v konečném produktu nepřesahuje $0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [31]. Esenciální olej z šalvěje se přidává do masa, klobásek, omáček, kuřecích náplní, ryb, polévek a konzerv. Lze jej využít do paštik a fermentovaných salámů jako antioxidant.

Hydrolát ze šalvěje lékařské lze využít k výrobě nápojů s přírodními antibiotickými účinky [55] při zažívacích potížích. Extrakty byly použity k prodloužení trvanlivosti másla a olejů [56].

Esenciální olej a extrakt **yzopu lékařského** (*Hyssopus officinalis*) se používají k aromatizaci (dodání mátového *flavouru*) a/nebo ochucení alkoholických likérů, čajů, toniků, masných výrobků, omáček a pochutin [57].

Jestřabina lékařská (*Galega officinalis*) v potravinářském průmyslu nemá zatím velké využití. Extrakt z jestřabiny byl aplikován pouze do jogurtů [58].

Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*) se využívá v různých formách: celé semeno, prášek, řezaná bylina, čajové sáčky, alkoholické extrakty, esenciální olej, kapsule, mouka a měkký gel [59, 60]. Celá semena, esenciální olej a prášková forma semen se aplikují do doplňků stravy. Ze semen se vyrábí olej, který se konzumuje za studena nebo se přidává do másla a sádla jako antioxidant v případě, že obsahuje 0,8 % silymarinu. Fermentovaná semena ostropestřce byla aplikována pro zlepšení kvality pšeničného chleba [59].

2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cíle dizertační práce je možné rámcově definovat následovně:

1. Pomocí kombinace moderních analytických, spektroskopických a statistických metod komplexně prostudovat složení a vlastnosti vybrané skupiny nejvýznamnějších běžně dostupných léčivých rostlin.
 - a) Komplexně charakterizovat extrakty vybraných léčivých rostlin pocházejících ze dvou lokalit připravených dynamickou extrakcí do vody, 50% ethanolu a dimethylsulfoxidu (DMSO).
 - b) Posoudit efektivitu rozpouštědel v případě různé úpravy vzorku (mražení vs. sušení).
 - c) Posoudit vliv geografických podmínek a roků produkce na vybrané charakteristiky léčivých rostlin.
2. Navrhnout postupy šetrné izolace a následné aplikace vybraných komponentů léčivých rostlin do potravinářských produktů (nápoje).
3. Ve spolupráci s ověřovacím pracovištěm experimentálně ověřit realizovatelnost navrhovaných postupů izolace složek léčivých rostlin a jejich aplikace do potravinářských komodit.

Hlavním cílem analytické části práce je vybrat vhodné technologické zpracování (způsob úpravy léčivé rostliny a extrakčního rozpouštědla) a vhodné druhy léčivých rostlin pro izolaci funkčních složek (hlavně fenolických sloučenin, flavonoidů, látek s antioxidantním potenciálem) při následné aplikaci do potravin.

V podmínkách ČR/SR dosud nebyla realizována experimentální studie s přímou aplikací/ověřením výsledků v podmínkách poloprovozu, což je jeden z hlavních originálních přínosů předložené dizertační práce.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 VZORKY LÉČIVÝCH ROSTLIN

Pro komplexní analýzu bylo vybráno deset druhů léčivých rostlin: levandule lékařská, měsíček lékařský, třezalka tečkovaná, šalvěj muškátová, meduňka lékařská, jeřábina lékařská, yzop lékařský, máta peprná, šalvěj lékařská a ostropestřec mariánský, které byly sbírány ve dvou různých botanických zahradách (Centrum léčivých rostlin Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně; Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně se sídlem v Lednici) v průběhu dvou let 2015 a 2016. Vzorky byly posklizňově upravovány dvěma způsoby: sušením (při teplotě 25–30 °C) a zmražováním (při teplotě –18 °C).

Pro aplikační část byla vybrána meduňka lékařská, máta peprná, třezalka tečkovaná a šalvěj lékařská vzhledem k vysokým obsahům fenolických sloučenin, antioxidantů a vhodným sensorickým vlastnostem. Botanicky identické vzorky léčivých rostlin jako vzorky studované v první části práce dodala firma Calendula a.s. v množství 5 kg v sušené a drcené formě (sušení do 30 °C, velikost částic 1–5 mm) v papírových pytlech.

3.2 EXTRAKCE LÉČIVÝCH ROSTLIN

Extrakce pro komplexní charakterizaci léčivých rostlin probíhala pomocí dynamické extrakce rozpouštědly. Homogenizovaný zmražený/sušený vzorek (0,5 g rostliny:20 ml rozpouštědla) byl extrahován pomocí deionizované vody (H₂O), 50% ethanolu (50% ETOH) nebo DMSO 1 h při konstantním třepání (150 ot·min⁻¹), centrifugován (5000 ot·min⁻¹ 10 min, 20 °C), filtrován přes kvantitativní filtr popřípadě filtrován přes nylonový mikrofiltr (průměr 0,2 μm).

Extrakce pro aplikaci do sirupů byla prováděna pomocí prosté extrakce 25% ethanolom (v poměru 1:10 – bylina:rozpouštědlo) 8 hodin. Po uplynutí stanovené doby byl materiál přefiltrován přes tkaninu do 15 l demižonu a uskladněn v chladicím boxu.

3.3 POUŽITÉ METODY

Pro komplexní charakterizaci vodných, ethanolových a DMSO extraktů byly realizovány série experimentů, při nichž byly použity následující analytické techniky a metody.

Ultrafialová viditelná spektroskopie (UV-VIS – UltraViolet Visible Spectroscopy)

- Celkový obsah fenolických sloučenin s využitím Folin-Ciocalteuova činidla vyjádřený jako GAE – Gallic Acid Equivalent.
- Celkový obsah flavonoidů s využitím 2-aminoetyl-difenylborátu vyjádřený jako RE – Rutin Equivalent.
- Barevné charakteristiky v systému CIE L*a*b* (L*, a*, b*, h°, C* a BI – Browning index).

Elektronová paramagnetická rezonance (EPR – Electron Paramagnetic Resonance)

- Radikál-zhášecí aktivita pomocí roztoku stabilního kation radikálu 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonové kyseliny – ABTS^{•+} (výsledky vyjádřeny jako TEAC_{ABTS^{•+}} – Trolox Equivalent Antioxidant Activity).
- Antioxidační aktivita testována pomocí techniky spinových lapačů s využitím K₂S₂O₈ jako radikálového iniciátoru a DMPO (5,5,-dimethylpyrroline N-oxid) jako spinového lapače (výsledky byly vyjádřeny jako RS% – % Radicals Scavenged).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v diodovém poli (HPLC-DAD – High Performance Liquid Chromatography Diode Array Detector)

- Identifikace a kvantifikace konkrétních fenolických kyselin a flavonoidů (gallová, kávová, *p*-kumarová, ferulová, sinapová, vanilová, chlorogenová kyselina, katechin, rutin, kvercetin, myricetin, hesperidin, naringin, luteolin).

Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES – Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)

- Identifikace a kvantifikace 15 prvků (Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb, Zn).

3.4 VÝROBA SIRUPOVÉHO ZÁKLADU A SIRUPŮ

Vzhledem k aplikaci bylinných extraktů do sirupů bylo nutné vyrobit sirupový základ. Sirupový základ, tvořený 65% roztokem sacharosy okyseleným kyselinou mléčnou (koncentrace 2 g·l⁻¹), byl ohříván na mírném plameni 4 hodiny do kompletního rozpuštění a ihned aplikován do připravených vysterilovaných nádob dle zvolených poměrů, uzavřen víčkem a ponechán zcela vychladnout. Po vychladnutí byl k němu přidáván zvláště lihový extrakt z máty, meduňky, třezalky a šalvěže. Extrakty byly přidávány ve třech různých poměrech u všech vybraných rostlin. Dvoudruhové sirupy pak byly vyráběny smísením jednodruhových sirupů ve zvolených poměrech.

3.5 SENZORICKÉ HODNOCENÍ BYLINNÝCH NÁPOJŮ A SIRUPŮ

Vyrobené jedno- a dvoudruhové sirupy a z nich připravené nápoje byly sensoricky hodnoceny 40 hodnotiteli z řad studentů Fakulty chemické VUT. Sensorické hodnocení bylo prováděno s využitím: pořadové zkoušky, profilového testu, hodnocení pomocí sedmibodové kategorové ordinální stupnice a párové porovnávací zkoušky dle platných ISO norem. V případě potřeby bylo hodnocení doplněno popisnou zkouškou. Celkem proběhly čtyři bloky sensorického testování.

3.6 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT

Na statistické porovnání experimentálních dat byla primárně použita analýza rozptylu (ANOVA – Analysis of Variance) procedura Tukey-HSD (Unistat v. 6.0) pro porovnání skupinových průměrů. Pro velký soubor vzorků byly experimentální charakteristiky zpracovány také metodami vícerozměrné statistiky, s důrazem na analýzu hlavních komponent (PCA – Principal Component Analysis) a diskriminační analýzu – kanonická diskriminační analýza (CDA – Canonical Discriminant Analysis) a diskriminace metodou k-tého nejbližšího souseda.

Výsledky sensorického hodnocení pomocí stupnic byly statisticky zpracovány Kruskal-Wallisovým testem a následně Nemenyiho vícenásobným párovým porovnáváním. Pořadová zkouška byla vyhodnocena na základě Friedmanova testu, párová porovnávací zkouška pomocí statistické tabulky dle ČSN EN ISO 5495 [61]. Pro zkoumání korelací mezi sensorickými znaky byla použita metoda hlavních komponent.

