

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Kamila Makovičková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení biologicky aktivních látek obsažených v řasách
Bakalářská práce

2023

Kamila Makovičková

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kamila Makovičková**
Osobní číslo: **C20029**
Studijní program: **B0531A130012 Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Stanovení biologicky aktivních látek obsažených v řasách**
Téma práce anglicky: **Determination of Biological Active Compounds Present in Algae**
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na fyziologické účinky zelených potravin, přičemž se zaměřte na látky obsažené ve spirulině a chlorelle. Dále se věnujte využití moderních analytických technik v analýze biologicky aktivních látek obsažených v těchto řasách. Zaměřte se na úpravu vzorku před analýzou a samotné analýze extraktů pomocí spektrofotometrických technik či pomocí separačních technik v kapalné fázi.
2. Poznatky z literatury využijte pro analýzu antioxidační kapacity extraktů připravených z výše zmíněných řas pomocí spektrofotometrických metod.
3. Výsledky prezentované v literatuře a experimentálně zjištěné porovnejte a kriticky zhodnoťte.
4. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce v souladu se Směrnicí UPCE č. 7/2019 "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací" v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy: **doporučený rozsah 35 stran**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
veškerá dostupná odborná literatura

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

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

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

L.S.

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení biologicky aktivních látek obsažených v řasách jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne 27. 6. 2023

Kamila Makovičková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala paní doc. Ing. Lence Česlové Ph.D. za odborné vedení a poskytnutí cenných rad při vypracování mé bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za podporu v průběhu celého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením biologicky aktivních látek obsažených v mikroskopických řasách spirulina a chlorella, které řadíme mezi zelené superpotravinu. V teoretické části je popsáno chemické složení, fyziologické vlastnosti a využití těchto řas. Dále jsou zde zmíněny pozitivní účinky spiruliny a chlorelly na lidský organismus, stručně popsány základy separačních technik a moderních analytických metod sledujících antioxidační aktivitu látek. Experimentální část je věnována stanovení antioxidační aktivity extraktů připravených ze spiruliny a chlorelly pomocí spektrofotometrických metod.

KLÍČOVÁ SLOVA

Spirulina, chlorella, antioxidační aktivita, extrakce, spektrofotometrické metody, chromatografie

TITLE

Determination of biological active compounds present in algae.

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the determination of biologically active substances contained in the microscopic algae spirulina and chlorella that we classify as green superfoods. The theoretical part describes the chemical composition, physiological properties, and use of these algae. In addition, the positive effects of spirulina and chlorella on the human organism are mentioned, the basics of separation techniques and modern analytical methods monitoring the antioxidant activity of substances are briefly described. The experimental part is dedicated to the determination of the antioxidant activity of algae extracts using spectrophotometric methods.

KEYWORDS

Spirulina, chlorella, antioxidant activity, extraction, spectrophotometric methods, chromatography

OBSAH

ÚVOD.....	11
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	13
1.1 Spirulina	13
1.1.1 Chemické složení Spiruliny	15
1.1.1.1 Bílkoviny	15
1.1.1.2 Vitamíny	15
1.1.1.3 Antioxidanty	16
1.1.1.3.1 Zeaxantin.....	17
1.1.2 Význam a využití spiruliny	19
1.2 Chlorella.....	19
1.2.1 Chemické složení Chlorelly	20
1.2.1.1 Barviva	20
1.2.1.2 Sacharidy	21
1.2.1.3 Antioxidanty	21
1.2.2 Vliv farmak na mikroorganismy	22
1.2.3 Význam a využití chlorelly	23
1.3 Spirulina vs. Chlorella.....	23
1.4 Analytické metody pro stanovení zelených potravin.....	25
1.4.1 Extrakce	25
1.4.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny	25
1.4.1.2 Extrakce tuhé látky kapalinou.....	26
1.4.1.3 Extrakce nadkritickou tekutinou	26
1.4.2 Stanovení antioxidační aktivity	27
1.4.2.1 Metoda DPPH.....	27
1.4.2.2 Metoda FRAP	27
1.4.2.3 Metoda ABTS	28
1.4.2.4 Metoda ORAC	28
1.4.3 Stanovení fenolických sloučenin.....	28
1.4.4 Chromatografie.....	28
1.4.4.1 Plynová chromatografie	29
1.4.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	29
1.5 Stanovení biologicky aktivních látek ve spirulině a chlorelle.....	31
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
2.1 Přístrojové vybavení a pomůcky.....	32
2.2 Chemikálie.....	32

2.3 Vzorky a rozpouštědla.....	33
2.4 Příprava extraktu.....	33
2.5 Spektrofotometrická analýza	34
2.5.1 Příprava kalibračních roztoků standardu – Trolox	34
2.5.2 Příprava kalibračních roztoků standardu – kyselina gallová	34
2.5.3 Metoda ABTS	34
2.5.4 Metoda DPPH	35
2.5.5 Metoda FRAP.....	35
2.5.6 Stanovení fenolických sloučenin – Folin-Ciocalteuova metoda	35
3 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	36
3.1 Optimalizace spektrofotometrických metod.....	36
3.2 Stanovení antioxidační aktivity	37
3.3 Stanovení celkového obsahu fenolických látek.....	39
4 ZÁVĚR.....	41
5 POUŽITÁ LITERATURA	42
6 PŘÍLOHY	48

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Růst <i>S. maxima</i> a <i>S. platensis</i> v závislosti na teplotě [15].....	14
Obrázek 2: Struktura zeaxantinu.....	17
Obrázek 3: Struktura luteinu.....	17
Obrázek 4: Schéma syntézy zeaxantinu.....	18
Obrázek 5: Schéma syntézy zeaxantinu.....	18
Obrázek 6: Porovnání struktury hemoglobinu (vlevo) a chlorofylu (vpravo)	21
Obrázek 7: Chemická struktura ibuprofenu	22
Obrázek 8: Chemická struktura diklofenaku.....	22
Obrázek 9: Chlorella (vlevo) a spirulina (vpravo) [61]	24
Obrázek 10: Soxhletův extraktor [62].....	26
Obrázek 11: Struktura DPPH	27
Obrázek 12: Struktura ABTS	28
Obrázek 13: Schéma plynového chromatografu [75]	29
Obrázek 14: Schéma kapalinového chromatografu [75].....	30
Obrázek 15: Úbytek absorbance v závislosti na čase u metody ABTS	36
Obrázek 16: Úbytek absorbance v závislosti na čase u metody DPPH	37
Obrázek 17: Stanovení antioxidační aktivity u vzorků řas.....	38
Obrázek 18: Porovnání antioxidační aktivity u methanolických extraktů	38
Obrázek 19: Stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin u vzorků řas.....	40
Tabulka 1: Porovnání obsahu bílkovin u spiruliny s vybranými potravinami [19]	15
Tabulka 2: Obsah vitamínů ve spirulině v mg/100g [2].....	16
Tabulka 3: Obsah monosacharidů - <i>Chlorella pyrenoidosa</i> [48].....	21
Tabulka 4: Vzorky použité ke stanovení bioaktivních látek	33
Tabulka 5: Extrakty ve zvoleném rozpouštědle.....	34
Rovnice 1: Nernstův rozdělovací zákon (1)	25
Rovnice 2: Reakce radikálu DPPH s vodíkovým donorem (2)	27
Rovnice 3: Vztah pro výpočet úbytku absorbance (3)	36

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	absorbance
AAPH	2,2-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid
ABTS	2,2-azino-bis(3-ethyl-2, 3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl
FRAP	metoda založena na redukci železitých sloučenin
GAE	ekvivalentní množství kyseliny gallové
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LLE	extrakce kapalina–kapalina
ORAC	metoda založena na zhášení kyslíkových radikálů
PLE	extrakce tlakovou kapalinou
SFE	extrakce nadkritickou tekutinou
SLE	extrakce tuhá fáze–kapalina
TEAC	celková antioxidační aktivita pro standard Troloxu
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-S-triazin
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast

ÚVOD

Pojmem superpotravin, v anglické literatuře “superfoods“, se rozumí potraviny a doplňky stravy, které obsahují živiny mimořádně prospěšné pro naše zdraví. Mezi ty nejdůležitější patří bílkoviny, sacharidy, vitamíny, minerály, stopové prvky a v neposlední řadě antioxidantní látky. Tyto bioaktivní látky mají specifické vlastnosti, díky kterým zajišťují správné fungování organismu [1, 2].

V současné době však neexistuje oficiální znění, kterým bychom mohli superpotravin definovat. Například Collins dictionary popisuje superpotravin jako “potraviny obsahující mnoho vitamínů a látek, které jsou považovány za velmi prospěšné pro naše zdraví“. Jiný zdroj uvádí, že se tento termín vztahuje na ty potraviny, které mají vysoký obsah živin a fotochemikálií přínosné pro lidské zdraví [3]. Jedno je ale jasné. Termín superpotravin byl vytvořen marketingovým průmyslem a je to tedy termín komerční. Poukazuje hlavně na to, že superpotravin mají značnou výhodu oproti běžným potravinám, především co se týká množství nutričních látek [4, 5].

Tento typ nových potravin má pro naše zdraví několik benefitů. Nejen že zajišťují celkovou detoxikaci těla díky velkému množství antioxidantních látek, ale dodávají nám potřebnou energii či schopnost předcházet různým nemocem. Průzkumy dokazují, že vhodnou konzumací superpotravin dochází ke snížení rizika vzniku degenerativních onemocnění jako jsou cukrovka, rakovina či osteoporóza [1, 2] a k prevenci vzniku srdečních chorob [5]. Studie společnosti Onneken publikovaná v roce 2018 prokázala pozitivní vliv konzumace chia semínek na kognitivní schopnosti u dospělých lidí [6]. Neméně důležitým významem superpotravin je posílení imunitního systému, jehož správná činnost je pro nás také nesmírně důležitá [7-9]. Konzumace superpotravin může ovlivnit i tvorbu hormonů, zejména serotoninu. Serotonin neboli 5-hydroxytryptamin, známý také jako “hormon štěstí“, je schopen ovlivňovat biochemické procesy, které probíhají v organismu [9].

Významnými superpotravinami jsou bezpochyby bobule neboli dužnaté plody bez pecky. Mezi významné zástupce této skupiny patří kustovnice čínská (goji), muchovník, rakytník, borůvky, acai, granátové jablko či hroznové víno. Do superpotravin se řadí i pseudoobiloviny (quinoa, amarant), některé druhy ovoce a zeleniny (brokolice, špenát), ořechy, chia semínka, heřmánkový a zelený čaj, zázvor, med, ginkgo biloba (jinan dvoulaločný), maca, kakao či kefír [2].

Další specifickou skupinou superpotravin jsou zelené potraviny, mezi které řadíme spirulinu, chlorellu, mladý zelený ječmen a mladou zelenou pšenici. Jak už název napovídá, všechno to jsou látky s výraznou tmavě zelenou barvou. Spirulina a chlorella jsou mikrořasy, které se vyskytují převážně ve vodách a jezerech. Naopak zelený ječmen a zelená pšenice pochází ze souše. Obecně to jsou potraviny bohaté na bioaktivní látky, které povzbuzují přirozenou obranyschopnost organismu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Spirulina

Spirulina (lat. *Athrospira platensis*) patří mezi mikroorganismy, které se na naší planetě objevily, když začaly vznikat první známky života. Právě díky těmto nejstarším žijícím rostlinám se mohla vytvořit kyslíková atmosféra, a tudíž i život na Zemi [10]. Zároveň slouží jako potrava pro ostatní organismy a stojí tedy na začátku potravního řetězce. V historii byla rovněž využívána jako důležitý zdroj potravy pro obyvatele Mexika a Afriky [8].

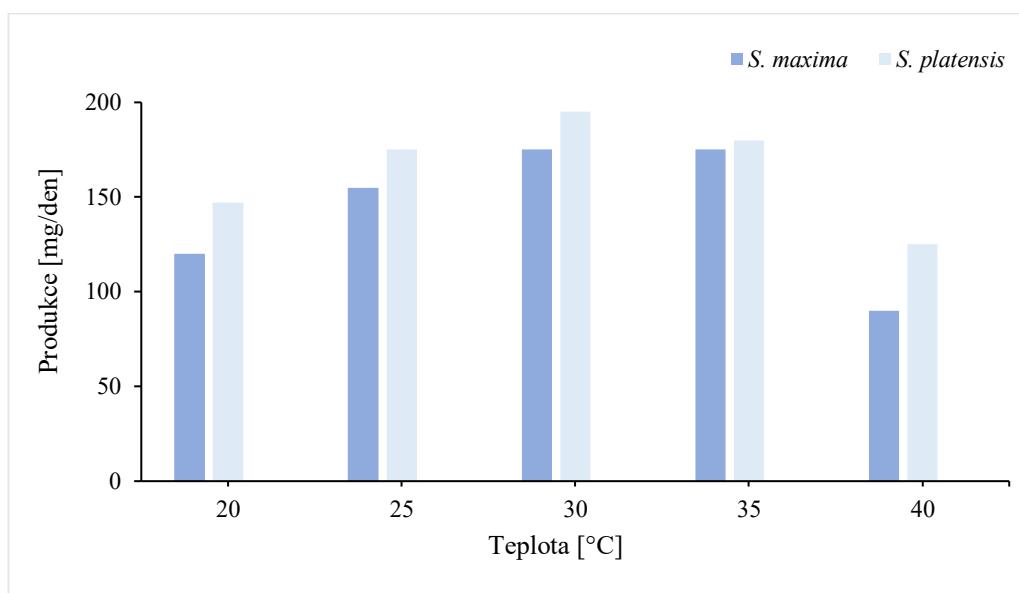
Tato mnohobuněčná vláknitá mikroskopická řasa se vyskytuje ve vodách, kde se vyvíjí a postupně roste [2, 10]. Na vodním povrchu tvoří kolonie, jejichž tvar připomíná spirálu a odtud pochází název spirulina. Má typické modrozelené zbarvení, které je způsobeno obsahem pigmentů. Konkrétně se jedná o zelené barvivo chlorofyl a modré barvivo fykocyanin [8]. Modrozelená vlákna lze pozorovat pod světelným mikroskopem. Vlákna jsou samostatná a skládají se z vegetativních buněk, které se rozmnožují v binární rovině [11].