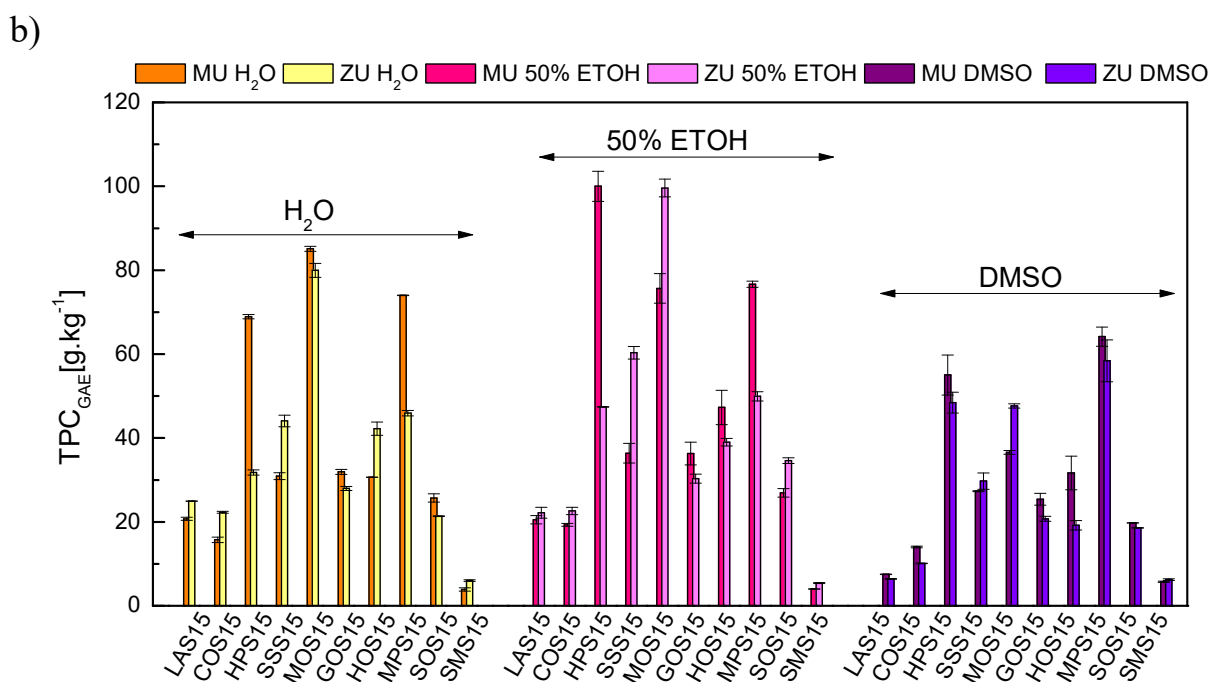
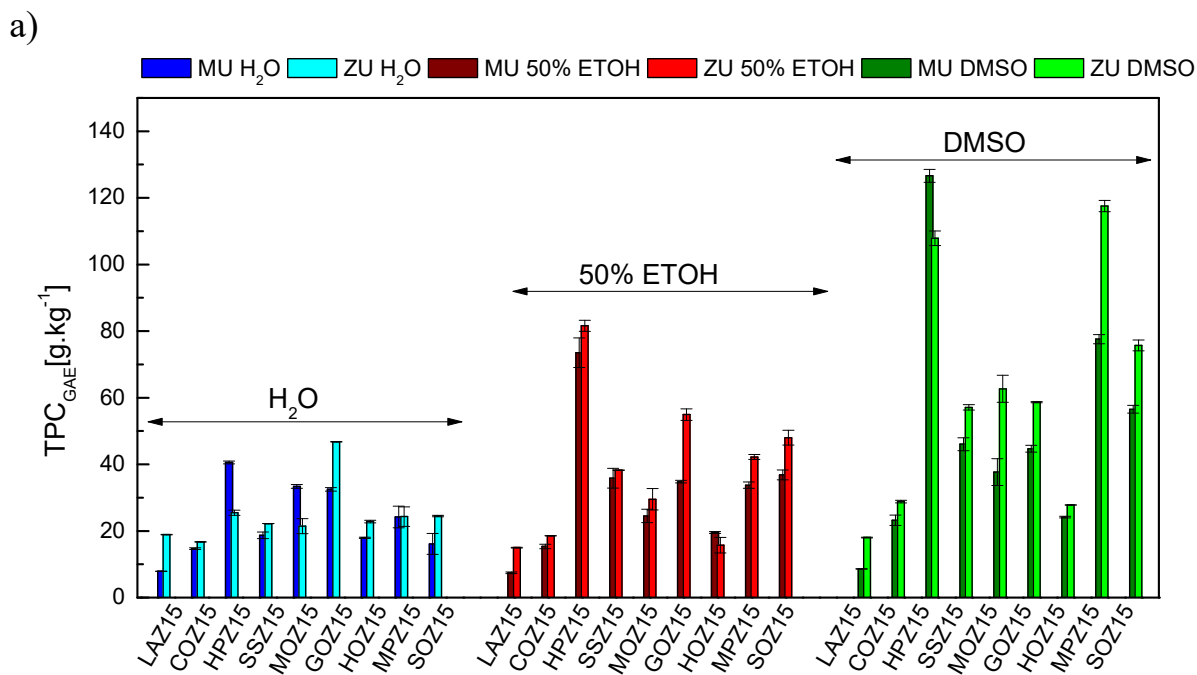
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 KOMPLEXNÍ CHARAKTERIZACE LÉČIVÝCH ROSTLIN

Na souboru 76 vzorků léčivých rostlin bylo testováno 39 parametrů. Cílem bylo posoudit vliv geografických, klimatických podmínek a technologických operací, tj. vliv použitých extrakčních systémů (deionizovaná voda, 50% ethanol a DMSO), na izolaci funkčních složek léčivých rostlin, vybrat vhodné technologické zpracování (způsob úpravy léčivé rostliny a extrakčního rozpouštědla) a vhodné druhy léčivých rostlin pro izolaci funkčních složek (hlavně fenolických sloučenin, flavonoidů, látek s antioxidačním potenciálem) při následné aplikaci do potravin, primárně do sirupů resp. nápojů.

4.1.1 Vliv extrakčních podmínek na celkový obsah fenolických sloučenin

Celkový obsah fenolických sloučenin (TPC – Total Phenolic Content) v léčivých rostlinách (Obr. 1) je ovlivňován posklizňovou úpravou i použitým extrakčním systémem. Obsah TPC u zmražených vzorků byl v pořadí DMSO > 50% ETOH > H₂O ukazující, že polární aprotické rozpouštědlo je z hlediska výtěžnosti TPC u vzorků s obsahem vody nevhodnější. Podobný trend byl zaznamenán v dřívějších studiích [62, 63]. Pozorované rozdíly mezi rozpouštědly souvisí především s rozdílným charakterem z hlediska polarity, s ohledem na hodnoty relativní permitivity vody, ethanolu a DMSO (tabelovaná hodnota při 25 °C $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}} = 78,3$; $\epsilon_{\text{ETOH}} = 24,3$ a $\epsilon_{\text{DMSO}} = 46$ [64]). V případě DMSO a ethanolových extraktů, vzhledem k nižší polaritě oproti vodným extraktům, došlo pravděpodobně k extrakci i méně polárních sloučenin. Výsledky porovnání ethanolových a vodných extraktů, kdy ethanolové extrakty mají vyšší obsahy TPC, jsou v souladu s výsledky podobných studií meduňky lékařské [65] a šalvěže lékařské [66].



Obr. 1: Celkový obsah fenolických sloučenin v různých extraktech (H₂O, 50% ETOH, DMSO) připravených a) ze zmražených a b) sušených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit (MU, ZU) a produkovaných v roce 2015. Označení vzorků: LA – levandule lékařská, CO – měsíček lékařský, HP – třezalka tečkovaná, SS – šalvěj muškátová, MO – meduňka lékařská, GO – jeřábina lékařská, HO – yzop lékařský, MP – máta peprná, SO – šalvěj lékařská, SM – ostropestřec mariánský; Z – zmražené, S – sušené, 15 – rok 2015

U sušených vzorků byl trend odlišný, TPC se snižoval v pořadí 50% ETOH > H₂O > DMSO, kdy protická rozpouštědla byla pro extrakci fenolických sloučenin vhodnější. Teplota sušení měla pravděpodobně vliv na degradaci některých méně polárních fenolických sloučenin. Rozdíly mezi rozpouštědly jsou dány rozdílnou polaritou rozpouštědla, a pravděpodobně souvisí i se specifickými vlastnostmi vody (tvorba vodíkových můstků, dipólových interakcí atd.) [67], která umožnila lepší extrakci polárních sloučenin. Z výsledků je zřejmé, že pro potravinářské použití by byl nejvhodnější pro obě úpravy 50% ethanol, vzhledem k dráždivosti DMSO, kdy tento systém lze v koncentrované formě použít jen pro analytické účely.

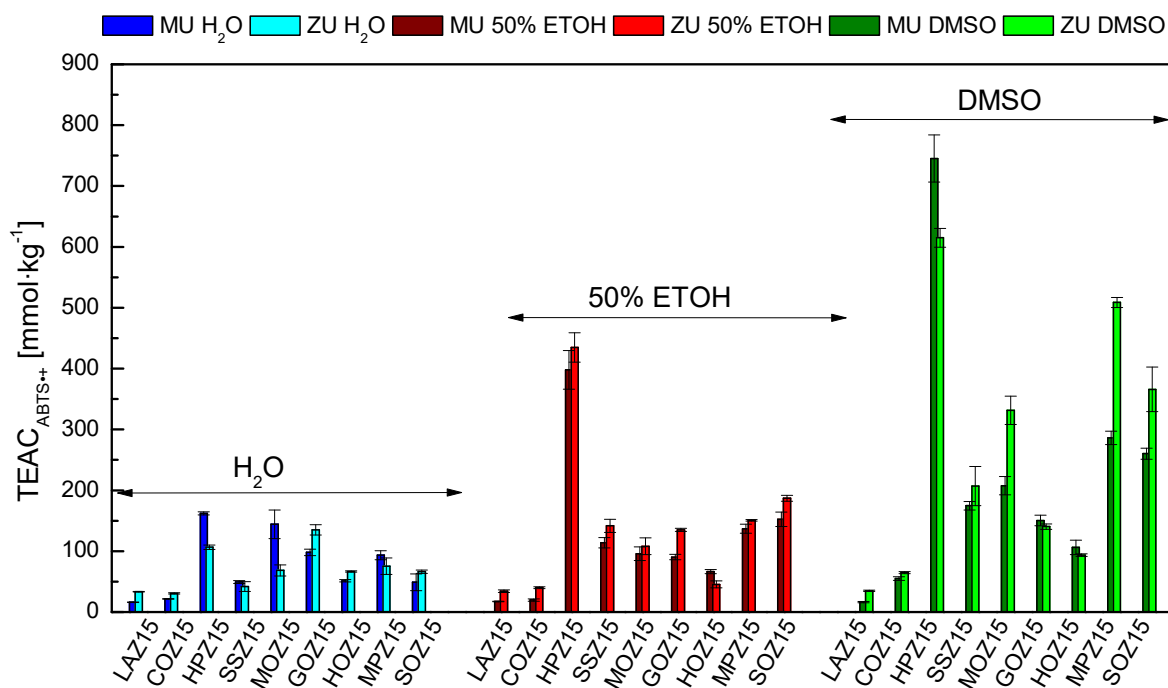
Při porovnání výtěžnosti TPC z hlediska posklizňové úpravy je u protických systémů vhodnější úprava vzorků sušením, která poskytuje vyšší obsahy TPC ve srovnání se zmraženými vzorky. V případě DMSO je vhodnější úpravou zmrazování. Nižší obsahy TPC v případě zmražených vzorků (u protických systémů) mohou být způsobeny nižší extrakční účinností, do jisté míry samotným procesem zmrazování, při němž může docházet k poškození sloučenin působením enzymů, substrátů a aktivátorů [68]. U sušených vzorků pravděpodobně při vysušení dochází k inhibici peroxidasy a polyfenoloxidas, kdežto v případě zmražených vzorků jsou tyto enzymy v průběhu zpracování rostlin aktivní, což mohlo vést k vyššímu poklesu TPC. V rámci jednotlivých druhů mají vysoký obsah fenolických sloučenin extrakty z třezalky, máty a meduňky.