Jakožto zelená rostlina obsahující barvivo chlorofyl je spirulina schopná fotosyntézy. Fotosyntéza je jedním z nejdůležitějších procesů probíhajících na této planetě, jelikož při něm vzniká kyslík a voda. Principem fotosyntézy u zelených rostlin je absorpce slunečního světla a následná přeměna oxidu uhličitého na již zmíněný kyslík, vodu a také živiny, konkrétně bílkoviny, mastné kyseliny a sacharidy. Další významnou vlastností této superpotravin je tepelná odolnost, protože i při vysokých teplotách si spirulina uchovává všechny své živiny. Spirulina je také velmi vytrvalou rostlinou. Dokáže přežít, i když dojde k odpaření veškeré vody ve vodním ekosystému [8].

Spirulina obsahuje přes 100 nutričních živin a řadí se mezi nejbohatší bílkovinné rostlinné zdroje, jejichž obsah se pohybuje okolo 55-70 % z celkové hmotnosti [2, 8, 10]. Množství sacharidů je přibližně 15-25 % a právě díky velkému obsahu polysacharidů v buněčné stěně je lehce stravitelná [10]. Dále spirulina obsahuje esenciální mastné kyseliny, minerální látky, vitamíny, antioxidanty a již zmíněné pigmenty [2, 10-12]. Díky vysokému obsahu různých biologicky aktivních látek našla spirulina široké uplatnění jak v potravinářském, tak farmaceutickém průmyslu [10, 13]. Spirulina se nejčastěji užívá ve formě sypkého prášku či v tabletách a doporučenou denní dávkou jsou 1-2 čajové lžičky.

Pro růst a rozmnožování spiruliny je důležitá teplota, a proto se pěstuje většinou v teplejších oblastech, např. Thajsko, Tchaj-wan, Vietnam, Japonsko, Indie, Kuba, Mexiko, Španělsko atd. [14]. Na obrázku 1 je znázorněn růst dvou druhů spiruliny, *S. platensis* a *S. maxima*, v rozmezí teplot 20 - 40 °C. Jak je z obrázku patrné, optimální hodnota pro kultivaci se pohybuje mezi 30-35 °C, což je teplota, kterou naměříme například v oblasti Brazílie. Naopak nejnižší výnosy spiruliny jsou tradičně v zimním období a v mírném podnebí. Pro zachování výnosnosti je pak nutné vytápění a s tím spojené zvýšení nákladů. Teplota má vliv i na složení spiruliny. Vlivem teploty může docházet k významnému poklesu obsahu bílkovin, ale naopak ke zvýšení obsahu sacharidů a lipidů. Dokonce může dojít i ke změně struktury mastných kyselin [15]. Právě podle složení mastných kyselin jsme schopni rozlišit kmeny spiruliny od ostatních druhů sinic [16].

Kromě teploty ovlivňuje růst spiruliny i hodnota pH, která by se měla pohybovat v rozmezí 7-11,3, přičemž největší růst byl zaznamenán v rozsahu pH 8-11 [15, 17].



Obrázek 1: Růst *S. maxima* a *S. platensis* v závislosti na teplotě [15]

1.1.1 Chemické složení Spiruliny

1.1.1.1 Bílkoviny

Bílkoviny neboli proteiny patří mezi biopolymery, jejichž struktura se skládá z aminokyselin. Bílkoviny mají několik funkcí, zejména stavební, katalytickou, skladovací, transportní, regulační a v neposlední řadě funkci obrannou. Podle struktury se proteiny dělí na primární, sekundární, terciární a kvartérní [18]. Spirulina se považuje za nejbohatší zdroj bílkovin a v porovnání s vybranými potravinami (viz tabulka 1) si můžeme všimnout, že její obsah bílkovin je o více než 20 % vyšší [19]. Ke snížení obsahu bílkovin může dojít ve fázi růstu, pokud se omezí přísun fosforu. Fosfor je totiž hlavní součástí ATP a jeho nedostatek způsobí snížení syntézy energeticky náročných bílkovin [20].

Tabulka 1: Porovnání obsahu bílkovin u spiruliny s vybranými potravinami [19]

Typ potraviny	Hrubé % obsahu bílkovin
Prášek ze spiruliny	65
Odstředěné sušené mléko	45
Pivní kvasnice	37
Arašíd	26
Kuře	24

1.1.1.2 Vitamíny

Vitamíny jsou pro náš organismus nepostradatelné. Jsou to látky esenciální, což znamená, že je organismus není schopen samostatně syntetizovat a musíme je přijímat v potravě. Z hlediska rozpustnosti dělíme vitamíny na rozpustné ve vodě (B, C) a rozpustné v tucích (A, D, E, K) [18]. Vitamíny mají pro naše zdraví velký přínos. Spirulina obsahuje především vitamín A, E a vitamíny B skupiny [2,19]. Zejména vysoký obsah provitaminu A spolu s vitamínem B₁₂ (kobalamin) příznivě ovlivňuje některé typy onemocnění [19]. V tabulce 2 je znázorněn obsah vitamínů, které se vyskytují ve spirulině.

Tabulka 2: Obsah vitamínů ve spirulině v mg/100g [2]

Vitamíny	Obsah ve spirulině [mg/100g]
Provitamín A (Karoten)	60,1
Vitamín B1 (Thiamin)	5,3
Vitamín B2 (Riboflavin)	2,44
Vitamín B3 (Niacin)	10,8
Vitamín B5 (K. pantothenová)	1,07
Vitamín B6 (Pyridoxin)	0,549
Vitamín B8 (Inositol)	8,24
Vitamín B9 (K. listová)	0,827
Vitamín B12 (Kobalamin)	0,182
Vitamín E (Tokoferol)	7,78

1.1.1.3 Antioxidanty

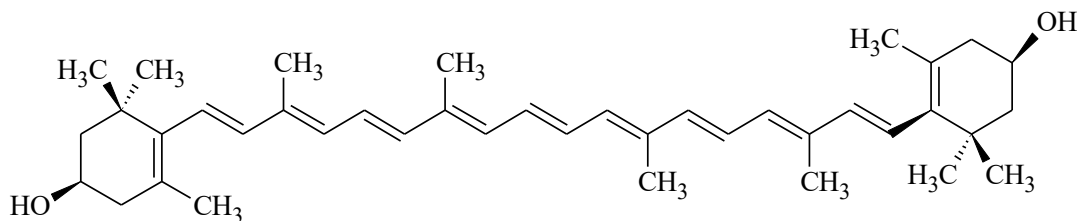
Antioxidanty jsou látky, které slouží k ochraně buněk a zabraňují poškození organismu, protože mají schopnost vychytávat volné radikály včetně alkoxylových, hydroxylových a peroxylových [21]. Látky s antioxidačními a antiflogistickými aktivitami se vyznačují pozitivními účinky proti kardiovaskulárnímu onemocnění. Zánět spolu s oxidačním stresem totiž přispívají k patogenezi tohoto typu onemocnění včetně arteriosklerózy, hypertenze, srdeční hypertrofie nebo srdečnímu selhání. Za vznik oxidativního stresu jsou zodpovědné reaktivní formy kyslíku nebo nedostatečné rezervy antioxidantů. Za tvorbou ROS stojí narušená mitochondriální redukce molekulárního kyslíku, autooxidace katecholaminů (adrenalin, noradrenalin, dopamin), radiace nebo špatné ovzduší. Nedostatek antioxidačních látek, které slouží k obranyschopnosti organismu, vzniká vyčerpáním nebo změnami v expresi genů [22].

Ve spirulině jsou hlavními antioxidanty karotenoidy (zeaxantin, β -karoten, lutein, astaxanthin) [23] a modrozelený pigment fykocyanin, který je díky struktuře tetrapyrrolů s otevřeným řetězcem schopen vychytávat přítomné radikály [24]. Antioxidační a protizánětlivé účinky u spiruliny byly prokázány ve velkém počtu preklinických studiích na zvířatech a v omezeném množství i na lidech [25]. Terapeutické účinky spiruliny na zmírnění alergické rýmy a jiných alergických projevů byly testovány u pacientů s alergickou rýmou po užití doplňků stravy na bázi spiruliny [26,27]. Bylo zjištěno, že užíváním spiruliny v množství 2000 mg/den po dobu 3 měsíců dochází ke snížení hladiny interleukinů IL-4 o 32 % [27]. U zánětlivých procesů může spirulina s příměsí zinku sloužit jako podpůrný lék ke snížení

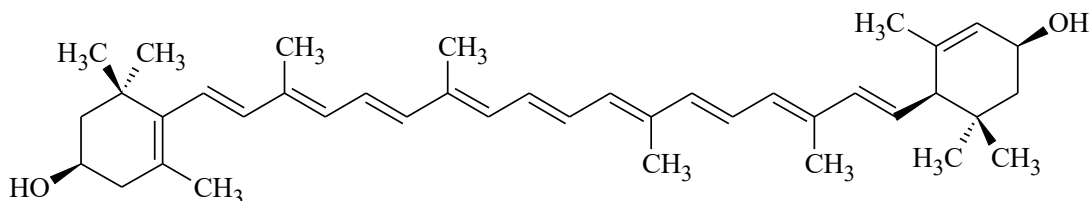
oxidativního stresu [28]. Díky obsahu fenolických látek, které jsou výborné přírodní antioxidanty, má spirulina rovněž inhibiční účinky na mutagenezi a karcinogenezi [29, 30].

1.1.1.3.1 Zeaxantin

Zeaxantin (obrázek 2), strukturním názvem *trans*- β -karoten-3,3'-diol, (3*R*,3'*R*)-dihydroxy- β -karoten, zeaxantol či anchovyxantin je xantofyl, který patří mezi nejrozšířenější karotenoidní alkoholy v přírodě. Je to žlutý pigment, který se vyskytuje v ovoci a v obilovinách např. kukuřici. Jedná se o látku, která je svou strukturou izomerní s luteinem (obrázek 3) [31].



Obrázek 2: Struktura zeaxantinu



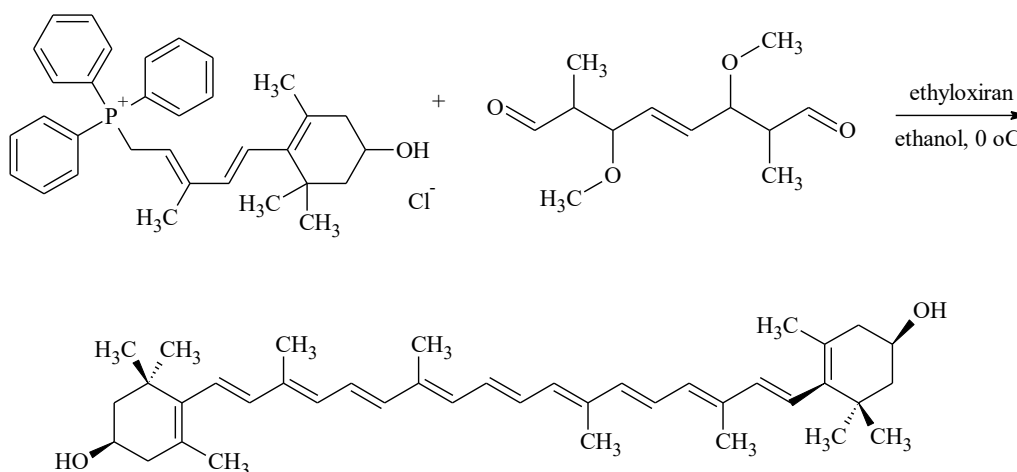
Obrázek 3: Struktura luteinu

V lidském těle se zeaxantin společně se svým izomerem luteinem koncentruje především v mozku a v sítnici lidských očí [32]. Zatímco zeaxantin je hlavní složkou v centrální makuli (žlutá skvrna), lutein převažuje v periferní oblasti. Antioxidační vlastnosti obou těchto xantofylů v kombinaci se schopností zachycovat krátkovlnné záření mohou aktivně sloužit k ochraně sítnice. Funkce zeaxantinu a luteinu spočívá ve vylučování kyslíku v sítnici a tím chrání buňku před oxidačním poškozením [33]. Tyto izomery jsou tedy podstatné pro správnou funkci zrakového vnímání.