4.1.2 Vliv extrakčních podmínek na radikál-zhášecí aktivitu

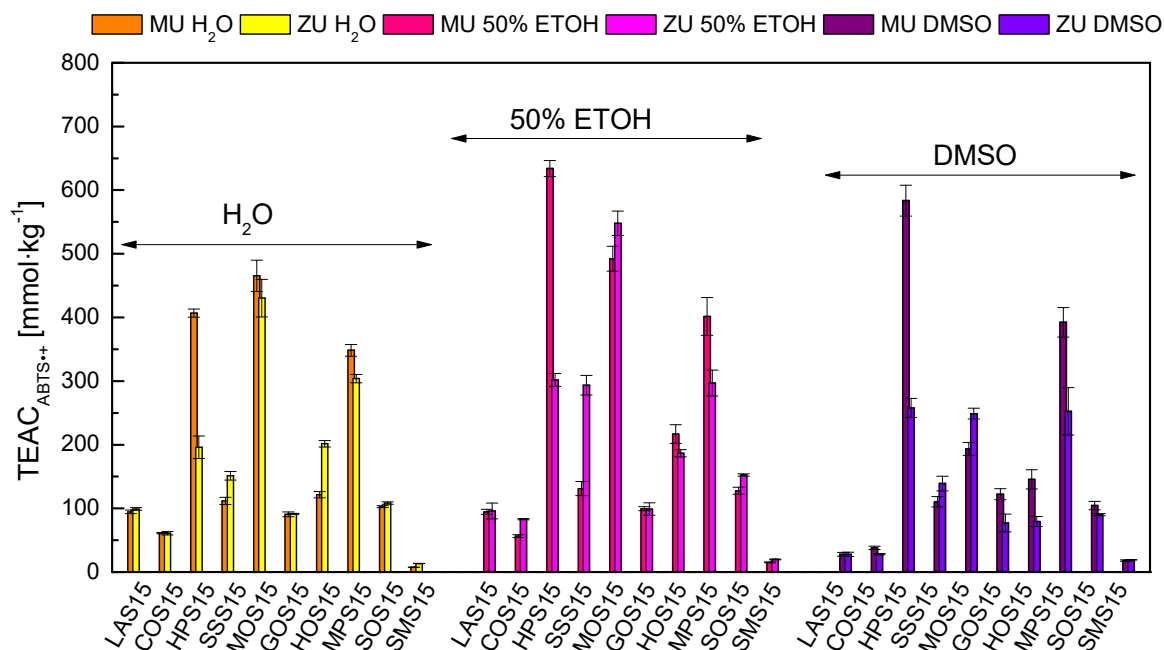
U všech studovaných extraktů byla prokázána schopnost eliminace syntetického kation radikálu ABTS^{•+}, tzn. antioxidační potenciál extraktů. Při porovnání jednotlivých extrakčních systémů (Obr. 2a, b) bylo zjištěno, že u vzorků ze zmražených léčivých rostlin je pokles TEAC_{ABTS•+} hodnot ve směru: DMSO > 50% ETOH > H₂O, což kopíruje trendy popsané u TPC a zjištěných u celkových obsahů flavonoidů (TFC – Total Flavonoid Content). U sušených vzorků byla extrakční rozpouštědla co do účinnosti velmi podobná. Všeobecně však trendy byly v pořadí: 50% ETOH > DMSO > H₂O, což kopíruje trendy s TFC.

Výsledky antioxidační aktivity dobře kopírují trendy popsané u stanovení TPC a TFC. Vzájemné vztahy mezi parametrem TEAC_{ABTS•+} a TPC/TFC podporují i hodnoty korelačních koeficientů, které u parametru TEAC_{ABTS•+}/TPC byly u zmražených vzorků ve vodě 0,9183, v 50% ETOH 0,9381 a DMSO 0,9490, respektive u sušených vzorků ve vodě 0,9733, v 50% ethanolu 0,9753 a DMSO 0,9756 a u parametrů TEAC_{ABTS•+}/TFC u zmražených vzorků ve vodě 0,5217, v 50% ethanolu 0,5889 a DMSO 0,7509 respektive sušených vzorků ve vodě 0,7100, v 50% ethanolu 0,7649 a DMSO 0,8229. Korelační koeficienty naznačují, že fenolické sloučeniny budou hlavní sloučeniny s antioxidačním účinkem a také flavonoidy budou ovlivňovat antioxidační aktivitu, ale budou pravděpodobně spolupůsobit s dalšími sloučeninami s antioxidačním účinkem. Korelační koeficienty jsou v souladu s předešlými studiemi [69, 70].

a)



b)



Obr. 2: Průměrné hodnoty TEAC_{ABTS+} (mmol·kg⁻¹) stanovené v různých extraktech (H₂O, 50% ETOH, DMSO) připravených a) ze zmražených a b) sušených léčivých rostlin pocházejících ze dvou různých lokalit (MU, ZU) a produkovaných v roce 2015. Označení vzorků: LA – levandule lékařská, CO – měsíček lékařský, HP – třezalka tečková, SS – šalvěj muškátová, MO – meduňka lékařská, GO – jestřabina lékařská, HO – yzop lékařský, MP – máta peprná, SO – šalvěj lékařská, SM – ostropestřec mariánský; Z – zmražené, S – sušené, 15 – rok 2015

V případě porovnání radikál-zhášecí aktivity u zmražených a sušených vzorků jsou trendy obdobné jako u TPC a TFC, pro protické systémy je vhodné sušení a pro DMSO zmrazování. Pro potravinářské účely se pro izolaci antioxidantů jeví vhodné použití 50% ethanolu a úprava sušením.

V rámci jednotlivých druhů jsou bohatým zdrojem antioxidantů meduňka, máta, šalvěj lékařská, třezalka, jestřabina, kdežto naopak měsíček, levandule, ostropestřec vykazují nízkou antioxidační aktivitu.

Dále byla testována schopnost extraktů terminovat hydroxylové radikály metodou spinových lapačů v přítomnosti DMPO jako spinového lapače a peroxidisíranu draselného jako iniciátoru hydroxylových radikálů. Analýzou vodných a DMSO extraktů léčivých rostlin bylo zjištěno, že dochází výlučně ke generování hydroxylových radikálů (tvorí se \cdot DMPO-OH adukty). V ethanolových extraktech byly identifikovány jak hydroxylové radikály (\cdot DMPO-OH adukty), tak i uhlíkem centrované radikály (\cdot DMPO-CH₂-CH₂-OH adukty). Vzhledem k tomu, že ve všech extrakčních systémech byly detekovány \cdot DMPO-OH adukty, tzn. hydroxylové radikály, výsledná antioxidační aktivita byla vyjádřena jako pokles hydroxylových radikálů v systému RS (Radicals scavenged) v %. Z výsledků analýz nebyl jednoznačně potvrzen antioxidační účinek různých extraktů z léčivých rostlin proti hydroxylovým radikálům jako v případě ABTS testu. V případě vodných a ethanolových extraktů připravených ze sušených rostlin z roku 2015 docházelo k poklesu \cdot DMPO-OH aduktu v systému a projevovaly se tak očekávané antioxidační vlastnosti extraktů. Naopak u všech extraktů ze zmražených, u některých vodných a ethanolových extraktů a u všech DMSO extraktů ze sušených léčivých rostlin v mnoha případech naopak docházelo k nárůstu \cdot DMPO-OH aduktu v systému a projevovaly se spíše „prooxidační“ vlastnosti extraktů. Možným vysvětlením generování místo terminace hydroxylových radikálů je přítomnost vyšší koncentrace přechodných kovů jako je např. železo, měď a mangan a dalších prooxidantů (askorbová kyselina, karotenoidy) v extraktech, které mohly spustit další radikálové reakce. Výsledné antioxidační/prooxidační vlastnosti mohou být ovlivněny kromě obsahu kovů a dalších prooxidantů, také samotným rozpouštědlem, dále poměrem antioxidantů a prooxidantů v konkrétních systémech a může se rovněž jednat o synergické spolupůsobení všech výše zmíněných faktorů.

4.1.3 Vliv extrakčních podmínek na konkrétní fenolické sloučeniny

Zastoupení jednotlivých fenolických sloučenin u každého druhu léčivé rostliny je individuální, specifické a variabilní, naznačující druhovou různorodost léčivých rostlin. Nejvíce zastoupenými fenolickými kyselinami v jednotlivých druzích léčivých rostlin byla kyselina kávová a chlorogenová. Zastoupení ostatních fenolických kyselin (ferulová, sinapová, gallová, *p*-kumarová) bylo druhově specifické. Přítomnost a koncentrace flavonoidů byla také individuální (Tab. 3).

Tab. 3: Přehled identifikovaných fenolických sloučenin v jednotlivých druzích léčivých rostlin pomocí HPLC-DAD

levandule	měsíček	třezalka	šalvěj m.	meduňka	jestřábina	yzop	máta	šalvěj l.	ostropest.
FK	KAT	CLK	GAL	KK	GAL	KAT	CLK	KK	CLK
SK	CLK	KK	CLK	PK	CLK	CLK	KK	FK	
	KK	RUT	KK	HES	KK	KK	HES	LUT	
	RUT	KVE	LUT	KVE	RUT	FK	KVE		
	MYR				MYR				

Použité zkratky: GAL – gallová kyselina, KAT – katechin, CLK – chlorogenová kyselina, KK – kávová kyselina, PK – *p*-kumarová kyselina, FK – ferulová kyselina, SK – sinapová kyselina, RUT – rutin, MYR – myricetin, HES – hesperidin, KVE – kvercetin, LUT – luteolin

Obsah konkrétních fenolických sloučenin je výrazně ovlivňován volbou extrakčního činidla i úpravou rostlinného materiálu. Ve všeobecnosti u většiny identifikovaných sloučenin u zmražených vzorků bylo nejvhodnější použití DMSO. Koncentrace katechinu, kávové kyseliny, rutinu, myricetinu, hesperidinu, kvercetinu a luteolinu se snižovaly ve směru DMSO > 50% ethanol > voda u zmražených vzorků. Bylo zjištěno, že kyseliny gallová, chlorogenová, *p*-kumarová a sinapová se v případě zmražených vzorků lépe extrahují v protických rozpouštědlech. Koncentrace katechinu, gallové, chlorogenové, sinapové kyseliny a rutinu se snižovaly ve směru 50% ethanol > voda > DMSO u sušených vzorků. Dále bylo zjištěno, že pro extrakci kvercetinu a luteolinu se jeví vhodné použití 50% ethanolu, následovaného DMSO a až poté vodou u sušených vzorků. V případě extrakce kávové, ferulové kyseliny a myricetinu naopak bylo zjištěno, že voda se jeví velmi vhodná, následována 50% ethanolem a DMSO u sušených vzorků. V případě extrakce hesperidinu bylo zjištěno, že bez ohledu na úpravu materiálu je vhodné použití DMSO. 50% ethanol se ve všeobecnosti jevil jako vhodnější extrakční systém pro sušené léčivé rostliny (osvědčil se u 7 kvantifikovaných sloučenin z 12). Ze zjištěných výsledků je patrné, že pravděpodobně struktura fenolické sloučeniny bude mít vliv na extrakci u jednotlivých rozpouštědel.