Zeaxantin patří mezi esenciální látky a lidské tělo tedy není schopno vlastní syntézy. Proto je nutné přijímat tuto nutriční látku v potravinách. V americké populaci odpovídá průměrná dávka zeaxantinu přibližně 2 mg/den, což je trojnásobně méně, než je doporučovaná denní dávka, díky které může docházet ke snížení rizika onemocnění zraku [34]. Mezi hlavní nemoci postihující zrakové ústrojí vlivem nedostatku zeaxantinu patří makulární degenerace a katarakta neboli šedý zákal [34, 35]. K těmto onemocněním jsou náchylnější převážně osoby

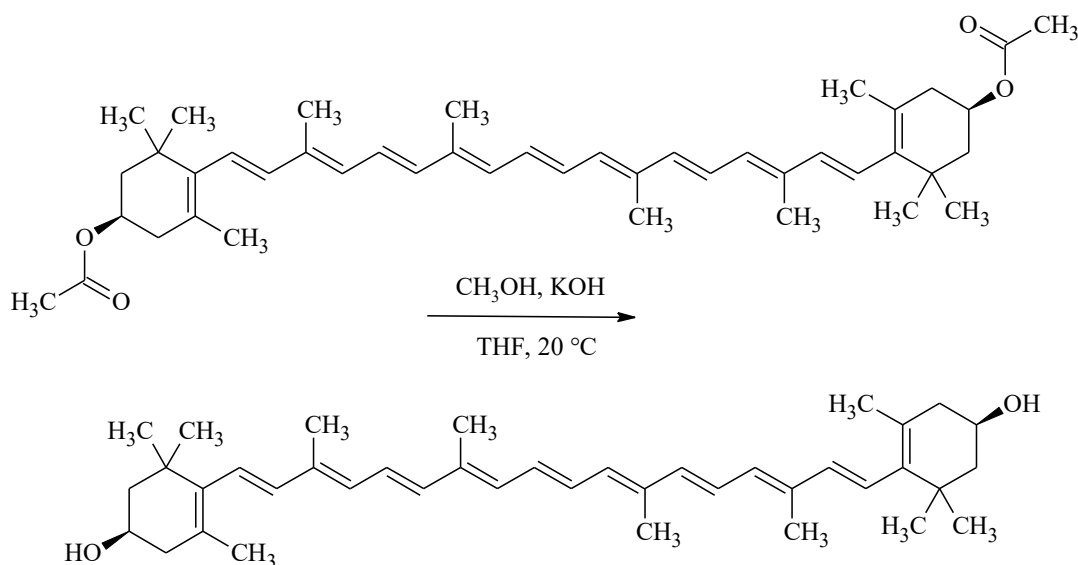
vyššího věku [35]. Pro doplnění potřebného množství zeaxantinu slouží právě spirulina, která je na tento karotenoid bohatá.

Zeaxantin lze získat Wittigovou reakcí 3-methyl-5-(2,6,6-trimethyl-1-cyklohexen-1-yl)-2,4-pentadienyltrifenylfosfonium chloridu s 3,6-dimethoxy-2,7-dimethyl-4-oktandielem. Reakce by probíhala s ethyloxiranem v prostředí ethanolu při 0 °C a po dobu 21 hodin. (obrázek 4). Patent této syntézy byl schválen v roce 2004 [36].



Obrázek 4: Schéma syntézy zeaxantinu

Při jiné syntéze můžeme vycházet ze zeaxantin-diacetátu, který reaguje s methanolem a hydroxidem draselným v prostředí tetrahydrofuranu (obrázek 5). Tato reakce by probíhala při 20 °C. Délka syntézy trvá 1 hodinu. Výtěžek zeaxantinu by odpovídal až 98% [37].



Obrázek 5: Schéma syntézy zeaxantinu

1.1.2 Význam a využití spiruliny

Bezpochyby lze říci, že všechny druhy spiruliny našly svoje využití v různých oborech, avšak hlavní využití našla ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Z farmaceutických účinků je jednou z nejpříznivějších vlastností spiruliny vliv na hladinu cukru v krvi. U pacientů s cukrovkou druhého typu (Diabetes mellitus) byla prokázána její účinnost na snižování glukózy v krvi, a to při konzumaci 2 g spiruliny každý den po dobu dvou měsíců. Tato dvouměsíční studie vedla k viditelnému snížení glykémie a glykosylovaného hemoglobinu (HbA1C) [38]. Významným je také antioxidační potenciál spiruliny a s tím spojená správná funkce imunitního systému. Produkci cytokinu, chemokinů a protilátek B-lymfocytů dochází k výrazné pozitivní odpovědi na různá zánětlivá onemocnění [39]. Byl zjištěn i antivirový a antimikrobiální účinek způsobený novým polysacharidem, který se nachází ve spirulině. Jeho mechanismus spočívá v inhibici replikace virů a jejich pronikání do hostitelských buněk [12].

Co se týká využití spiruliny v potravinářském průmyslu, existuje velké množství receptů, kde je spirulina využita, zpravidla v množství odpovídající čajovým lžičkám. David Wolfe ve své knize s názvem Superfoods popisuje několik variant zpracování spiruliny, například pro přípravu pikantního salátového dresinku, čokoládových kuliček, guacamole či různých směsí koření [8]. Spirulina je rovněž součástí populárního přípravku „Supergreens“. Jedná se o směs čtyř zelených superpotravin ve formě prášku, který se rozmíchá ve vodě a následně se konzumuje. Tato směs zlepšuje trávení, pomáhá proti nadýmání a dodává energii, která je pro fungování našeho organismu velmi důležitá.

1.2 Chlorella

Chlorella vulgaris (třída *Chlorophyceae*) je jednobuněčná zelená řasa vyskytující se převážně ve sladkých vodách [8, 40]. Tato mikrořasa s velmi dlouhou historií zanechala nejstarší stopu v horninách Západní Austrálie, kde byla nalezena fosilní zkamenělina z doby před 3,4 miliardami lety [40]. Prvními konzumenty chlorelly byli Aztékové a Mezoameričané, pro něž byla významným zdrojem potravy [40, 41]. V dnešní době však, kromě potravinářského průmyslu, našla chlorella využití i v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu a rovněž hraje důležitou roli při výrobě barviv [41].

Chlorella se skládá se z velkého jádra a velkého množství chlorofylu. Právě díky tomu si získala své jméno. Při porovnání s ostatními zelenými rostlinami má chlorella více chlorofylu na gram než kterákoli jiná rostlina podobné struktury (3-5 % čistého zeleného barviva) [8]. Tato mikrořasa s rozmanitým složením obsahuje funkční mikroživiny a makroživiny včetně bílkovin (přibližně 60 % celkové hmotnosti), omega-3 polynenasycených mastných kyselin,

polysacharidů, vitamínů a minerálních látek [41, 42]. V některých druzích chlorelly se vyskytuje i vláknina. Ta je schopna snižovat hladinu glukózy v krvi a potlačovat některé střevní záněty [43]. Stejně jako ostatní zelené rostliny obsahující chlorofyl je i chlorella schopna fotosyntézy, kdy dochází k přeměně oxidu uhličitého na kyslík, pro nás nezbytně důležitý pro dýchání [8].

Chlorella má jednu výjimečnou schopnost, která se nazývá Chlorella Growth Factor (CGF) v českém překladu růstový faktor chlorelly. Jedná se o děj, při němž se chlorella zvětší o čtyřnásobek své původní velikosti, a to za pouhých dvacet hodin. Tato rostlina tedy roste mnohem rychleji než všechny ostatní plodiny, které známe. Vlivem takové rychlosti růstu chlorelly dochází při konzumaci k rychlejšímu hojení ran, růstu laktobacilů a celkově k lepší imunitní odpovědi našeho organismu [8, 44]. Chlorella Growth Factor se dá využít při výrobě krmiv pro hospodářská zvířata. Je prokázáno, že i malý přírůstek chlorelly v krmivech zlepšuje růst, reprodukci a užitkovost. To je samozřejmě vhodné i pro lidstvo jakožto konzumenty masných výrobků. Je logické, že čím kvalitnější se používá krmivo pro zvířata, tím větší kvalitu můžeme očekávat od živočišných produktů určené pro lidskou spotřebu [44].

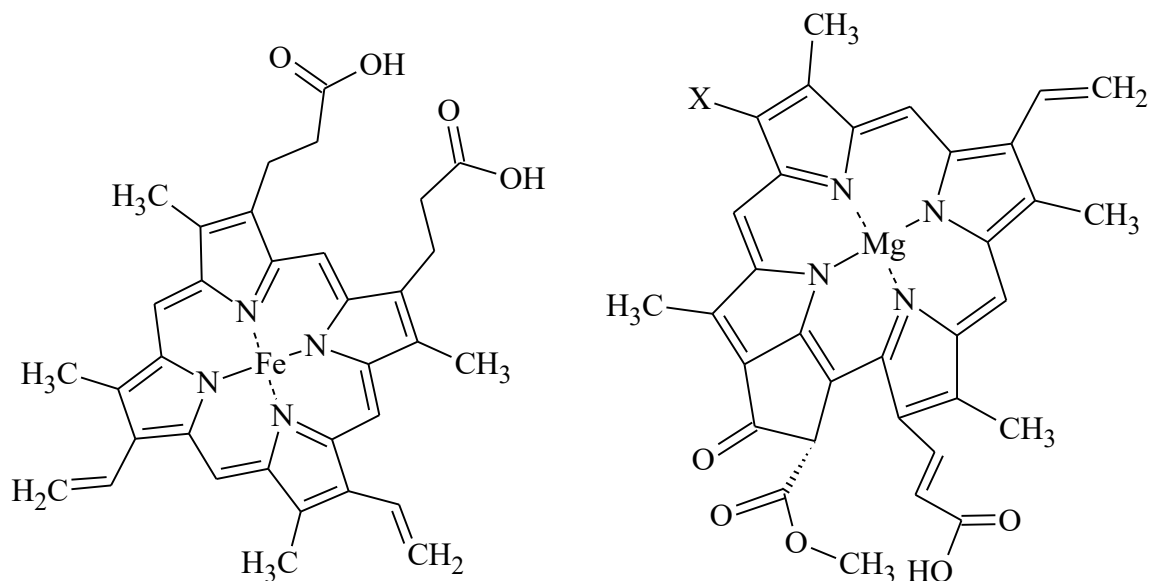
Chlorella se normálně pěstuje ve vodách sladkých, a proto není adaptovaná na růst a rozmnožování ve slaných vodách. V tomto prostředí dochází k její destrukci a následnému uhynutí [45]

1.2.1 Chemické složení Chlorelly

1.2.1.1 Barviva

Množství chlorofylu, který se nachází v chlorelle je srovnatelné s množstvím obsaženým ve vyšších rostlinách [44]. Pro syntézu chlorofylu je primárním faktorem světlo a stupeň osvětlení. Obsah chlorofylu klesá, pokud není světlo limitující pro růst rostliny, a naopak se v buňkách zvyšuje, když omezením přístupu světla dochází ke zpomalení růstu. Chlorella tedy nepotřebuje vstřebávat světlo přímo uvnitř buňky k tomu, aby byla schopna fotosyntézy [46].

Z hlediska chemické struktury si můžeme všimnout podobnosti u chlorofylu a červeného krevního barviva hemoglobinu. Jak je vidět na obrázku 6, hlavním viditelným rozdílem je pouze centrální kov. Centrálním kovem u chlorofylu je hořčík (Mg), hemoglobin je postaven na železe (Fe). Obě tyto sloučeniny mají i podobnou funkci, kterou je transport kyslíku v organismu [47].



Obrázek 6: Porovnání struktury hemoglobinu (vlevo) a chlorofylu (vpravo)

1.2.1.2 Sacharidy

Sacharidy dělíme podle počtu monosacharidových jednotek na monosacharidy (1 jednotka), polysacharidy (2-10 jednotek) a oligosacharidy (více jak 10 jednotek) [18]. Patří mezi velmi rozšířené živiny, které slouží jako rychlý zdroj energie. V tabulce 3 je znázorněn obsah jednotlivých monosacharidů nacházejících se v mikrořase *Chlorella pyrenoidosa* [48].