Při porovnání zmražených a sušených léčivých rostlin, sušené vzorky jsou všeobecně charakteristické vyššími obsahy katechinu, chlorogenové, kávové, *p*-kumarové kyseliny, rutinu, hesperidinu a kvercetinu. Uvedené výsledky jsou v dobré shodě s dříve publikovanými pracemi [71, 72]. Na druhou stranu, některé fenolické sloučeniny (gallová, ferulová, sinapová kyselina, myricetin a luteolin) byly kvantifikovány ve vyšších množstvích ve zmražených léčivých rostlinách, naznačující, že tyto sloučeniny budou pravděpodobně citlivé na vyšší teploty. Z výsledků je zřejmé, že extrakční účinnost v případě sušených vzorků je vyšší.

4.1.4 Vliv extrakčních podmínek na obsah vybraných prvků

Zastoupení jednotlivých prvků u jednotlivých léčivých rostlin je individuální a jejich koncentrace je v rámci jednotlivých druhů variabilní, naznačující druhovou různorodost a schopnost jednotlivých druhů selektivně je akumulovat. V případě detailnějšího rozboru bylo zjištěno, že K, Ca, Mg, P a Na byly kvantifikovány ve vyšších množstvích ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) ve všech extraktech. Ostatní prvky Cu, Fe, Mn, Zn, Al byly zastoupeny v extraktech z léčivých rostlin v menších množstvích ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Těžké kovy potenciálně toxické pro léčivé rostliny (Cd, Pb, Co a Cr) nebyly detekovány.

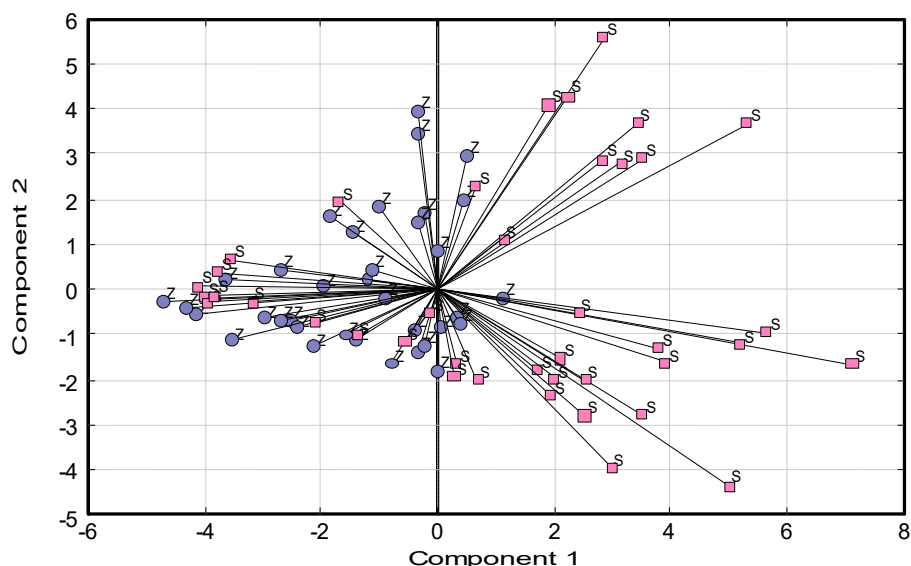
Z výsledků prvkové analýzy bylo zjištěno, že obsah konkrétních prvků je výrazně ovlivňován výběrem extrakčního činidla i úpravou rostlinného materiálu. Většina prvků se nejlépe extrahuje ve vodě. Koncentrace Ca, K, Mg, Na, P, Mn, Fe, Zn se snižovaly ve směru voda > 50% ethanol > DMSO. Bez ohledu na úpravu materiálu se jeví voda jako nejvhodnější pro extrakci makroprvků i mikroprvků, umožňuje však také extrakci některých kovů (Mn a Fe), které by mohly ovlivňovat výslednou antioxidační aktivitu extraktů.

Při porovnání obsahu individuálních prvků v rámci posklizňových úprav bylo zjištěno, že u protických systémů se lépe extrahují prvky u sušených rostlin, u DMSO byl zaznamenán opačný trend. Do jisté míry na nižší obsah u zmražených léčivých rostlin může mít vliv nižší extrakční účinnost a degradace při skladování [73]. V případě DMSO pravděpodobně vstupuje do hry charakter rozpouštědla a prostá difúze.

4.1.5 Vliv úpravy vzorku, geografie a roku produkce na všechny parametry ethanolových extraktů

Z praktických důvodů a z důvodu dalšího potenciálního využití extraktů jako přídatných látek v potravinách byl zvolen 50% ethanol jako nejvhodnější systém pro izolaci fenolických sloučenin z léčivých rostlin. V následující kapitole je posouzen vliv úpravy vzorku, lokality a roku produkce na všechny sledované parametry ethanolových extraktů s využitím multivariačních statistických metod.

Z výsledků analýzy hlavních komponent je zřejmé, že sledované parametry jsou největší mírou ovlivňovány posklizňovou úpravou vzorků. PCA diferencovala částečně vzorky do dvou skupin podle posklizňové úpravy (Obr. 3). Z výsledků PCA vyplývá, že první čtyři komponenty kumulativně vysvětlují 56 % celkové variability systému a největší váhu mají v první komponentě parametry TFC, chromatická složka b^* a chromaticita C^* . Pro konstrukci druhé komponenty měly největší váhu koncentrace rutinu a myricetinu. Pro konstrukci třetí a čtvrté komponenty byly s nejvyšší váhou využity hodnoty L^* a koncentrace kyseliny kávové. Zmíněné parametry jsou důležité pro diskriminaci ethanolových extraktů podle úpravy.



Obr. 3: Diferenciace ethanolových extraktů léčivých rostlin metodou PCA za použití všech 32 experimentálně sledovaných parametrů pro konstrukci komponent. Analýza byla uskutečněna bez ohledu na lokalitu, rok produkce a druh. Odlišné barvy vektorů odpovídají odlišným způsobům úpravy vzorků (Z – zmražené a S – sušené)

Výsledky diskriminační analýzy extraktů podle zvolených kritérií (Tab. 4) potvrzují, že u vybraných parametrů byly zaznamenány rozdíly mezi úpravami vzorků, lokalitami a roky produkce. Ve všeobecnosti sušení bylo vhodnější úpravou, vzorky ze Zahradnické fakulty měly patrně vyšší obsahy sledovaných sloučenin, pro které byl z hlediska roku produkce vhodnější rok 2015. Statistické metody potvrdily, že rozdíly jsou dostatečné pro jejich úspěšnou diferenciaci a klasifikaci.

V případě úprav a roků produkce byla zjištěna vysoká klasifikační skóre (pro diskriminaci dle úprav resp. roků byly nejdůležitější parametry b^* , C^* a $TEAC_{ABTS^{•+}}$ resp. C^* , b^* a TPC), v případě lokalit byla klasifikační skóre nižší (pro diskriminaci byly nejdůležitější b^* , C^* a BI); v rámci lokalit byly zaznamenány velké podobnosti vzhledem k tomu, že lokality byly od sebe 50 km vzdáleny, klimatické podmínky byly pravděpodobně velmi podobné.

Na základě statistického zpracování všech experimentálních dat se potvrdilo, že metody vícerozměrné statistiky mohou být efektivně využity pro diferenciaci léčivých rostlin podle zvolených kritérií, přičemž všechny stanovené parametry mají svoji váhu při diskriminaci.

Tab. 4: Klasifikační skóre ethanolových extraktů léčivých rostlin pomocí metod kanonické diskriminační analýzy a metody k-tého nejbližšího souseda pro různá klasifikační kritéria

Metoda	Klasifikační kritérium		
	Posklizňová úprava	Lokalita	Rok produkce
CDA	98,7 %	85,5 %	100 %
k-tý nejbližší soused	100 %	100 %	100 %
	89,5 %	75 %	84,2 %

4.2 APLIKACE LÉČIVÝCH ROSTLIN DO POTRAVIN

Na základě předešlých analýz bylo zjištěno, že nejvhodnější úpravou pro potravinářské účely je sušení, nejvhodnějším extrakčním systémem 50% ethanol a z jednotlivých druhů má vysoké obsahy fenolických sloučenin, vysokou antioxidační aktivitu a vhodné chuťové a aromatické vlastnosti meduňka, máta, třezalka a šalvěj.

Pro aplikaci byly proto vybrány zmíněné sušené léčivé rostliny, ale místo 50% ethanolu byl pro extrakci využit 25% ethanol, vzhledem ke konečné aplikaci do sirupů, kde je limitovaný obsah ethanolu v surovině do 5 %, resp. v ředěném nápoji 0,5 %, jako i z důvodu minimalizace manipulace se surovinou (ředění).

V rámci laboratorních testů byl testován vhodný poměr rostlinného materiálu a 25% ethanolu (1:3, 1:5, 1:6, 1:9 a 1:10). Následně byla ve zvoleném poměru ve vybraných intervalech (30 minut, 1, 2, 3, 4, 6, 8 a 12 h) testována nasákavost materiálu a dále výtěžnost při dlouhodobé extrakci (30 minut, 1, 2, 3, 4, 6, 8 a 12 h) materiálu za účelem určení vhodné extrakční doby, vše s cílem optimalizovat extrakční podmínky a získat dostatečné množství extraktů z kvalitativního i kvantitativního hlediska. V poloprovozním měřítku byla testována výtěžnost extrakce pouze po zvolenou optimální dobu extrakce. V obou případech byly pro ověření výtěžnosti extrakce zjišťovány barevné charakteristiky L*, a* a b* a radikál-zhášecí aktivita extraktů za použití ABTS⁺.

Takto vyrobené extrakty byly poté aplikovány ve zvolených poměrech pro výrobu jedno- a dvoudruhových sirupů. Sirupy a nápoje připravené po ředění koncentrátů byly testovány metodami senzorické analýzy za účelem výběru vhodné receptury, příchutě, základu pro výrobu jedno- a dvoudruhových sirupů a zhodnocení zda je nutné dvoudruhové sirupy dobarvovat.

4.3 OPTIMALIZACE EXTRAKCE A VÝROBA EXTRAKTŮ

Z testovaných poměrů byl vybrán poměr rostlinné matrice a 25% ethanolu 1:10 vzhledem k tomu, že byl získán dostatek extraktu cca 40–50 % původního objemu. Nasákavost rostlin byla u jednotlivých druhů v rozmezí 50–62 %; po 8 h se neměnila, došlo k ustanovení rovnováhy. Na základě výsledků radikál-zhášecí aktivity a barevných charakteristik, byla u jednotlivých druhů jako nejvhodnější doba extrakce zvolena 8 h. V další fázi byl celý test proveden v poloprovozním měřítku. V rámci chyby měření byly získány v laboratorních i poloprovozních

podmínkách podobné koncentrace antioxidantů a barviv. Tímto způsobem připravené extrakty byly filtrovány přes tkaninu přímo do 15 l demižonů, které byly uchovávány v chladícím boxu a následně aplikovány ve vybraných poměrech pro přípravu jedno- a dvoudruhových sirupů.