Tabulka 3: Obsah monosacharidů - *Chlorella pyrenoidosa* [48]

Monosacharidy	Obsah v %
Rhamnóza	31,8
Glukóza	20,42
Galaktóza	10,28
Manóza	5,23
Xylóza	1,27

1.2.1.3 Antioxidanty

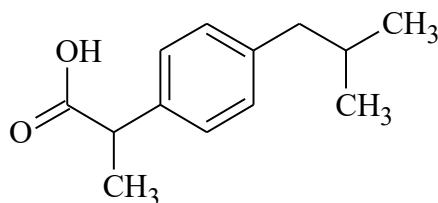
Hlavní antioxidanty nacházejícími se v chlorelle jsou lutein, betakaroten, kyselina askorbová (vitamín C) a tokoferol (vitamín E). Díky těmto antioxidantům dochází ke snížení glykovaného hemoglobinu a cholesterolu a chlorella poté působí preventivně proti vzniku některých onemocnění jako je šedý zákal u diabetických pacientů [49]. *Chlorella vulgaris* vyžaduje pro svůj růst a zvýšení antioxidační aktivity dostatečný přísun vitamínů. Pro zjištění, jaký vitamín je pro růst chlorelly nejvýznamnější byly vitamíny skupiny B jako jsou thiamin

(vitamín B₁), riboflavin (vitamín B₂), pyridoxin (vitamín B₆) spolu s kyselinou askorbovou (vitamín C) přidány do kultivačního média v různých koncentracích [50]. Závěrem studie bylo zjištění, že nejlepším vitamínem ovlivňující růst a spolu s ním i antioxidační aktivitu je thiamin. Navíc chlorella s vysokým množstvím thiaminu prokázala protinádorové účinky [50].

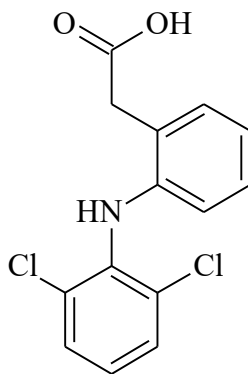
1.2.2 Vliv farmak na mikroorganismy

Ve fytoplanktonu se vyskytují chlorophyta jako jsou *Chlorella sorokiniana* a *Chlorella vulgaris*. Oba tyto druhy fungují jako indikátory znečištění vod a využívají se jako modelové organismy pro ekotoxikologické testy [51]. Jak je známo, po celém světě došlo ke zhoršení kvality vody vlivem výroby, používání a vypouštění léčiv do vodních ekosystémů [52]. Vlivem produkce těchto léků dochází ke změnám ve struktuře buněk a v populační dynamice zkoumaných druhů chlorelly [53].

Hlavními zástupci produkovaných léčiv jsou antiflogistika ibuprofen (obrázek 7), ketazon či diklofenak (obrázek 8), které jsou často užívané k potlačení zánětů a horečky. Jejich funkce spočívá v inhibici enzymů cyklooxygenázy, které se podílí na tvorbě prostaglantinů zodpovědných za imunitní a zánětlivou odpověď lidského organismu [54]. Potenciálním rizikem se jeví také Triclosan, přídatná látka v antibakteriálních léčích. Při koncentraci 1,05 mg/l dochází k inhibici růstu *Chlorelly vulgaris* a s tím spojené ekologické riziko ve vodních systémech [55].



Obrázek 7: Chemická struktura ibuprofenu



Obrázek 8: Chemická struktura diklofenaku

1.2.3 Význam a využití chlorelly

Chlorella se často používá za účelem zlepšení kvality našeho zdraví. Účinnost při diabetických a karcinogenních onemocnění byla již zmíněna. Chlorella bohatá na kyselinu 4-aminobutanovou, resp. kyselinu gama-aminomáselnou, potlačuje vysoký krevní tlak a může se proto pyšnit antihypertenzním účinkem [56]. Konzumace chlorelly přispívá k podpoře imunitního systému, který je oslaben dlouhodobým onemocněním či chemoterapií. Princip spočívá v urychlení tvorby a obnovy bílých krvinek, které se podílí na imunitní odpovědi lidského organismu [8].

Odolnost vůči bakteriálním a virovým onemocněním je jednou z dalších výhod užívání chlorelly. Extrakt z chlorelly je nápomocný k potlačení replikaci bakteriálních a virových částic v orgánech (např. virus herpesového typu *Cytomegalovirus*). Při studiích aplikovaných na hlodavcích se prokázala účinnost chlorelly zabránit infekcím způsobeným bakterií *Listeria monocytogene*. Tato patogenní bakterie se vyskytuje v balených potravinách či v syrových výrobcích a může mít fatální následky při infikaci oslabeného lidského organismu [8].

Další pozitivní vlastností chlorelly je odolnost vůči těžkým kovům (rtuť, olovo, kadmium), které mají za příčinu vznik oxidativního stresu. Díky chlorelle, která zabraňuje toxicitě těchto kovů, dochází k výraznému snížení poškození ledvinových buněk [57].

1.3 Spirulina vs. Chlorella

Hlavním rozdílem mezi spirulinou (*Athrospira platensis*, *Cyanophyta*) a chlorellou (*Chlorella vulgaris*, *Chlorophyta*) je jednoznačně buněčná stavba. Mnohobuněčná spirulina ve tvaru spirály je buňka prokaryotická, zatímco chlorella obsahuje ve své struktuře pouze jedinou buňku kulovitého tvaru a eukaryotickou strukturu. Navíc má chlorella jádro dobře a viditelně ohraničené. Rozdíl najdeme i v prostředí, kde tyto zelené superpotraviny rostou a rozmnožují se. Spirulinu nalezneme ve slaných a braktických vodách, avšak chlorella preferuje pro svůj růst čisté vody. Obě tyto rostliny jsou schopné fotosyntézy, a to díky zelenému barvivu chlorofyl [58, 59].

Rozdílným znakem u těchto řas je obsah nasycených a nenasycených mastných kyselin. Například kyselina palmitová (16:0) dosahuje až čtyřnásobně vyšší hodnoty u spiruliny oproti chlorelle. Značného rozdílu si můžeme všimnout u kyseliny α -linolenové a kyseliny γ -linolenové. Zatímco u spiruliny se vyskytuje pouze kyselina γ -linolenová, kyselina α -linolenová byla nalezena pouze u chlorelly [59].

Společným znakem pro tyto zelené superpotravinu je nespočet využití jak ve farmaceutickém, tak v potravinářském průmyslu, protože obsahují vysoké množství nutričních látek jako jsou bílkoviny, lipidy, vitamíny, minerály a antioxidanty. Spirulina a chlorella se nejčastěji prodávají ve formě pilulek, prášku či jiných formách [60].

Největší využití chlorelly mají státy Dálného východu (Japonsko, Tchaj-wan), vrchol využití a kultivaci dosáhla spirulina ve Spojených státech, Mexiku, Španělsku a Izraeli [59].



Obrázek 9: Chlorella (vlevo) a spirulina (vpravo) [61]

1.4 Analytické metody pro stanovení zelených potravin

1.4.1 Extrakce

Extrakce je separační metoda, při které dochází ke kontaktu dvou navzájem nemísitelných fází, zpravidla organické a vodné fáze. Jednotlivé látky (analyty) se mezi fáze rozdělí na základě rozdílné rozpustnosti a platí pravidlo, že čím větší jsou rozdíly v rozpustnosti, popř. rozdělovacím koeficientu, tím je separace lepší. Při extrakci se uplatňuje Nernstův rozdělovací zákon (rovnice 1), který říká, že poměr koncentrací extrahované složky v organické a vodné fázi je konstantní při konstantním tlaku a teplotě [62].

$$K_D = \frac{\text{koncentrace analytu v organické fázi}}{\text{koncentrace analytu ve vodné fázi}} \quad (1)$$

Extrakci můžeme dělit na jednostupňovou, vícestupňovou a kontinuální. O jednostupňové hovoříme v případě, že dochází k ustavení rovnováhy mezi fázemi pouze jednou. Příkladem může být jednokrokové třepání v dělicí nálevce. Vícestupňová extrakce se značí opakovaným ustavováním rovnováhy v několika krocích. Hlavním cílem extrakce je dokonalé oddělení jednotlivých složek či oddělení nečistot od analyzovaných složek [62]. Dále lze rozdělit extrakce dle zúčastněných fází, a to na extrakci kapalina-kapalina (LLE), plyn-kapalina (GLE) a tuhá fáze-kapalina (SLE) [63]. Mezi novější instrumentální metody používané k extrakci patří extrakce nadkritickou tekutinou (SFE), mikrovlnná extrakce či tlaková extrakce tekutinou (PFE) [64].

1.4.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny

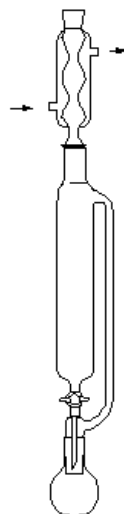
Extrakce z kapaliny do kapaliny nebo také extrakce rozpouštědlem je separační proces založen na principu rozdělování analytu mezi dvě nemísitelné či omezeně mísitelné kapalné fáze [65]. Rozpouštědlem bývá nejčastěji vodný roztok a vzorek se extrahuje do organického rozpouštědla (ether, chloroform). Rozpustnost extrahované složky nacházející se v kapalině musí být vyšší v té kapalině, do které se extrahuje než v té, ze které extrahujeme.

Extrakce z kapaliny do kapaliny se dá využít při předběžné úpravě vzorku, popřípadě k odstranění nežádoucí složky ve vzorku. Nejčastěji se tato extrakce provádí třepáním v dělicí nálevce. Tento proces je široce využíván především díky své jednoduchosti, časové nenáročnosti a nízkým nákladům [66].

1.4.1.2 Extrakce tuhé látky kapalinou

Extrakce tuhé látky kapalinou se nejčastěji provádí za použití organických a anorganických rozpouštědel, které jsou v kontaktu s pevnou maticí. Pro tuto extrakci je typická Soxhletova metoda [64]. Aparatura pro Soxhletovu extrakci znázorněná na obrázku 10 se skládá z varné baňky, Soxhletova extraktoru s extrakční patronou a chladiče.

Ve střední části Soxhletova extraktoru se nachází papírová extrakční patrona válcovitého tvaru, která se naplní vzorkem. Baňka s vhodným rozpouštědlem, ve kterém se dobře rozpouští látka, jež chceme oddělit, se zahřívá k varu. Páry rozpouštědla postupují trubičkou extraktoru do chladiče, kde dochází k jejich kondenzaci. Kapky rozpouštědla dopadají na vzorek uložený v papírové koloně a přepadová trubička se postupně plní zkondenzovaným rozpouštědlem. V momentě, kdy hladina rozpouštědla stoupne k nejvyšší části trubičky, dojde k přelití roztoku do destilační baňky a proces se opakuje. Výsledkem je roztok jedné nebo více složek v destilační baňce, ze které se nadbytek extrakčního rozpouštědla oddestiluje [62].



Obrázek 10: Soxhletův extraktor [62]

1.4.1.3 Extrakce nadkritickou tekutinou

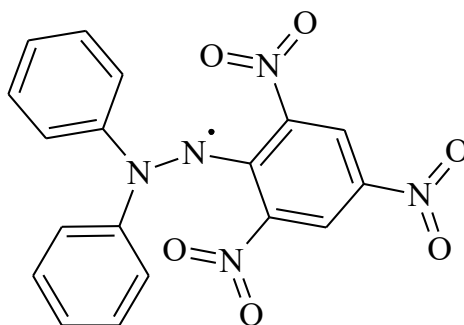
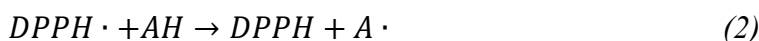
Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE) využívá k extrakci extrakční činidlo v nadkritickém stavu, tzn. kdy se látka nachází nad svojí kritickou teplotou T_c a tlakem p_c . Nejčastěji se jedná o oxid uhličitý, který je dostupný, není toxický a snadno lze převést do nadkritického stavu [64].

1.4.2 Stanovení antioxidační aktivity

Ke stanovení antioxidační aktivity se využívají metody založené na reakci antioxidantu přítomného ve vzorku s různými typy radikálů nebo na reakci s přechodnými kovy. Volné radikály jsou molekuly s jedním volným elektronem v elektronovém obalu, které se tvoří v různých chemických systémech během metabolických procesů [67].

1.4.2.1 Metoda DPPH

Jedná se o metodu, kdy volný stabilní radikál DPPH[•] (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazil (obrázek 11) reaguje s donory vodíku [67] a při reakci dochází k odbarvení původně fialového roztoku vlivem vzniku redukované formy DPPH (rovnice 2). Úbytek absorbance se měří spektrofotometricky při vlnové délce 515 nm. Pomocí standardu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) [68, 69] je poté míra odbarvení přepočtena na ekvivalentní množství tohoto standardu na 1 g nebo 1 ml vzorku (TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).



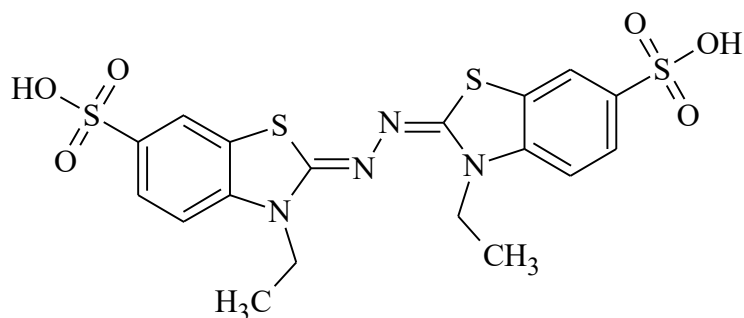
Obrázek 11: Struktura DPPH

1.4.2.2 Metoda FRAP

Metoda FRAP (Feric Reducing Antioxidant Potencial) je založena na redukci železitých sloučenin např. 2,4,6-tripyridyl-s-triazin (TPTZ) s hexahdrátem chloridu železitého [67]. Antioxidační látky redukují Fe³⁺-TPTZ komplex na modře zbarvený komplex Fe²⁺-TPTZ. Nárůst absorbance se měří spektrofotometricky při vlnové délce 593 nm. Test FRAP vyniká svou jednoduchostí a nízkými náklady na provedení [70].