4.4 SENZORICKÁ ANALÝZA JEDNODRUHOVÝCH SIRUPŮ

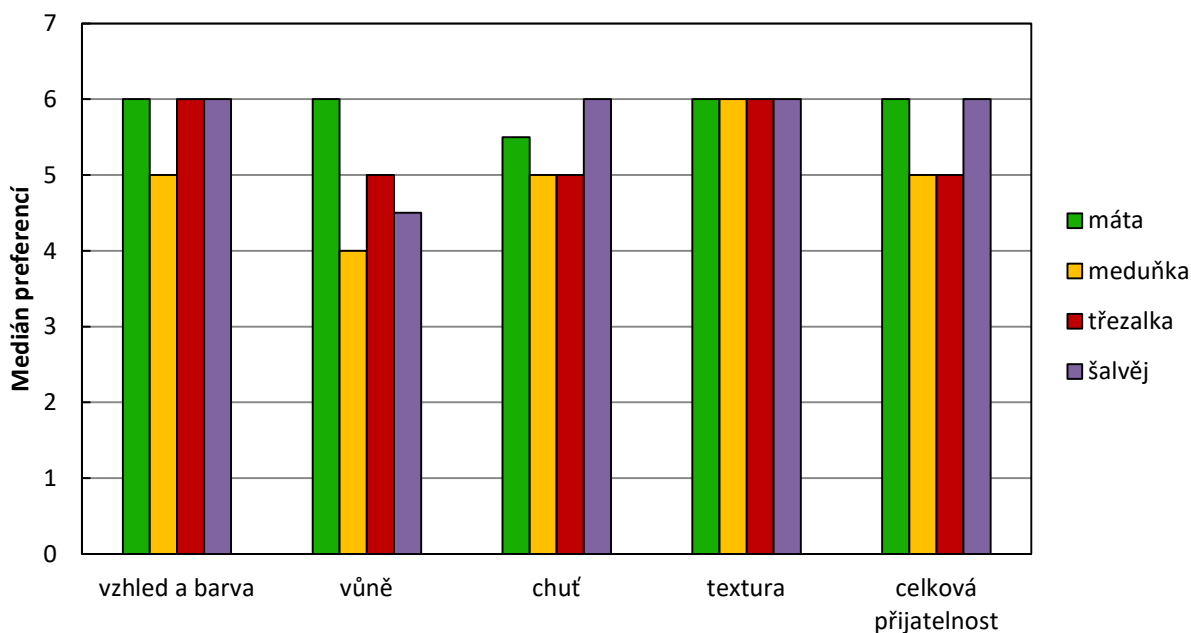
4.4.1 Výběr vhodné receptury a příchutě pomocí pořadového testu

Pořadovým testem bylo zjištěno, že v případě máty a šalvěje je optimální (tj. nejchutnější) střední, u třezalky nejkoncentrovanější a u meduňky nejméně koncentrovaná varianta. Vybrané receptury byly v dalším kole předloženy hodnotitelům za účelem výběru nejchutnější/nejpříjemnější příchuti. Pořadovým testem bylo zjištěno, že mátový nápoj byl označen jako nejchutnější ($P < 0,05$) naopak třezalkový jako nejméně chutný. Na základě pořadového testu lze označit za nejchutnější příchut' mátovou.

4.4.2 Hodnocení jednodruhových sirupů pomocí stupnic hedonického typu

Pro lepší charakterizaci sensorické kvality byly u výše zmíněných vzorků jednodruhových sirupů následně hodnoceny vybrané sensorické vlastnosti (vzhled a barva, vůně, chuť, textura a celková přijatelnost) pomocí sedmibodové kategorové ordinální stupnice hédonického typu (1 nepřijatelná \Rightarrow 7 vynikající).

Textura (Obr. 4) všech vzorků byla hodnocena jako výborná, sirupové základy byly po technologické stránce správně vyrobeny. Ostatní sensorické vlastnosti sirupů však ovlivňuje přidaný extrakt. Z hlediska chutě a celkové přijatelnosti byl nejlépe hodnocen šalvějový sirup (jako výborný) a totožně mátový sirup. Na základě předešlých sensorických zkoušek a konečného hodnocení expertů byl jako nejvhodnější základ pro dvoudruhové sirupy vybrán sirup šalvějový. Výsledky této zkoušky jsou v souladu s předchozí zkouškou pořadovou, kdy byl jako nejlepší/nejpříjemnější označen mátový sirup, který by mohl být průmyslově vyráběn.

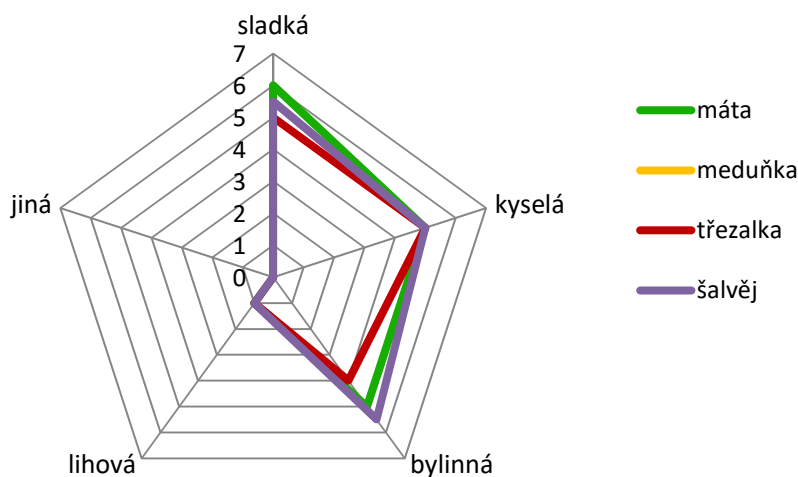


Obr. 4: Hodnocení jednodruhových sirupů pomocí kategorové ordinální stupnice hedonického typu (1 nepřijatelná \Rightarrow 7 vynikající). Výsledky jsou prezentovány jako medián (počet hodnotitelů $n = 40$)

4.4.3 Profilový test chuti

Pro podrobnější popis chutě a vůně sirupů byla hodnocena intenzita vybraných deskriptorů pomocí profilového testu (použitá intenzitní stupnice 1 neznatelná \Rightarrow 7 velmi silná).

K celkovému profilu chutě sirupů (Obr. 5) nejvíce přispívá sladká, kyselá a bylinná chuť, intenzita lihové a případně jiné příchutě byla většinou hodnocena jako velmi slabá až neznatelná. Bylinná chuť byla významně výrazněji identifikována u mátového a šalvějového sirupu. Z hlediska sladké a kyselé chuti mezi vzorky nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Z výsledků sensorického profilu vůně sirupů (data nejsou prezentována) bylo zjištěno, že vůně sirupů je ovlivněna hlavně bylinnou složkou, lihová a případně jiná vůně byly vnímány v zanedbatelné intenzitě, ethanol tedy nemá výrazný vliv na chuť ani vůni sirupu. Při porovnání jednotlivých vzorků se mátový sirup statisticky významně odlišuje od ostatních svou výraznou bylinnou vůní ($P < 0,05$).



Obr 5: Profilový test znázorňující zastoupení vybraných deskriptorů chuti pro jednodruhové sirupy z máty, meduňky, třezalky a šalvěje. Výsledky jsou prezentovány jako medián (počet hodnotitelů $n = 40$)

4.5 SENZORICKÁ ANALÝZA DVOUDRUHOVÝCH SIRUPŮ

4.5.1 Výběr vhodné receptury a příchutě pomocí pořadového testu

Pořadovým testem bylo zjištěno, že v případě kombinace šalvěj-máta je nejvhodnější/nejchutnější poměr s méně převládající šalvějovou příchutí, u kombinace šalvěj-meduňka a šalvěj-třezalka naopak poměr s převahou šalvějové příchuti. Vybrané receptury byly dále testovány za účelem výběru nejlepší příchuti z hlediska chutnosti/celkové přijatelnosti. Pořadovým testem bylo zjištěno, že šalvějovo-mátový sirup, respektive nápoj z něj připravený byl nejchutnější, naopak šalvějovo-třezalkový byl u hodnotitelů nejméně preferován. Na základě pořadového testu lze označit za nejchutnější příchut' šalvějovo-mátovou.

4.5.2 Párová porovnávací zkouška dvoudruhových sirupů bez a s přidavkem aróniového koncentrátu

V poslední fázi bylo testováno, zda by hodnotitelé lépe hodnotili nápoj obarvený vhodným barvivem. Za tímto účelem byly sirupové základy dobarvovány koncentrátem z aronie (koncentrace v sirupu 0,5 %). Zajímala nás preference z hlediska barvy, ale také chuti, protože barva může významným způsobem ovlivňovat i vnímání chuti. Z výsledků párové porovnávací zkoušky (Tab. 5) je zřejmé, že hodnotitelé preferují nedobarvovanou variantu jak z hlediska barvy, tak i chutě.

Dle závěrečného dotazníku by si některý z testovaných sirupů (nápojů z nich připravených) koupilo 39 z 40 dotazovaných. Konkrétně se jednalo o sirup mátový, šalvějovo-mátový nebo šalvějovo-meduňkový, cena kterou byli ochotni zaplatit se pohybovala od 30 do 100 Kč za 500 ml sirupu.

Tab. 5: Párové porovnávání barvy a chuti dvoudruhových nápojů bez a s přidávkem aróniového koncentrátu

kombinace	barva*		chuť**	
	bez koncentrátu	s koncentrátem	bez koncentrátu	s koncentrátem
šalvěj-máta	32	8	29	11
šalvěj-meduňka	30	10	22	18
šalvej-třezalka	22	18	26	14

*hodnoty v tabulce uvádí počet kladných odpovědí pro jednotlivé varianty nápoje

5 ZÁVĚRY

Předložená práce je studií zaměřenou na komplexní charakterizaci extraktů z léčivých rostlin pomocí spektroskopických a chromatografických technik s důrazem na vliv rozpouštědla, posklizňové úpravy vzorku, lokality a roku produkce na vybrané parametry a jejich následné aplikace do sirupů. Tematicky je práce rozdělena do dvou částí. První část je zaměřena na charakterizaci extraktů z léčivých rostlin a druhá část na aplikaci vybraných extraktů do sirupů.

V první části práce pomocí kombinace metod EPR, UV-VIS spektroskopie, HPLC a ICP-OES byly charakterizovány extrakty z 10 vybraných druhů léčivých rostlin, které byly sbírány ze dvou různých lokalit, v průběhu dvou let (2015, 2016) a posklizňově upravovány dvěma způsoby (zmražení a sušení). Celkově bylo sledováno 39 parametrů – 32 charakteristických pro vzorky léčivých rostlin: konkrétně obsah fenolických sloučenin (TPC, TFC, 12 konkrétních fenolických sloučenin), barevných charakteristik (L^* , a^* , b^* , C^* , h° , BI), antioxidačních vlastností ($TEAC_{ABTS^{++}}$, RS%) a obsah 10 minerálních látek (Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Zn). Léčivé rostliny byly extrahovány dynamickou extrakcí třemi různými rozpouštědly (deionizovaná voda, 50% ethanol a DMSO).