1.4.2.3 Metoda ABTS

Metoda ABTS je jednou z nejpoužívanějších technik pro stanovení celkové antioxidační aktivity TAA (Total Antioxidant Activity). Principem je reakce antioxidantu s radikálovým kationtem, který vzniká oxidací 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny ABTS (obrázek 12). Míra odbarvení původně zeleného roztoku se měří spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm. Výsledná antioxidační aktivita vzorku se opět uvádí jako TEAC [67, 70].



Obrázek 12: Struktura ABTS

1.4.2.4 Metoda ORAC

Metoda ORAC využívá schopnosti látek zastavit či zpomalit reakci radikálů v systému, který obsahuje kyslíkové radikály. Po reakci s radikálem se sleduje úbytek fluorescence β -fykoerytrinu. Pro generaci hydroxylových radikálů se využívá měďnatý systém s peroxidem vodíku, pro peroxylové AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid). Metoda je sledována spektrofotometricky při vlnové délce 520 nm [71].

1.4.3 Stanovení fenolických sloučenin

Celkový obsah fenolických sloučenin lze měřit metodou dle Folin-Ciocalteua [72, 73]. Principem této spektrofotometrické metody je redukce směsi fosfomolybdenanu a fosfowolframu v zásaditém prostředí za vzniku modrého zbarvení, které se monitoruje při vlnové délce 750 nm. Jako standard se zde používá kyselina gallová a výsledky se uvádí jako GAE (gallic acid equivalent) [73].

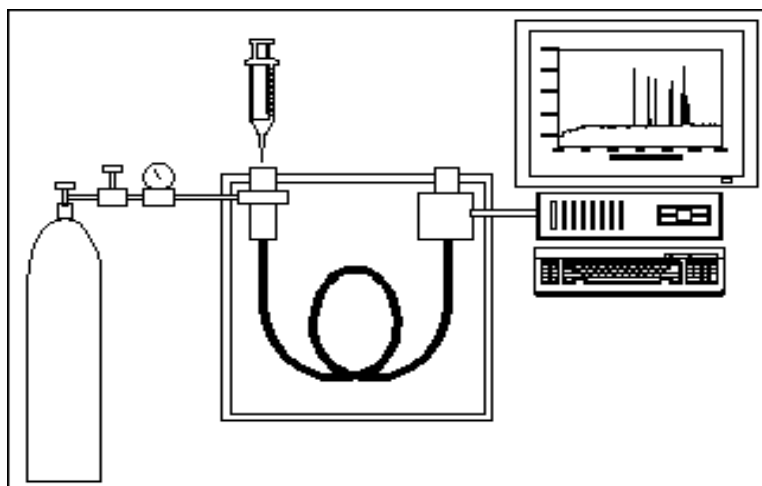
1.4.4 Chromatografie

Chromatografie je separační metoda založená na principu oddělování jednotlivých složek směsi mezi stacionární a mobilní fází. Stacionární fáze je fází nepohyblivou, zatímco mobilní fáze je pohyblivá. Stacionární fází je buď pevná látka nebo kapalina zakotvená na pevném nosiči. Mobilní fází je kapalina nebo plyn [74]. K distribuci jednotlivých složek mezi mobilní a stacionární fází dochází na základě jejich rozdílné afinity k těmto fázím [74].

Mezi nejjednodušší typy chromatografie patří papírová chromatografie a tenkovrstvá chromatografie. Pro náročnější separace využíváme plynovou chromatografii (GC – Gas Chromatography) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) [72, 74].

1.4.4.1 Plynová chromatografie

V plynové chromatografii dochází k separaci látek mezi pohyblivou plynnou fází a nepohyblivou kapalnou či pevnou fází. Pomocí GC lze analyzovat pouze látky těkavé, které lze za podmínek separace zplynit. Vzorek je dávkován do proudu inertního plynu (H_2 , N_2) a je unášen do kolony. Zde se látky separují a při výstupu z kolony jsou detekovány. Z chromatografického záznamu určíme zastoupení jednotlivých složek ve směsi [75]. Základní schéma plynového chromatografu je znázorněno na obrázku 13.



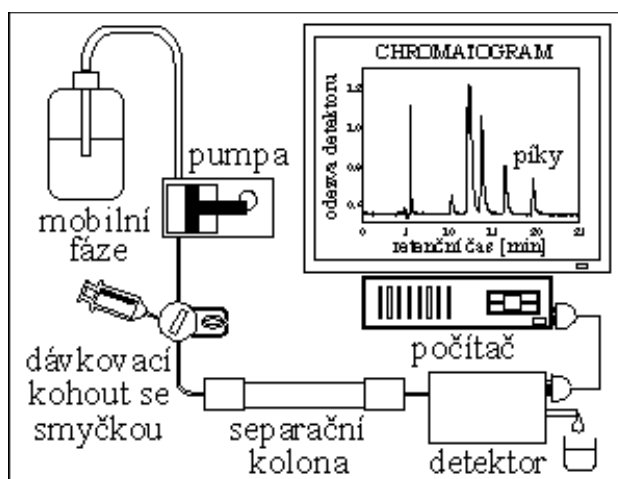
Obrázek 13: Schéma plynového chromatografu [75]

1.4.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je vhodnou metodou pro separaci méně těkavých kapalných a tuhých organických sloučenin. Složky se rozdělují mezi stacionární fází zakotvenou v koloně a mobilní fází, která je vždy kapalná (voda, organická rozpouštědla). Základní schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu je znázorněné na obrázku 14 a skládá se ze zásobníku mobilní fáze, čerpadla, kolony, dávkovacího zařízení, detektoru a počítače [74].

Mobilní fáze je čerpána vysokotlakým čerpadlem, které musí splňovat určité podmínky. Musí být tvořeno odolným materiálem a zajišťovat požadovaný průtok. Dále je mobilní fáze vedena do dávkovacího zařízení, které se nachází před separační kolonou. Do dávkovacího zařízení se dávkuje jednotlivé kapalně vzorky, a to pomocí injekční stříkačky. Existují i tzv.

autosamplery, což jsou automatické dávkovače řízené počítačem a nevyžadují tedy obsluhu. Společně pak mobilní fáze se vzorkem putují do kolony, kde dochází k ustavení rovnováhy a separaci analytů. Nejčastěji se používají náplňové kolony z nerezové oceli s délkou 5-25 cm. Po průchodu separační kolonou jsou analyty detekovány. Na detektory jsou kladeny vysoké nároky, jako jsou citlivost, nízká úroveň šumu, univerzálnost a nízká cena. Nejčastěji používanými detektory u HPLC jsou spektrofotometrické, hmotnostní, fluorimetrické, vodivostní a infračervené. Získaný elektrický signál se zpracuje a vyhodnotí ve formě chromatogramu. Podle relativní polaritě stacionární a mobilní fáze můžeme v kapalinové chromatografii klasifikovat různé chromatografické systémy. Základními chromatografickými systémy jsou systém s normálními fázemi a systém s obrácenými fázemi. V systému s normálními fázemi platí, že stacionární fáze je polární a mobilní fáze nepolární (pentan, hexan). Oproti tomu systém s obrácenými fázemi obsahuje polární mobilní fázi a nepolární stacionární fázi [75].



Obrázek 14: Schéma kapalinového chromatografu [75]

1.5 Stanovení biologicky aktivních látek ve spirulině a chlorelle

Jednou z nejdůležitějších částí analýzy námi sledovaných látek je extrakce. Základem je vybrat vhodný typ rozpouštědla, aby byla zajištěna co nejúčinnější extrakce a nedocházelo tak k degradaci analyzovaných látek. Nejčastěji se používají polární rozpouštědla jako jsou voda, methanol, ethanol a jejich vodné směsi [29, 80]. Důležitou roli při extrakci hraje také teplota [13, 80, 81], doba skladování a hodnota pH [13, 80]. Extrakce nejčastěji probíhají při pokojových teplotách, mohou však probíhat i při teplotách vyšších v rozmezí 60-170 °C [80]. Pro extrakci řas se nejčastěji využívá extrakce v systému pevná látka–kapalina či Soxhletova extrakce. Novějšími metodami jsou extrakce nadkritickou tekutinou (SFE) a extrakce tlakovou kapalinou (PLE), která splňuje požadavky tzv. zelené technologie [80, 81].

Ke spektrofotometrickému stanovení antioxidační kapacity u spiruliny a chlorelly se nejčastěji využívají metody ABTS [13, 77], DPPH [13, 73, 77] nebo FRAP [13]. Obsah fenolických látek se stanovuje pomocí metody Folin-Ciocalteu [13, 73]. K identifikaci bioaktivních látek obsažených v řasách lze použít také separační chromatografické metody, zejména vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii [23, 80] a plynovou chromatografii [59].

Hlavními antioxidanty vyskytujícími se ve spirulině jsou karotenoidy, flavonoidy, tokoferoly a fenolické látky [29, 79]. Fenolické sloučeniny jako jsou kyselina skořicová, chlorogenová, salicylová a kávová, vykazují vyšší antioxidační kapacitu než například kyseliny obsažené v sádle [29]. Hlavní antioxidační účinek chlorelly je způsoben přítomností β -karotenů, vitamínů, fenolických látek, omega-3-mastných kyselin a polynenasycených mastných kyselin [59, 79].

Pomocí GC a HPLC se stanovují zejména zástupci fenolických sloučenin a barviv. Vysokou antioxidační aktivitu vykazuje barvivo fykocyanin nacházející se ve spirulině a zelené barvivo chlorofyl [80], které je obsaženo v obou řasách. Obsah tokoferolů a karotenoidů včetně zeaxantinu, astaxantinu a luteinu lze identifikovat metodou HPLC v systému s obrácenými fázemi. Separace probíhá na koloně naplněné chromosilem (C18) a jako mobilní fáze jsou použity roztoky methanolu a acetonitrilu [23].

Bylo zjištěno, že přidáním spiruliny do potravin dochází se zvýšením antioxidační aktivity až o dvojnásobek původní hodnoty [13]. Chlorella prokázala silný antioxidační účinek ve srovnání s některými druhy zeleniny pomocí testu DPPH [49].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

- UV/VIS spektrofotometr UV-2450 (Shimatzu, Japonsko)
- Centrifuga (Fisher Scientific, ČR)
- Analytické váhy Sartorius (Göttingen, Německo)
- Automatické pipety
- Handystep
- Centrifugační zkumavky
- Skleněná kyveta, S/G10, optická délka 10 mm (Fisher Scientific, ČR)
- Skleněné vialky, 4 ml
- Špičky na pipety
- Stříkačky 1-5 ml
- Stříkačkové filtry 0,45 μm , 13 mm (Labicom, ČR)
- Běžné laboratorní nádobí

2.2 Chemikálie

- ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina (Sigma Aldrich, USA)
- DPPH: 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazil (Sigma Aldrich, USA)
- TPTZ: 2,4,6-tripyridyl-s-triazin (Sigma Aldrich, USA)
- Chlorid železitý FeCl_3 (Penta, ČR)
- Kyselina octová CH_3COOH (Penta, ČR)
- Folin-Ciocalteua činidlo, 2M (Sigma Aldrich, USA)
- Uhličitan sodný Na_2CO_3 (Penta, ČR)
- Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina (Sigma Aldrich, USA)
- Kyselina gallová (Penta, ČR)
- Methanol pro HPLC (Sigma Aldrich, USA)
- Destilovaná voda

2.3 Vzorky a rozpouštědla

Pro analýzu antioxidační kapacity bylo použito 12 vzorků řas spirulina a chlorella znázorněno v tabulce 4. Vzorky byly dostupné ve formě prášku nebo tablety. V případě tablety byl vzorek převeden na práškovou formu rozmělněním v třecí misce. Jako rozpouštědla byly použity destilovaná voda, 50 % methanol a 100 % methanol.

Vzorek „supergreens jablečný fresh“ obsahuje kromě spiruliny a chlorelly také mladý ječmen, mladou pšenici, mix extraktů z ovoce, zeleniny a rostlin, směs hub Reishi a Cordyces a v neposlední řadě směs trávicích enzymů Bromelainu a Papainu.

Tabulka 4: Vzorky použité ke stanovení bioaktivních látek

Název	Výrobce	Typ vzorku	Forma
Supergreens jablečný fresh	Czech Virus	směs zelených superpotravin	prášek
Taiwan Chlorella	Energy	čistá chlorella	tableta
Spirulina Barley	Energy	spirulina–zelený ječmen	tableta
Hawaii Spirulina	Energy	čistá spirulina	tableta

2.4 Příprava extraktu

Ke 100 mg jemného prášku vzorků výše zmíněných řas bylo přidáno 10 ml extrakčního činidla (destilovaná voda, 50 % methanol a 100% methanol). Vzorky byly extrahovány v centrifugačních zkumavkách po dobu 10 minut. Pro oddělení nerozpustného podílu byla provedena centrifugace (13500 rpm, 2 minuty). Získané extrakty byly poté přefiltrovány pomocí stříkačkového filtru (0,45 μm). Takto připravené extrakty byly proměřeny spektrofotometricky. Označené extrakty jsou znázorněny v tabulce 5.

Tabulka 5: Extrakty ve zvoleném rozpouštědle

Označení	Vzorek	Rozpouštědlo
J1	směs supergreens jablečný fresh	destilovaná voda
J2	směs supergreens jablečný fresh	50 % methanol
J3	směs supergreens jablečný fresh	100 % methanol
Ch1	Taiwan Chlorella	destilovaná voda
Ch2	Taiwan Chlorella	50 % methanol
Ch3	Taiwan Chlorella	100 % methanol
SB1	Spirulina-Barley	destilovaná voda
SB2	Spirulina-Barley	50 % methanol
SB3	Spirulina-Barley	100 % methanol
S1	Hawaii Spirulina	destilovaná voda
S2	Hawaii Spirulina	50 % methanol
S3	Hawaii Spirulina	100 % methanol

2.5 Spektrofotometrická analýza

2.5.1 Příprava kalibračních roztoků standardu – Trolox

K přípravě zásobního roztoku Troloxu bylo naváženo 0,0626 g standardu Troloxu do 25 ml odměrné baňky, která byla doplněna 50 % methanolem po rysku. Z tohoto zásobního roztoku byla připraveny kalibrační roztoky v rozmezí 0,01-0,1 $\mu\text{mol}/50\mu\text{l}$.

2.5.2 Příprava kalibračních roztoků standardu – kyselina gallová

K přípravě zásobního roztoku bylo naváženo 250 mg kyseliny gallové do 25 ml odměrné baňky, která byla doplněna methanolem po rysku. Z tohoto zásobního roztoku byly připraveny kalibrační roztoky v rozmezí 0,0025-0,04 $\text{mg}/50\mu\text{l}$.

2.5.3 Metoda ABTS

10 mg ABTS bylo rozpuštěno v 5 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 100 μl $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ($c=0,065$ mmol/l) a vzniklý roztok byl vložen do chladničky po dobu 14-16 hodin. Z tohoto zásobního roztoku bylo pipetováno 2,5 ml do 100 ml odběrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Absorbance vzniklého roztoku by se měla pohybovat v rozmezí 0,8-0,9. Pomocí dávkovače byly pipetovány 3 ml reakční směsi, ke kterým bylo přidáno 50 μl extraktu vzorku a důkladně promícháno. Při optimalizaci byl úbytek absorbance sledován při vlnové

délce 734 nm v intervalech po 5 minutách do 60 minut, po 10 minutách do 90 minut. Pro následovné zjištění antioxidační aktivity byl měřen úbytek po 60 minutách. Úbytek absorbance byl přepočítán pomocí kalibrační křivky na ekvivalentní množství standardu Troloxu.

2.5.4 Metoda DPPH

4 mg DPPH bylo odváženo do 25 ml odměrné baňky a doplněno methanolem po rysku. Vzniklý roztok byl naředěn 1:4 a poté byla absorbance upravena na hodnotu 0,8-0,9. Ke 3 ml reakční směsi bylo přidáno 50 μ l extraktu vzorku a vše bylo promícháno. Při studii rychlosti reakce byl měřen úbytek absorbance po 5 minutách do 50 minut při vlnové délce 515 nm. Pro zjištění antioxidační aktivity připravených extraktů byla zvolena doba reakce 30 minut. Úbytek absorbance byl poté přepočítán pomocí kalibrační křivky na ekvivalentní množství standardu Troloxu.

2.5.5 Metoda FRAP

Pracovní roztok byl připraven smícháním vodných roztoků FeCl_3 ($c = 20 \text{ mmol/l}$), TPTZ ($c = 10 \text{ mmol/l}$) okyseleného 5 % HCl ($c = 40 \text{ mmol/l}$) a octanového pufru ($c = 0,3 \text{ mol/l}$, pH 3,6) v poměru FeCl_3 :TPTZ:octanový pufr 1:1:10. Dávkovačem byly pipetovány 3 ml reakční směsi, přidáno 50 μ l extraktu vzorku a promícháno. Nárůst absorbance byl sledován při vlnové délce 593 nm po 10 minutách.

2.5.6 Stanovení fenolických sloučenin – Folin-Ciocalteuova metoda

Pracovní roztok byl připraven pomocí 2 M Folin-Ciocalteuova činidla, které bylo naředěno destilovanou vodou v poměru 1:20. Ke 2 ml činidla bylo přidáno 50 μ l vzorku. Směs byla promíchána a ponechána 5 minut stát. Po uplynutí doby byl do směsi přidán 1 ml 7,5% Na_2CO_3 . Nárůst absorbance byl měřen při vlnové délce 750 nm po celkové době 35 minut a pomocí kalibrační křivky přepočítán na ekvivalentní množství kyseliny gallové.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Optimalizace spektrofotometrických metod

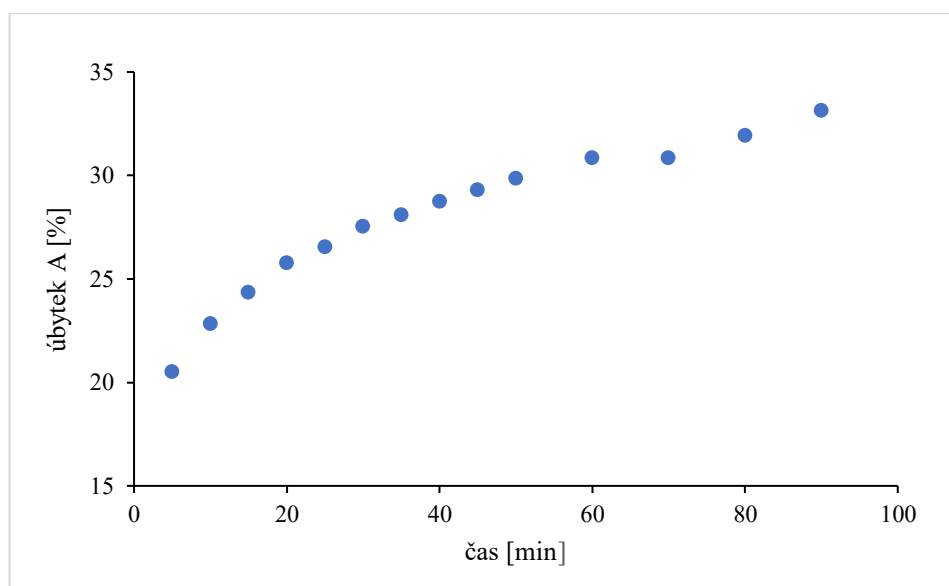
Nejprve byla provedena optimalizace reakčního času radikálu s antioxidantem u metod ABTS a DPPH. Pro optimalizaci metod byl použit vzorek směsi supergreens jablko. Pro měření byl zvolen objem vzorku 50 μl pro obě metody. Úbytek absorbance byl vypočítán pomocí následujícího vztahu (rovnice 3):

$$\text{úbytek [\%]} = \frac{A_{blank} - A_{vz}}{A_{blank}} * 100 \quad (3)$$

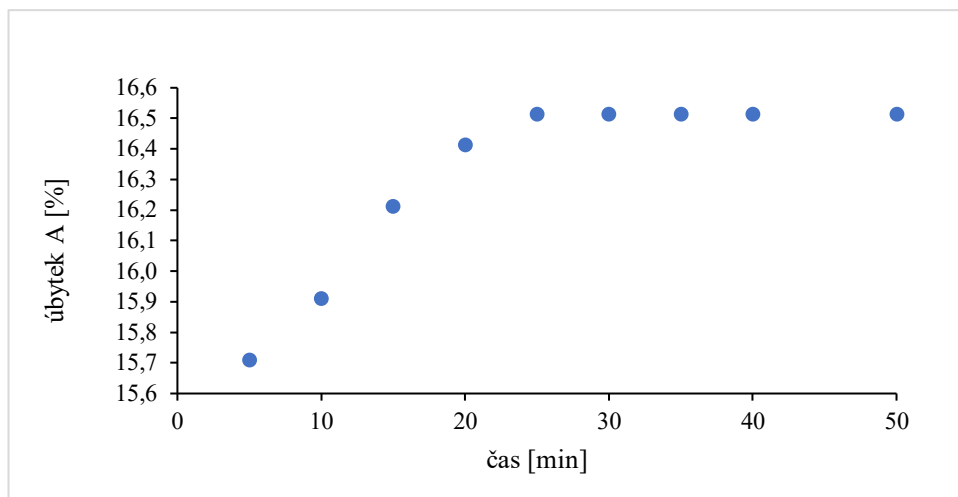
A_{blank} absorbance blanku (slepý pokus)

A_{vz} absorbance vzorku

Po smíchání vzorku s činidlem byla sledována rychlost reakce při dané vlnové délce měřením úbytku absorbance po 5 minutách do 60 minut, po 10 minutách do 90 minut u metody ABTS a u metody DPPH byl měřen úbytek absorbance po 5 minutách do 50 minut. Z grafu závislosti absorbance na reakční době byla zvolena optimální doba pro měření 60 minut u ABTS (obrázek 15) a 30 minut u DPPH (obrázek 16). Optimalizace pro metodu FRAP je převzatá z diplomové práce [76], kde byla zvolena optimální doba pro měření 10 minut.



Obrázek 15: Úbytek absorbance v závislosti na čase u metody ABTS



Obrázek 16: Úbytek absorbance v závislosti na čase u metody DPPH

Pro porovnání získaných výsledků byl úbytek absorbance přepočítán pomocí kalibrační křivky na ekvivalentní množství standardu Troloxu (TEAC). Kalibrační křivka byla sestavena proměřením devíti kalibračních roztoků a každý kalibrační roztok byl proměřen třikrát. Pro statistickou analýzu dat byl použit program QC Expert, ve kterém byly odstraněny vlivné body pomocí grafických diagnostik a pomocí Studentova t-testu byla sledována významnost regresních parametrů. Kalibrační křivky jsou spolu s rovnicí regrese a směrodatnými odchylkami jednotlivých parametrů uvedeny v příloze (obrázek P1-P3).

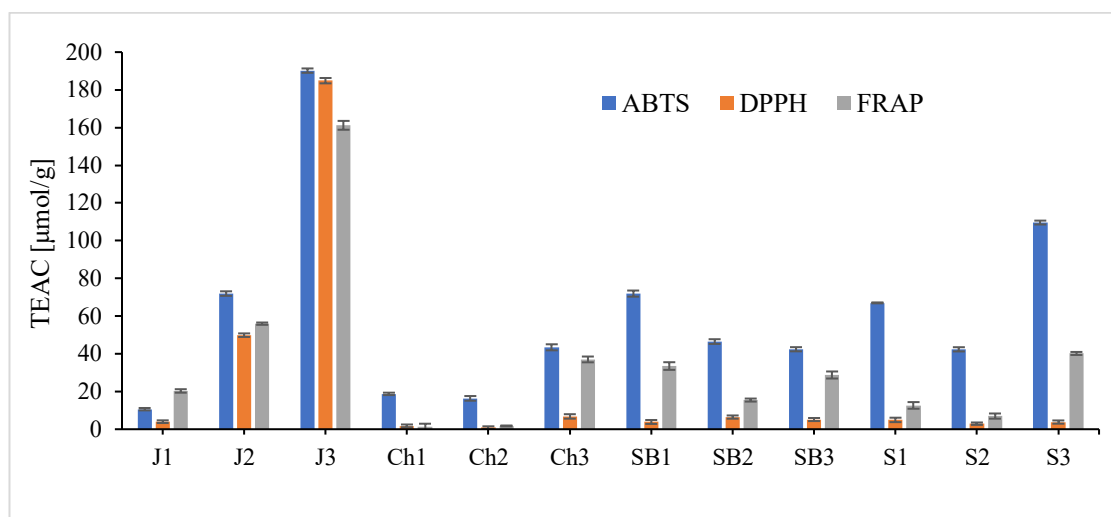
3.2 Stanovení antioxidační aktivity

Pro stanovení antioxidační kapacity bylo použito celkem 12 extraktů připravených z řas spirulina a chlorella pomocí tří různých extrakčních činidel – destilovaná voda, 50% metanol a 100 metanol. Před samotnou analýzou byly všechny vzorky upraveny podle postupu, který je uveden v kapitole 2.4 a proměřeny celkem pětkrát. V příloze (tabulka P5-P7) jsou uvedeny průměrné hodnoty TEAC se směrodatnými odchylkami získanými u metod ABTS, DPPH a FRAP.