Z provedené komplexní charakterizace léčivých rostlin vyplývají následující závěry:

- Sledované parametry jsou různou mírou ovlivňovány použitým extrakčním systémem, posklizňovou úpravou vzorků, rokem produkce, původem vzorků (lokalitou) i druhovou skladbou.
- Druh extrakčního činidla výrazně ovlivňuje složení extraktů, včetně koncentrace fenolických látek, flavonoidů, barviv, látek s antioxidačním účinkem i zastoupení jednotlivých minerálních látek.
- Za nejvhodnější extrakční systém pro zmražené vzorky z hlediska výtěžnosti fenolických látek, flavonoidů a antioxidantů lze označit DMSO.
- Za nejvhodnější extrakční systém pro sušené vzorky z hlediska výtěžnosti fenolických látek, flavonoidů a antioxidantů lze označit 50% ethanol.
- Z potravinářského hlediska je pro extrakci fenolických sloučenin a antioxidantů vhodnější použití 50% ethanolu, vzhledem k dráždivosti a hygroskopičnosti DMSO.

- Vhodnější úpravou léčivých rostlin v případě protických systémů (voda, 50% ethanol) je sušení, naopak u aprotického rozpouštědla DMSO zmrazování, která poskytuje vyšší obsahy fenolických sloučenin, flavonoidů, barviv, látek s antioxidačním účinkem a minerálních látek.
- Pro aplikaci do potravin byla vybrána úprava sušením a 50% ethanol vzhledem k vyššímu obsahu fenolických sloučenin a vzhledem ke vhodnosti při dlouhodobějším skladování.
- Co se týká zhodnocení nejlepších vzorků z hlediska obsahu fenolických sloučenin a antioxidačních vlastností není možné výsledky generalizovat, protože každý vzorek je ve všeobecnosti biologický systém a má různou odezvu na podmínky oxidačního stresu. Významným parametrem je redoxní potenciál složek, jejich vzájemné koncentrační poměry a možné synergické či antagonické působení. Z hlediska obsahu fenolických sloučenin, flavonoidů a radikál-zhášecí aktivity stanovené pomocí ABTS^{•+} se výborným zdrojem těchto sloučenin zdají být léčivé rostliny z čeledi Lamiaceae (máta peprná, meduňka lékařská, šalvěj muškátová, šalvěj lékařská, yzop lékařský) a z čeledi Hypericeae (třezalka tečkovaná).
- Ve všech testovaných extraktech byla potvrzena schopnost zhášet kation radikál ABTS^{•+}, schopnost extraktů terminovat hydroxylové radikály nebyla jednoznačně potvrzena vzhledem k ovlivnění měření pravděpodobně významným zdrojem prooxidantů v extraktech (přechodné kovy, kyselina askorbová, karotenoidy aj.).
- I když výsledky jednotlivých spektroskopických a chromatografických analýz odhalily značnou variabilitu a nejednoznačné rozdíly, multivariační statistické metody umožnily úspěšnou diferenciaci a klasifikaci vzorků léčivých rostlin podle posklizňové úpravy, roku produkce a v menší míře i dle lokalit, kde bylo nejvíce podobností, vzhledem k tomu, že lokality byly vzdáleny 50 km, klimatické podmínky byly velmi podobné.

Na základě výsledků komplexní charakterizace léčivých rostlin lze konstatovat, že kombinaci UV-VIS, EPR spektroskopie, HPLC a ICP-OES s využitím metod multivariační statistické analýzy je možné efektivně využít pro rozlišení vzorků léčivých rostlin podle zvolených kritérií.

Druhou částí práce byla aplikace vybraných extraktů léčivých rostlin do sirupů. Na základě analýz a také dostupnosti léčivých rostlin od dodavatele (*Calendula a.s.*) byly vybrány výše zmíněné rostliny: meduňka, máta, třezalka a šalvěj a 25% ethanol místo 50% ethanolu. (vzhledem k limitaci ethanolu v surovině a minimalizaci manipulace se surovinou). Vyroběné receptury jedno- a dvoudruhových sirupů a nápoje z nich připravené ředěním byly testovány metodami senzorické analýzy.

Společné závěry této části práce jsou shrnuty v následujícím přehledu:

- Byl optimalizován proces extrakce – poměr léčivé rostliny:rozpouštědla 1:10, doba extrakce 8 h, při níž nasákavost bylin byla 50–62 %.
- Byla optimalizována receptura jednodruhových sirupů – u máty a šalvěje byla vybrána střední koncentrace, u třezalky nejkonzentrovanejší a u meduňky nejméně koncentrovaná varianta.
- Mátový sirup byl vyhodnocen jako nejchutnější a nejpříjemnější jednodruhový sirup.
- Šalvějový sirup byl vybrán jako základ pro dvoudruhové sirupy.
- Byla optimalizována receptura dvoudruhových sirupů – v případě kombinace šalvěj-máta je nejchutnější poměr s méně převládající šalvějovou příchutí, u kombinace šalvěj-meduňka a šalvěj-třezalka naopak poměr s převahou šalvějové příchuti.
- Šalvějovo-mátový sirup byl nejchutnější a nejpříjemnější dvoudruhový sirup.
- Bylo zjištěno, že dvoudruhové sirupy není nutno dobarvovat.

Na základě senzorické analýzy bylo prokázáno, že mátový a šalvějovo-mátový sirup by bylo možné po dalším testování uvést do výroby a obohatit tak trh s potravinami.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] PATEL, P., N. M. PATEL a P. M. PATEL. WHO guidelines on quality control of herbal medicines. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*. 2011, **2**(4), pp. 1-106.
- [2] *Situační a výhledová zpráva: Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny* [online]. Ministerstvo zemědělství, 2014 [cit. 2017-07-16]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/403652/SVZ_LAKR_12_2014.pdf
- [3] *WHO guidelines on good agricultural and collection practices [GACP] for medicinal plants* [online]. World Health Organization, 2003 [cit. 2017-07-16]. Dostupné z: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42783/1/9241546271.pdf>
- [4] SILVA JUNIOR, J. O. C., R. M. R. COSTA, F. M. TEIXEIRA a W. L. R. BARBAROSA. Processing and Quality Control of Herbal Drugs and Their Derivatives. Y. Shoyama. *Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas*. 1st ed. Rijeka: InTech, 2011, p. 196-205. ISBN 978-953-307-682-9.
- [5] GHISLENI, D. D. M., M. S. BRAGA, I. S. KIKICHI, M. BRASOVEANU, M. R. NEMTANU, K. DUA a T. J. A. PINTO. The Microbial Quality Aspects and Decontamination Approaches for the Herbal Medicinal Plants and Products: An in-Depth Review. *Current Pharmaceutical Design*. 2016, **22**(1), pp. 4264-4287.
- [6] SAXENA, M., J. SAXENA, R. NEMA, D. SINGH a A. GUPTA. Phytochemistry of Medicinal Plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013, **1**(6), pp. 169-182.
- [7] KUSUMA, I. W., MURDIYANTO, E. T. ARUNG, SYAFRIZAL a Y. KIM. Antimicrobial and antioxidant properties of medicinal plants used by the Bentian tribe from Indonesia. *Food Science and Human Wellness*. 2014, **3**(3-4), pp. 191-196.
- [8] DHAMA, K., R. TIWARI, S. CHAKRABORTY, M. SAMINATHAN, A. KUMAR, K. KARTHIK, M. Y. WANI, AMARPAL, S. VIR SINGH a A. RAHAL. Evidence Based Antibacterial Potentials of Medicinal Plants and Herbs Countering Bacterial Pathogens Especially in the Era of Emerging Drug Resistance: An Integrated Update. *International Journal of Pharmacology*. 2014, **10**(1), pp. 1-43.
- [9] ABBAS, Z. K., S. SAGGU, M. I. SAKERAN, N. ZIDAN, H. REHMAN a A. A. ANSARI. Phytochemical, antioxidant and mineral composition of hydroalcoholic extract of chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2015, **22**(3), pp. 322-326.
- [10] OLIVEIRA, A. I., C. PINHO, B. SARMENTO a A. C. DIAS. Neuroprotective Activity of *Hypericum perforatum* and Its Major Components. *Frontiers in plant science*. 2016, **7**(1004), pp. 1-15.
- [11] YADIKAR, N., K. M. BOBAKULOV, K. A. ESHBAKOVA a H. A. AISA. Phenolic compounds from *Lavandula angustifolia*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2017, **53**(3), pp. 262-264.
- [12] ADASZYŃSKA-SKWIRZYŃSKA, M. a M. DZIĘCIOŁ. Comparison of phenolic acids and flavonoids contents in various cultivars and parts of common lavender (*Lavandula angustifolia*) derived from Poland. *Natural Product Research*. 2017, **27**(1), pp. 1-6.
- [13] PRUSINOWSKA, R. a K. B. ŚMIGIELSKI. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L). A review. *Herba Polonica*. 2014, **60**(2), pp. 56-66.
- [14] OLENNIKOV, D. N. a N. I. KASHCHENKO. Componential Profile and Amylase Inhibiting Activity of Phenolic Compounds from *Calendula officinalis* L. Leaves. *The Scientific World Journal*. 2014, **2014**(1), pp. 1-9.

- [15] OLENNIKOV, D. N. a N. I. KASHCHENKO. New Isorhamnetin Glycosides and other Phenolic Compounds from *Calendula officinalis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2013, **49**(5), pp. 833-840.
- [16] MIGUEL, M., L. BARROS, C. PEREIRA, R. C. CALHELHA, P. A. GARCIA, M. CASTRO, C. SANTOS-BUELGA a I. C. FERREIRA. Chemical characterization and bioactive properties of two aromatic plants: *Calendula officinalis* L. (flowers) and *Mentha cervina* L. (leaves). *Food and Function*. 2016, **7**(5), pp. 2223-2232.
- [17] GOGOASA, I., J. VIOLETA, L. M. ALDA, A. VELCIOV, M. RADA, S. ALDA, C. SIRBULESCU, D. M. BORDEAN a I. GERGEN. Mineral Content of Some Medicinal Herbs. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*. 2013, **17**(4), pp. 65-67.
- [18] KOYU, H. a M. Z. HAZNEDAROGLU. Investigation of impact of storage conditions on *Hypericum perforatum* L. dried total extract. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2015, **23**(3), pp. 545-551.
- [19] ORČIĆ, D. Z., N. M. MIMICA-DUKIĆ, M. M. FRANCIŠKOVIĆ, S. S. PETROVIĆ a E. D. JOVIN. Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. *Chemistry Central Journal*. 2011, **5**(1), pp. 34-42.
- [20] SHRIVASTAVA, M. a L. K. DWIVEDI. Therapeutic potential of *Hypericum perforatum*: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2015, **6**(12), pp. 4982-4988.
- [21] PAVLOVA, D. K., I. KARADJOVA a I. KRASTEVA. Essential and toxic element concentrations in *Hypericum perforatum*. *Australian Journal of Botany*. 2015, **63**(2), pp. 1-6.
- [22] ŠULNIŪTĖ, V., A. PUKALSKAS a P. R. VENSKUTONIS. Phytochemical composition of fractions isolated from ten *Salvia* species by supercritical carbon dioxide and pressurized liquid extraction methods. *Food Chemistry*. 2016, **224**(1), pp. 37-47.
- [23] JASSBI, A. R., S. ZARE, O. FIRUZI a J. XIAO. Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species. *Phytochemistry Reviews*. 2016, **15**(5), pp. 829-867.
- [24] SZENTMIHÁLYI, K. a M. T. CSEDÓ. Comparative study on tannins, flavonoids, terpenes and mineral elements of some *Salvia* species. In: *XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants*. Toronto: Acta Horticulturae, 2004. p. 463-470. ISBN 978-90-66055-07-0.
- [25] MIRAJ, S., RAFIEIAN-KOPAEI a S. KIANI. Melissa officinalis L: A Review Study With an Antioxidant Prospective. *Journal of Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*. 2016, **22**(3), pp. 385-394.
- [26] MIRAJ, S., N. AZIZI a S. KIANI. A review of chemical components and pharmacological effects of *Melissa officinalis* L. *Der Pharmacia Lettre*. 2016, **8**(6), pp. 229-237.
- [27] PYTLAKOWSKA, A. KITA, P. JANOSKA, M. POŁOWNIAKA a V. KOZIK. Multi-element analysis of mineral and trace elements in medicinal herbs and their infusions. *Food Chemistry*. 2012, **135**(2), pp. 494-501.
- [28] RIACHI, L. G. a C. DE MARIA. Peppermint antioxidants revisited. *Food Chemistry*. 2015, **176**(1), pp. 72-81.
- [29] SINGH, R., M. A. M. SHISHNI a A. BELKHEIR. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015, **8**(3), pp. 322-328.
- [30] URIBE, E., D. MARÍN, A. VEGA-GALVÉZ, I. QUISPE-FUENTES a A. RODRÍGUEZ. Assessment of vacuum-dried peppermint (*Mentha piperita* L.) as a source of natural antioxidants. *Food Chemistry*. 2016, **190**(1), pp. 559-565.
- [31] GRDIŠA, M., M. JUG-DUJAKOVIĆ, M. LONČARIĆ, I. RADOSAVLJEVIĆ, K. CAROVIĆ-STANKO, T. NINČEVIĆ, Z. LIBER a Z. ŠATOVIĆ. Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): A review of biochemical contents, medical properties and genetic diversity. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2015, **80**(2), pp. 69-78.