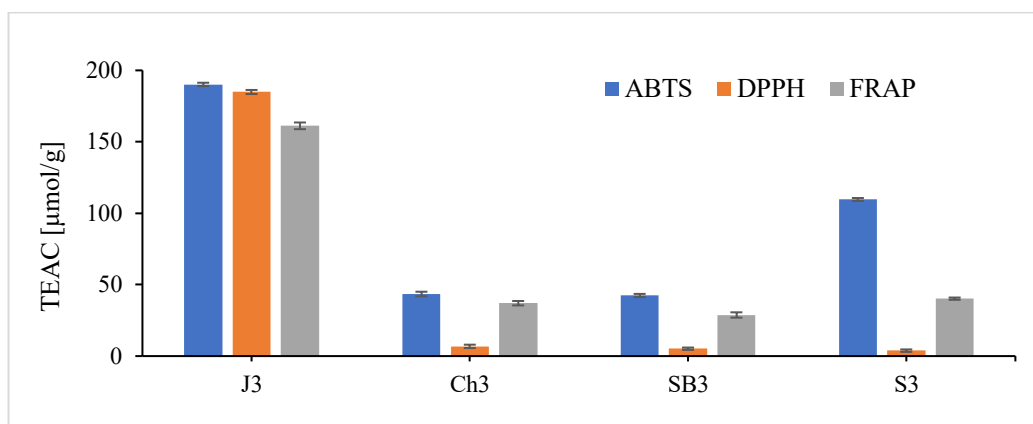
Na obrázku 17 můžeme vidět srovnání naměřených hodnot antioxidační aktivity u metod ATBS, DPPH a FRAP. Můžeme si všimnout, že hodnoty ABTS jsou téměř ve všech případech vyšší s výjimkou prvního vodného vzorku u metody FRAP. Důvodem vyšších hodnot u ABTS je schopnost tohoto radikálu reagovat s většinou antioxidantů. Nižší hodnoty pak nalezneme u DPPH, protože jde o činidlo více selektivní, které s některými typy látek nereaguje. Největší rozdíl mezi hodnotami TEAC změřených pomocí různých metod je pozorovatelný u čisté spiruliny a čisté chlorelly. Naopak nejmenší rozdíl pak nalezneme u směsi

s příchutí jablka, protože tato směs neobsahuje pouze řasy, ale další příměsi, díky nimž vzorek obsahuje antioxidanty reagující se všemi použitými činidly.

Patrného rozdílu si můžeme všimnout také u použitého rozpouštědla, kde nejvyšší hodnoty byly naměřeny u 100 % methanolu (obrázek 18). Methanol se považuje za jedno z nejlepších rozpouštědel, protože do něj přechází nejvíce látek s antioxidační aktivitou. Ze získaných hodnot je zřejmé, že několikanásobně vyšší antioxidační aktivitu vykazuje vzorek směsi zelených superpotravin s příchutí jablka. Právě přítomnost ovocných extraktů může mít na stanovení výrazný vliv, jelikož se zde vyskytují další antioxidanty jako jsou fenolické kyseliny a flavonoidy. Vysokou antioxidační aktivitu měřenou pomocí metody ABTS, kromě vzorku supergreens, vykazují také vzorky spiruliny. Naopak vyšší hodnoty naměřené u DPPH a FRAP byly zaznamenány u chlorelly. Tyto experimentální poznatky se shodují i se studií [77].



Obrázek 17: Stanovení antioxidační aktivity u vzorků řas



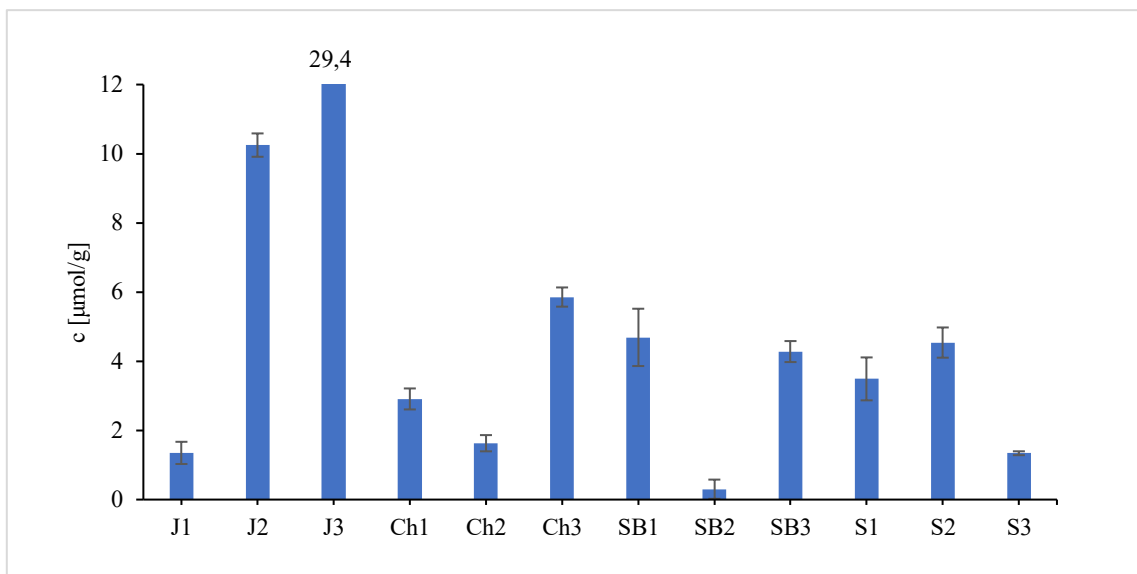
Obrázek 18: Porovnání antioxidační aktivity u methanolyckých extraktů

3.3 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Optimalizace metody Folin-Ciocalteua je převzatá z diplomové práce Bc. Terezy Šalomounové [78], kde byla zvolena optimální doba pro měření 35 minut. Pro porovnání získaných výsledků byl nárůst absorbance přepočítán na ekvivalentní množství kyseliny gallové. Kalibrační křivka byla opět sestavená na základě měření devíti kalibračních roztoků a každý z nich byl proměřen třikrát. Pro statistickou analýzu dat byl použit program QC Expert, ve kterém byly odstraněny vlivné body stejným způsobem jako u předchozích metod. Kalibrační křivka spolu se směrodatnými odchylkami a koeficientem determinace a směrodatnými odchylkami jednotlivých parametrů je uvedena v příloze (obrázek P4).

Pro stanovení celkového množství fenolických sloučenin byly použity stejné extrakty jako u antioxidační aktivity. Před samotnou analýzou byly všechny vzorky upraveny podle postupu, který je uveden v kapitole 2.4. a byly proměřeny pětkrát. Průměrný obsah fenolických sloučenin u vzorků je uveden v příloze (tabulka P8) a graficky znázorněn na obrázku 19. U vzorku směsi zelených superpotravin s příchutí jablka se hodnoty v porovnání s ostatními vzorky výrazně liší. Důvodem je právě přítomnost dalších látek, které reagují s Folinovým činidlem a zvyšují tak celkový obsah fenolických sloučenin oproti řasám.

Obsah fenolických sloučenin u vzorků řas se pohybuje v rozmezí 0,3-29,4 $\mu\text{mol/g}$. Z obrázku 19 můžeme vidět, že nejvyšší obsah fenolických látek byl naměřen u vzorku J2, J3 a Ch3, nejmenší pak u vzorku SB2. Množství fenolických látek u čisté spiruliny se pohybuje v rozmezí 1,34-4,54 $\mu\text{mol/g}$, u chlorelly 1,63-5,86 $\mu\text{mol/g}$ a u vzorku spirulina-barley v rozmezí 0,3-4,69 $\mu\text{mol/g}$. Rozdíl můžeme opět pozorovat u použitých rozpouštědel, kde se jako nejlepším rozpouštědlem u vzorků, supergreens, čisté chlorelly a kombinace spiruliny-mladý zelený ječmen jeví 100 % methanol, u vzorku čisté spiruliny 50 % methanol. Vysoký obsah fenolických sloučenin u chlorelly může být způsoben přítomností floroglucinu, jak je popsáno v literatuře [79].



Obrázek 19: Stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin u vzorků řas

4 ZÁVĚR

Náplní této bakalářské práce bylo stanovení biologicky aktivních látek obsažených v řasách. Mikrořasy spirulina a chlorella jsou komerčně vyráběny a distribuovány jako doplňky stravy, které se díky vysokému obsahu nutričních látek a pozitivním účinkům na lidské zdraví řadí mezi tzv. superpotravinu. Mezi nejvíce zastoupené účinné látky patří karotenoidy, fenolické sloučeniny, barviva, vitamíny a polynenasycené mastné kyseliny.

Před samotnou analýzou se provádí extrakce ve vhodném rozpouštědle. Nejčastěji se využívá extrakce v systému pevná látka–kapalina, extrakce dle Soxhleta či extrakce nadkritickou tekutinou. Rozpouštědly bývají obvykle voda, methanol nebo ethanol. Pro stanovení a separaci bioaktivních látek se s oblibou využívají spektrofotometrické a chromatografické metody.

Pro stanovení antioxidační aktivity byly použity 4 vzorky řas spirulina a chlorella, které byly extrahovány třemi rozpouštědly. Analýza byla prováděna spektrofotometrickými metodami ABTS, DPPH a FRAP. Dále bylo stanoveno celkové množství fenolických látek metodou dle Folin-Ciocalteu. Největší množství antioxidačních a fenolických látek obsahuje vzorek směsi zelených superpotravin s příchutí jablka. V tomto vzorku jsou zastoupeny obě řasy spolu s dalšími látkami, které vykazují antioxidační vlastnosti. Nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity byly zaznamenány pomocí metody ABTS, nejmenší pak metodou DPPH. Nejlepším rozpouštědlem byl 50 % a 100 % methanol, do kterého přechází nejvíce látek s antioxidační aktivitou.

Závěrem lze říci, že řasy spirulina a chlorella prokázaly významný antioxidační potenciál a jsou tak významným zdrojem funkčních potravin, nutraceutik a potravinových doplňků.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] GUPTA, E., MISHRA, P. Functional Food with Some Health Benefits, So Called Superfood: A Review. *Current Nutrition&Food Science*. **2021**, 17 (2), 144-166.
- [2] PROESTOS, Charalampos. Superfoods: Recent Data on their Role in the Prevention of Diseases. *Current Research in Nutrition and Food Science*. **2018**, 6 (3), 576-593.
- [3] TAULAVUORI, Kari, JULKUNEN-TIITTO, Riitta, HYOKY, Valtteri, TAULAVUORI, Erja. Blue Mood for Superfood. *Natural product communication*. **2013**, 8 (6), 791-794.
- [4] SINGH, Monika, Prakash, SONI, Kritika, BHAMRA, Rashmi, MITTAL, Ravi, Kumar. Superfood: Value and Need. *Current Nutrition&Food Science*. **2022**, 18 (1). 65-68.
- [5] JAGDALE, Y. D., MAHALE, S. V., ZOHRA, B., NAYIK, G. A., DAR, A. H., KHAN, K. A., ABDI, G., KARABAGIAS, I. K. Nutritional Profile and Potential Health Benefits of Super Foods: A Review. *Sustainability*. **2021**, 13 (16), 9240.
- [6] ONNEKEN, Peter. Salvia hispanice L (Chia Seeds) as Brain Superfood: How Seeds Increase Intelligence. *Global Journal of Health Science*. **2018**, 10 (7), 69-72.
- [7] HASSOUN, A., HARASTANI, R., JAGTAP, S., TROLLMAN, H., GARCIA-GARCIA, G., AWAD, N. M. H., ZANNOU, O., GALANAKIS, Ch. M., GOKSEN, G., NAYIK, G. A., RIAZ, A., MAQSOOD, S. Truths and myths about superfoods in the era of the COVID-19 pandemic. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. **2022**, 1-18.
- [8] WOLFE, David. *Superfoods: The food and medicine of the future*. Berkeley, California: North Atlantic Books, 2009. 352 s. ISBN: 1556437765
- [9] DAUGHERTY, Bethany. Superfoods: The Healthiest Foods on the Planet. *Journal of Nutrition Education and Behavior*. **2011**, 43 (3), 207.
- [10] SONI, Ruma, Arora, SUDHAKAR, K., RANA, R. S. Spirulina - From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science & Technology*. **2017**, 69, 157-171.
- [11] ALI, S., SALEH, A. M. Spirulina – An overview. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **2012**, 4 (3), 9-15.
- [12] HAYASHI, T., HAYASHI, K., MAEDA, M., KOJIMA, I. Calcium Spirulan an Inhibitor of Enveloped Virus Replication, from a Blue-Green Alga Spirulina platensis. *Journal of Natural products*. **1996**, 59 (1), 83-87.
- [13] ALMEIDA, L. M. R., DA SILVA CRUZ, L. F., MACHADO, B. A. S., NUNES, I. L., COSTA, J. A.V., DE SOUZA FERREIRA, E., LEMOS, P. V. F., DRUZIAN, J. I., DE SOUZA, C. O. Effect of the addition of Spirulina sp. biomass on the development and characterization of functional food. *Algal Research*. **2021**, 58.
- [14] FOX, R. D. *Spirulina-Production and Potencial*. Edisud a Aix-en-Provence, 1996. 232 s.
- [15] DE OLIVIERA, M. A. C. L., MONTEIRO, M. P. C., ROBBS, P. G., LEITE, S. G. F., Growth and chemical composition of Spirulina maxima and Spirulina platensis biomass at different temperatures. *Aquaculture International*. **1999**, 7 (4), 261-275.
- [16] COHEN, Z., VONSHAK, A. Fatty acid composition of Spirulina and spirulina-like cyanobacteria in relation to their chemotaxonomy. *Phytochemistry*. **1991**, 30 (1), 205-206.