- [32] PAVLIĆ, B., S. VIDOVIĆ, J. VLADIĆ, R. RADOSAVLJEVIĆ, M. CINDRIĆ a Z. ZEKOVIĆ. Subcritical water extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by-products—Process optimization by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2016, **116**(1), pp. 36-45.
- [33] GHORBANI, A. a M. ESMAEILIZADEH. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2017, **7**(4), pp. 433-440.
- [34] CINDRIĆ, I. J., M. ZEINER, E. GLAMUZINA a G. STINGEDER. Elemental characterisation of the medical herbs *Salvia officinalis* L. and *Teucrium montanum* L. grown in Croatia. *Microchemical Journal*. 2013, **107**(1), pp. 185-189.
- [35] FATHIAZAD, F. a S. HAMEDEYAZDAN. A review on *Hyssopus officinalis* L.: Composition and biological activities. *African Journal of Microbiology Research*. 2011, **5**(17), pp. 1959-1966.
- [36] VLASE, L., D. BENEDEC, D. HANGANU, G. DAMIAN, I. CSILLAG, B. SEVASTRE, A. C. MOT, R. SILAQHI-DUMITRESCU a I. TILEA. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules*. 2014, **19**(5), pp. 5490-5507.
- [37] SAID-AL AHL, H. A. H., Z. K. ABBAS, A. S. SABRA a K. G. TKACHENKO. Essential Oil Composition of *Hyssopus officinalis* L. Cultivated in Egypt. *International Journal of Plant Science and Ecology*. 2015, **1**(2), pp. 49-53.
- [38] BŁAŻEWICZ, A., T. BAJ, R. ŚWIEBODA a Ł. ŚWIĄTEK. Determination of Heavy Metals in Aerial Part of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) Using High Performance Ion Chromatography with the Aid of a Linear and Non-Linear Weighted Least-Squares Regression Model. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2007, **16**(2), pp. 191-198.
- [39] KHODADADI, S. Administration of *Galega officinalis* in experimental and clinical investigations; a narrative review. *Annals of Research in Antioxidants*. 2016, **1**(1), pp. 1-4.
- [40] KAHKESHANI, N., A. HADJIAKHOONDI, N. MAAFI a M. KHANAVI. Standardization of a galactogogue herbal mixture based on its total phenol and flavonol contents and antioxidant activity. *Research Journal of Pharmacognosy*. 2015, **2**(1), pp. 35-39.
- [41] BELEŽENTIENĖ, L. a S. MIKULIONIENĖ. Chemical composition of galega mixtures silages. *Agronomy Research*. 2006, **4**(2), pp. 483-492.
- [42] GRAF, T. N., N. B. CECH, S. J. POLYAK a N. H. OBERLIES. A validated UHPLC-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of flavonolignans in milk thistle (*Silybum marianum*) extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, **126**(1), pp. 26-33.
- [43] PEREIRA, C., L. BARROS, A. M. CARVALHO, C. SANTOS-BUELGA a I. C. FERREIRA. Infusions of artichoke and milk thistle represent a good source of phenolic acids and flavonoids. *Food & Function*. 2015, **6**(1), pp. 56-62.
- [44] IONESCU, D., M. POPESCU, G. D. RIZEA a F. MIHALCEA. Polyphenols and Minerals, Antioxidants in the Plants Used in the Natural Treatment of Hepatobiliary Disorders. *Revista de Chimie*. 2014, **65**(5), pp. 507-511.
- [45] YERENOVA, B. Y., Y. PRONINA a E. B. MEDVEDKOV. Production of melon-based juices with enriching herbal supplements. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2016, **22**(5), pp. 840-848.
- [46] TKACHENKO, A. a I. PAKHOMOVA. Consumer properties improvement of sugar cookies with fillings with non-traditional raw materials with high biological value. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2016, **3**(11), pp. 54-61.

- [47] ASGARPANA, J. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Hypericum perforatum* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012, **6**(12), pp. 1387-1394.
- [48] *Opinion of the Scientific Committee on Food on the presence of hypericin and extracts of Hypericum sp. in flavourings and other food ingredients with flavouring properties* [online]. Scientific Committee on Food, 2002 [cit. 2017-07-24]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out113_en.pdf
- [49] KAUR, T., H. A. BHAT, R. BHAT, A. KUMAR, K. BINDU, S. KOUL a D. VYAS. Physio-chemical and antioxidant profiling of *Salvia sclarea* L. at different climates in north-western Himalayas. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015, **37**(13), pp. 1-10.
- [50] CAROCHO M., J. C. BARREIRA, A. BENTO, V. FERNANDEZ-RUIZ, P. MORALES a I. C. FERREIRA. Chestnut and lemon balm based ingredients as natural preserving agents of the nutritional profile in matured "Serra da Estrela" cheese. *Food Chemistry*. 2016, **204**(1), pp. 185-193.
- [51] *Informační centrum bezpečnosti potravin: Přírodní konzervační látky* [online]. Ministerstvo zemědělství, 2006 [cit. 2017-07-24]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/prirodni-konzervacni-latky.aspx>
- [52] LUPINSKAYA, S. M. Technological features of the use of wild-growing raw materials in the production of sour-milk beverages. *Foods and Raw Materials*. 2014, **2**(2), pp. 32-39.
- [53] DYAB, A. S., A. M. ALI a H. I. MATUK. Enhancement and Evaluation of Peppermint (*Mentha Piperita* L.) Beverage. *International Journal of Life Sciences Research*. 2015, **3**(1), pp. 175-185.
- [54] ASEFI, N. Stabilization of sunflower oil by pennyroyal (*Mentha piperita*) extracts during accelerated storage. *International Journal of Food Properties*. 2017, **20**(1), pp. 30-40.
- [55] MIRODDI, M., M. NAVARRA a M. C. QUATTROPANI. Systematic Review of Clinical Trials Assessing Pharmacological Properties of *Salvia* Species on Memory, Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *CNS Neuroscience*. 2014, **20**(6), pp. 485-495.
- [56] ORAON, A., J. ATANU, P. S. PRAJAPATI a P. SUVERA. Application of Herbs in Functional Dairy Products – A Review. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*. 2017, **5**(3), pp. 1-7.
- [57] JAHANTIGH, O., F. NAJAFI, H. NAGHDI BADI, R. A. KHAVARI-NEJAD a F. SANJARIAN. Essential oil composition of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) under salt stress at flowering stage. *Journal of Essential Oil Research*. 2016, **27**(5), pp. 458-464.
- [58] AL-WABEL, N. A., H. M. MOUSA, O. H. OMER a A. M. ABDEL-SALAM. Biological Evaluation of Aqueous Herbal Extracts and Stirred Yoghurt Filtrate Mixture Against Alloxan-Induced Oxidative Stress and Diabetes in Rats. *International Journal of Pharmacology*. 2008, **4**(2), pp. 135-139.
- [59] JUODEIKIENE, G., D. CIZEIKIENE, V. CESKEVICIUTE, D. VIDMANTIENE, L. BASINSKIENE, E. AKUNECA, M. STANKEVICIUS, A. MARUSKA, E. BARTKIENE, O. RAGAZINSKIENE a A. PETRAUSKAS. Solid-State Fermentation of *Silybum marianum* L. Seeds Used as Additive to Increase the Nutritional Value of Wheat Bread. *Food Technology and Biotechnology*. 2013, **51**(4), pp. 528-538.
- [60] ZHU, S., Y. DONG, J. TU, Y. ZHOU a C. DA. Amino acid composition and in vitro digestibility of protein isolates from *Silybum marianum*. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 2013, **11**(1), pp. 136-140.
- [61] ČSN EN ISO 5495. *Senzorická analýza - Metodologie - Párová porovnávací zkouška*. Praha: Český normalizační institut, 2008, 24 s.
- [62] OTERO-PAREJA, M., L. CASAS, M. FERNÁNDEZ-PONCE, C. MANTELL a E. J. MARTÍNEZ DE LA OSSA. Green extraction of antioxidants from different varieties of red grape pomace. *Molecules*. 2015, **20**(6), pp. 9686-9702.

- [63] BUTOROVÁ, L., E. VÍTOVÁ a M. POLOVKA. Monitoring of selected parameters in *Amelanchier alnifolia* extracts by UV-VIS- NIR and EPR spectroscopy. In: *CECE 2014 11th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*. Brno: Institute of Analytical Chemistry of the CAS, 2014. p. 137-140. ISBN 978-80-904959-2- 0.
- [64] BUTOROVÁ, L. *Charakterizace plodů aronie (Aronia melanocarpa) a muchovníku (Amelanchier Alnifolia)*. Brno, 2014, 105 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [65] KASPARAVIČIENĚ, G., J. JURGELEVIĆ, Z. KALVĚNIENĚ, S. VELŽIENĚ, A. SAVICKAS a D. KAZLAUSKIENĚ. Evaluation of extraction factors influence on total phenolic content and antioxidant activity of *Melissa officinalis* L. leaves extracts. *Chemija*. 2016, **28**(1), pp. 58-63.
- [66] DENT, M., V. DRAGOVIĆ-UZELAC, M. PENIĆ, M. BRNČIĆ, T. BOSILKJOV a B. LEVAJ. The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technology and Biotechnology*. 2013, **51**(1), pp. 84-91.
- [67] ŠTAVÍKOVÁ, L. *Charakterizace vlastností extraktů z hroznových bobulí pomocí moderních analytických metod*. Brno, 2010, 108 s. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [68] SEMENOV, G. V., I. S. KRASNOVA, O. A. SUVOROV, I. D. SHUVALOVA a N. D. POSOKHOV. Influence of freezing and drying on phytochemical properties of various fruit. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 2015, **12**(2), pp. 1311-1320.
- [69] KRISHNAN, V., S. AHMAD a M. MAHMOOD. Antioxidant Potential in Different Parts and Callus of *Gynura procumbens* and Different Parts of *Gynura bicolor*. *BioMed Research International*. 2015, **2015**(1), pp. 1-7.
- [70] KOWALCZYK, D., M. ŚWIECA, J. CICHOCKA a U. GAWLIK-DZIKI. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. *Journal of The Institute of Brewing*. 2013, **119**(3), pp. 103-110.
- [71] KOUŘIMSKÁ, L., K. EŠLEROVÁ a Y. KHATRI. The effect of storage on quality of herbs genus *Origanum*. *Potravinářstvo*. 2016, **10**(1), pp. 207-214.
- [72] ADÁMKOVÁ, A., L. KOUŘIMSKÁ a B. KADLECOVÁ. The effect of drying on antioxidant activity of selected Lamiaceae herbs. *Potravinářstvo*. 2015, **9**(1), pp. 252-257.
- [73] MUSA, A. a E. O. OGBADOYI. Effect of Cold Storage on the Concentrations of some Nutrients, Anti-nutrients and Toxic Substances in the Leaves of *Vernonia amygdalina* (Bitter leaf). *Advances in Research*. 2014, **2**(1), pp. 24-39.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS/ABTS ⁺	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonové kyseliny/ kation radikál 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonové kyseliny)
ANOVA	Analysis of variance
BI	Browning index
CDA	Canonical Discriminant Analysis
CO	Calendula officinalis, měsíček lékařský
DMPO	5,5,-dimethylpyrroline N-oxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ETOH	Ethanol
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
GAE	Gallic Acid Equivalent
GO	Galega officinalis, jestřabina lékařská
HO	Hyssopus officinalis, yzop lékařský
HP	Hypericum perforatum, třezalka tečkovaná
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography Diode Array Detector
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
LA	Lavandula angustifolia, levandule lékařská
LAKR	Léčivé aromatické a kořeninové rostliny
MO	Melissa officinalis, meduňka lékařská
MP	Mentha piperita, máta lékařská
MU	Centrum léčivých rostlin Masarykovy univerzity
PCA	Principal Component Analysis
RE	Rutin Equivalent
RS%	% Radicals Scavenged
S	sušené
SM	Silybum marianum, ostropestřec mariánský
SO	Salvia officinalis, šalvěj lékařská
SS	Salvia sclarea, šalvěj muškátová
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Activity
TFC	Total Flavonoid Content
TPC	Total Phenolic Content
UV-VIS	UltraViolet-Visible Spectroscopy
Z	zmražené
ZU	Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně

8 ŽIVOTOPIS AUTORKY

Osobní údaje

Jméno a příjmení: Lenka Burdějová
Adresa: Školní 564, Slavičín, 763 21
Datum a místo narození: 10. říjen 1988, Zlín

Vzdělání

2014 – současnost Fakulta chemická VUT v Brně
obor Potravinářská chemie a biotechnologie
doktorské studium

2012 – 2014 Fakulta chemická VUT v Brně
obor Potravinářská chemie a biotechnologie
magisterské studium ukončeno státní zkouškou

2009 – 2012 Fakulta chemická VUT v Brně
obor Potravinářská chemie a biotechnologie
bakalářské studium ukončeno státní zkouškou

2004 – 2008 Gymnázium Jana Pivečky, Školní 822, Slavičín
ukončeno maturitní zkouškou

Odborné stáže

02/2015 – 12/2017 Národní polnohospodářské centrum, Výzkumný ústav potravinářský
Bratislava, Biocentrum Modra, Slovensko
Charakterizace různých extraktů z léčivých rostlin pomocí EPR,
HPLC, UV-VIS-NIR, statistické zhodnocení výsledků, optimalizace
receptury pro výrobu jedno-druhových a dvou-druhových sirupů
z léčivých rostlin

01/2017 – 05/2017 Univerzita v Huelvě, Fakulta experimentálních věd
Huelva, Španělsko
Sledování vlivu geografie na metabolický profil léčivých rostlin
s využitím GC-MS a Q-TOF-MS/MS, optimalizace extrakce pro Q-
TOF-MS/MS analýzu

Výuka

2014/2015, 2015/2016, 2016/2017 zimní semestr výuka Praktika z instrumentální analýzy

Ocenění

3. místo v sekci Food Technology na mezinárodní PhD. konferenci MendelNet 2017 Mendelovy
Univerzity v Brně, 4. místo v sekci Aplikovaná biologie a technologie na mezinárodní konferenci
Aplikované přírodní vědy 2014 Univerzity sv. Cyrila a Metoděje v Trnavě

9 PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORKY

Publikace v impaktovaných časopisech

1. **BUTOROVÁ, L.**; POLOVKA, M.; POŘÍZKA, J.; VÍTOVÁ, E. Multi-experimental characterization of selected medical plants growing in the Czech Republic. *Chemical Papers*, 2017, roč. 12, č. 103, s. 1-17. ISSN: 1336-9075.
2. VÍTOVÁ, E.; SŮKALOVÁ, K.; MAHDALOVÁ, M.; **BUTOROVÁ, L.**; MATĚJÍČEK, A.; KAPLAN, J. Influence of volatile compounds on flavour of selected cultivars of gooseberry. *Chemical Papers*, 2017, roč. 71, č. 10, s. 1895-1908. ISSN: 0366-6352.
3. **BUTOROVÁ, L.**; VÍTOVÁ, E.; POLOVKA, M. Comparison of volatiles identified in *Aronia melanocarpa* and *Amelanchier alnifolia* using solid-phase microextraction, coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2016, roč. 55, č. 1, s. 57-68. ISSN: 1336-8672.
4. VÍTOVÁ, E.; SŮKALOVÁ, K.; MAHDALOVÁ, M.; **BUTOROVÁ, L.**; MELIKANTOVÁ, M. Comparison of selected aroma compounds in cultivars of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Chemical Papers*, 2015, roč. 69, č. 6, s. 881-888. ISSN: 0366-6352.

Publikace v recenzovaných časopisech

1. **BUTOROVÁ, L.**; POLOVKA, M.; TOBOLKOVÁ, B.; VÍTOVÁ, E. Assessment of antioxidant properties of different types of herbs by EPR and UV-VIS spectroscopy. *Czech Chemical Society Symposium Series*, 2015, roč. 13, č. 2, s. 56-58. ISSN: 2336-7210.
2. VÍTOVÁ, E.; SŮKALOVÁ, K.; MAHDALOVÁ, M.; **BUTOROVÁ, L.**; BABÁK, L.; MATĚJÍČEK, A. Comparison of flavour and volatile flavour compounds of mixed elderberry juices. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2015, roč. 63, č. 1, s. 147-152. ISSN: 1211-8516.
3. VÍTOVÁ, E.; SŮKALOVÁ, K.; MAHDALOVÁ, M.; **BUTOROVÁ, L.**; MUSILOVÁ, L.; PECINOVÁ, E. Comparison of sensory quality of model Swiss cheese with commercially obtained corresponding product. *Czech Chemical Society Symposium Series*, 2015, roč. 13, č. 2, s. 152-154. ISSN: 2336-7210.

Plné texty příspěvků a abstraktů z konferencí

1. **BURDĚJOVÁ, L.**; POLOVKA, M. Effect of extraction solvents on phenolic compounds concentration, antioxidant activity and colour parameters of selected medical plants. In *MendelNet 2017 Proceedings of 24th International PhD Students Conference*. Brno: Mendel University in Brno, 2017. p. 520-525. ISBN: 978-80-7509-529-9.
2. **BURDĚJOVÁ, L.**; RAMIRÉZ-ACOSTA, A., ARIAS-BORREGO, A., GARCÍA BARRERA, T., POLOVKA, M., GOMÉZ-ARIZA, J. L. *Impact of geographical locality on metabolic profiles of selected medicinal plants from Lamiaceae family*. Abstract Book PBA 2017. Madrid: 2017. s. 109-109.
3. **BUTOROVÁ, L.**; POLOVKA, M.; POŘÍZKA, J.; VÍTOVÁ, E. *Multi-experimental characterization of selected medical plants growing in the Czech Republic*. Book of Abstracts 8th Central European Conference Chemistry towards Biology. Brno, Czech

- Republic: University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic, 2016. s. 87-87. ISBN: 978-80-7305-777- 0.
4. **BUTOROVÁ, L.**; POLOVKA, M.; TOBOLKOVÁ, B.; VÍTOVÁ, E. Comparison of antioxidant and colour characteristics of different types of medical plants assessed by modern spectroscopic techniques. In *12th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*. Brno: Institute of Analytical Chemistry of the CAS, 2015. s. 91-94. ISBN: 9788090495937.
 5. **BUTOROVÁ, L.**; POLOVKA, M.; TOBOLKOVÁ, B.; VÍTOVÁ, E. *Assessment of antioxidant properties of different types of herbs by EPR and UV- VIS spectroscopy*. Chemistry & Life 2015 - Book of Abstracts. 1. Brno: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 2015. s. 96-96. ISBN: 978-80-214-5228- 2.
 6. VÍTOVÁ, E.; SŮKALOVÁ, K.; MAHDALOVÁ, M.; **BUTOROVÁ, L.**; MUSILOVÁ, L.; PECINOVÁ, E. *Comparison of sensory quality of model Swiss cheese with commercially obtained corresponding product*. Chemistry and Life 2015 - Book of abstracts. 1. Brno: Brno University of Technology, 2015. s. 95-96. ISBN: 978-80-214-5228- 2.
 7. **BUTOROVÁ, L.**; VÍTOVÁ, E.; POLOVKA, M. Monitoring of selected parameters in Amelanchier alnifolia extracts by UV-VIS- NIR and EPR spectroscopy. In *CECE 2014 11th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*. Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i.: 2014. s. 137-140. ISBN: 978-80-904959-2- 0.
 8. **BUTOROVÁ, L.**; TOBOLKOVÁ, B.; POLOVKA, M. Využití moderních analytických technik pro charakterizaci plodů aronie a muchovníku. In *Aplikované přírodní vědy*. Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnavě: 2014. s. 79-84. ISBN: 978-80-8105-565- 2.
 9. VÍTOVÁ, E.; SŮKALOVÁ, K.; MAHDALOVÁ, M.; **BUTOROVÁ, L.** Identification and quantification of aroma compounds of Sea buckthorn berries. In *CECE 2014, 11th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*. Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i.: 2014. s. 450-453. ISBN: 978-80-904959-2- 0.