- [17] SONI, R. A., SUDHAKAR, K., RANA, R. S. Influence of Temperature and Light Intensity on the Growth Performance of *Spirulina platensis*. *International Journal on Emerging Technologies*. **2019**, 10(2), 19-22.
- [18] DRABINA, P. Bioorganická chemie. 1st ed. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2020. 242 s. ISBN 978-80-7560-316-6.
- [19] SARMA, A. P., PETAR, P., MURTHY. S. D. S. Spirulina as a Source of Single Cell Protein. *Vegetos*. **2008**, 21 (1), 35-45.
- [20] MARKOU, G. Alteration of the biomass composition of *Athrospira* (*Spirulina*) *platensis* under various amounts of limited phosphorus. *Bioresource Technology*. **2012**, 116, 533-535.
- [21] RISS, J. DÉCORDÉ, K., SUTRA, T., DELAGE, M., BACCOU, J. C., JOUY, N., BRUNE, J. P., ORÉAL, H., CRISTOL, J. P., ROUANET, J. M. Phycobiliprotein C-phycoyanin from *Spirulina platensis* powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. *J Agric Food Chem*. **2007**, 55 (19), 7962-7969.
- [22] DHALLA, N. S., TEMSAH, R. M., NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. **2000**, 18 (6), 655-673.
- [23] EL-BAKY, H. H. A., EL-BAZ, F. K., EL-BAROTY, G. S. Spirulina Species as a Source of Carotenoids and α -Tocopherol and its Anticarcinoma Factors. *Biotechnology*. **2003**, 2 (3), 222-240.
- [24] ROMAY, C., ARMESTO, J., REMIREZ, D., GONZALEZ. R., LEDON, N., GARCIA, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae. *Immflamation Research*. **1998**, 47, 36-41.
- [25] DENG, R. T., CHOW. T. J. Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics*. **2010**, 28 (4), 33-45.
- [26] CINGI, C., CONK-DALAY, M., CAKLI, H., BAL, C. The effect of spirulina on allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. **2008**, 265 (10), 1219-1223.
- [27] MAO, T. K., WATER, J. V., GERSCHWIN, M. E. Effects of a Spirulina-Based Dietary Supplement on Cytokine Production from Allergic Rhinitis Patiens. *Journal of Medicinal Food*. **2005**, 8 (1), 27-30.
- [28] DARTSCH. P, C. Antioxidant potential of selected *Spirulina platensis* preparations. *Phytotherapy Research*. **2008**, 22 (5), 627-633.
- [29] MIRANDA, M. S., CINTRA, R. G., BARROS, S. B. M., MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of the microalgae *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **1998**, 31, 1075-1079.
- [30] HO, CH. T. Phenolic Compounds in Food. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II*. **1992**, 507 (1), 2-7.
- [31] Zexanthin. *The Merck Index* online* [online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry, ©2023. Last Revised 2013 [cit. 14.2.2023]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m11586/zeaxanthin?q=authorize>.

- [32] WHITEHEAD, A.J., MARES, J. A., DANIS, R. P. Macular Pigment: A Review of Current Knowledge. *Arch Ophthalmol.* **2006**, 124 (7), 1038-1045.
- [33] SHAZIA, S. A., MCGREGOR, N. L., DENNIS, M. M. The Macular Xanthophylls. *Survey of Ophthalmology.* **2005**, 50 (2), 183-193.
- [34] YU, B., WANG, J., SUTER, P. M., RUSSEL, R. M., GRUSAK, M. A., WANG, Y., WANG, Z., YIN, S., TANG, G. Spirulina is an effective dietary source of zeaxanthin to humans. *British Journal of Nutrition.* **2012**, 108 (4), 611-619.
- [35] SEDDON, J. M., AJANI, U. A., SPERDUTO, R. D., Dietary Carotenoids, Vitamins A, C, and E, and Advanced Age-Related Macular Degeneration. *JAMA.* **1994**, 272 (18), 1413-1420.
- [36] BASF SE. Method for Producing Carotenoids. Inventors: ERNST, H., HENRICH, K., KELLER, A. PCT/EP2003/012804. WO2004/048323 A1. 10.6.2004.
- [37] KHACHIK, F. Synthesis of (3R, 3R)-zeaxanthin and its meso-stereoisomer from (3R, 3R, 6R)-lutein via (3R)-3,4-anhydrolutein. *Synthesis.* **2012**, 44 (3), 453-459.
- [38] PARIKH, P., MANI, U., IYER, U. Role of Spirulina in the Control of Glycemia and Lipidemia in Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Medicinal Food.* **2004**, 4 (4), 193-199.
- [39] MAO, T. K., WATER, J. V., GERSHWIN, M. E. Effects of Spirulina on the Secretion of Cytokines from Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Journal of Medicinal Food.* **2009**, 3 (3), 135-140.
- [40] SAFI, C., ZEBIB, B., MERAH, O., PONTALIER, P. Y., VACA-GARCIA, C. Morphology composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* **2014**, 35, 265-278.
- [41] BITO, T., OKUMURA E., FUJISHIMA, M., WATANABE, F. Potential of *Chlorella* as a Dietary Supplement to Promote Human Health. *Nutritiens.* **2020**, 12 (9), 2524.
- [42] PANAH, Y., DARVISHI, B., IOWZI, N., BEIRAGHDAR, F., SAHEBKAR, A. *Chlorella vulgaris*: A Multifunctional Dietary Supplement with Diverse Medicinal Properties. *Current Pharmaceutical Design.* **2016**, 22 (2), 164-173.
- [43] NISHIMOTO, Y., NOMAGUCHI, T., MORI, Y., ITO, M., NAKAMURA, Y., FIJISHIMA, M., MURAKAMI, S., YAMADA, T., FUKUDA, S. The Nutritional Efficacy of *Chlorella* Supplementation Depends on the Individual Gut Environment: A Randomised Control Study. *Sec. Nutrition and Microbes.* **2021**, 8.
- [44] KOTRBACEK, V., DOUBEK, J., DOUCHA, J. The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. *Journal of Applied Phycology.* **2015**, 27 (6), 2173-2180.
- [45] NAKANISHI, K., DEUCHI, K. Culture of a high-chlorophyll-producing and hatolerant *Chlorella vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* **2014**, 117 (5), 617-619.
- [46] SAMUEL, I. B., APPLEMAN, D. Chlorophyll Synthesis in *Chlorella*. *Plant Physiol.* **1971**, 45, 230-235.
- [47] MOSELEY, N. Hemoglobin vs Chlorophyll. *Health&Fitness.* **2012**.
- [48] HSU, H. Y., JEYASHOKE, N., YEH, C. H., SONG, Y. J., HUA, K. F., CHAO, L. K. Immunostimulatory Bioactivity of Algal Polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*

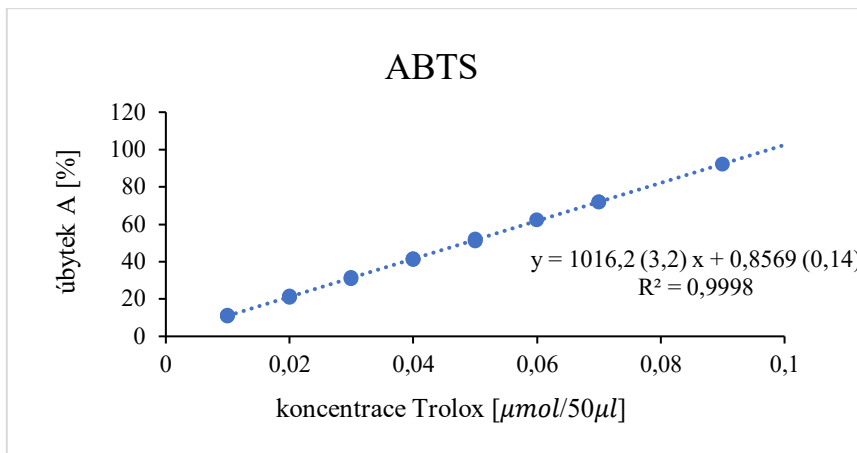
- Activates Macrophages via Toll-Like Receptor 4. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58 (2), 927-936.
- [49] SHIBATA, S., NATORI, Y., NISHIHARA, T., TOMISAKA, K., MATSUMOTO, K., SANSAWA, H., NGUYEN, V. C. Antioxidant and anti-cataract effects on rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. **2003**, 49 (5), 334-339
- [50] HAMOUDA, R. A., ABD EL LATIF, A., ELKAW, E. M., ALOTAIBI, A. S., ALENZI, A. M., HAMZA, H. A. Assessment of Antioxidant and Anticancer Activities of Microgreen Alga *Chlorella Vulgaris* and Its Blend with Different Vitamins. *Molecules*. **2022**, 27 (5), 1602.
- [51] FU, L., HUANG, T., WANG, S., WANG, X., SU, L., LI, C., ZHAO, Y. Toxicity of 13 different antibiotics towards freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and their modes of action. *Chemosphere*. **2017**, 168, 217-222.
- [52] DING, T., LIN, K., YANG, B., YANG, M., LI, J., LI, W., GAN, J. Biodegradation of naproxen by freshwater algae *Cymbella* sp. and *Scenedesmus quadricauda* and the comparative toxicity. *Bioresour Technol*. **2017**, 238, 164-173.
- [53] SHAABA, R. I., CHIA, M. A., GANA, Y. A., ALHASAN, A. B., GADZAMA, I. M. K. The growth, biochemical composition, and antioxidant response of *Microcystis* and *Chlorella* are influenced by Ibuprofen. *Environmental Science and Pollution Research*. **2022**, 30, 13118-13131.
- [54] CONAGHAN, P. G. A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative, efficacy and toxicity. *Rheumatol Int*. **2012**, 32 (6), 1491-1502.
- [55] DAI, Z. N., LUO, X., YANG, A. L., WANG, J. S., FU, H. Y., WU, Y. C. The Effects of Triclosan on Physiological and Photosynthetic Characteristics of *Chlorella vulgaris*. *Water*. **2021**, 13 (10), 1355.
- [56] SHIMADA, M., HASEWAGA, T., NISHIMURA, C., KAN, H., KANNO, T., NAKAMURA, T., MATSUBAYASHI, T. Anti-Hypertensive Effect of gamma-Aminobutyric Acid (GABA)-Rich *Chlorella* on High-Normal Blood Pressure and Borderline Hypertension in Placebo-Controlled Double Blind Study. *Clinical and Experimental Hypertension*. **2009**, 31 (4), 342-354.
- [57] BLAS-VALDIVIA, V., ORTIZ-BUTRON, R., PINEDA-REYNOSO, M., HERNANDEZ-GARCIA, A., CANO-EUROPA, E., *Chlorella vulgaris* administration prevents HgCl₂-caused oxidative stress and cellular damage in the kidney. *Journal of Applied Phycology*. **2011**, 23 (1), 53-58.
- [58] ELKINS, R. *Blue-Green Algae*. 1st ed. Woodland Publishing, 1995. 28 s. ISBN: 978-1885670182.
- [59] OTLES, S., PIRE, R. Fatty Acid Composition of *Chlorella* and *Spirulina* Microalga Species. *Journal of AOAC International*. **2001**, 84 (6), 1708-1714.
- [60] KORU, E., *Earth Food Spirulina (Athrospira): Production and Quality Standards*. Food Additive. 2012.
- [61] <http://chlorella.rebelia.cz/chlorella-vs-spirulina.html> [cit. 16.6.2023]

- [62] <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf> [cit. 19.6.2023]
- [63] SHIVHARE, H., CHINCHOLIKAR, P. Analytical Chemistry: Overview (Techniques & Applications). *Journal of Pharmaceutical Negative Results*. **2022**, 13 (4), 1364-1374.
- [64] DEAN, J. R., XIONG, G. Extraction of organic pollutants from environmental matrices: selection of extraction technique. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2000**, 19 (9), 553-564.
- [65] MULLER, E., BERGER, R., BLASS, E., SLUYTS, D., PFENNIG, A. Liquid-Liquid Extraction. In: ELVERS, Barbara, ed. *Ulmans Encyclopedia of industrial Chemistry*. ed Weinheim: Wiley-VCH, 2008, s. 250-303. Vol. 21. ISBN 9783527303854.
- [66] MAZZOLA, P. G., LOPES, A. M., HASMANN, F. A., JOZALA, A. F., PENNA, T. C. V., MAGALHAES, P. O., RANGEL-YAGUI, C. O., PESSOA, A. Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **2008**, 73 (2), 143-157.
- [67] SOCHOR, J., RYVOLOVA, M., KRYSTOFOVA, O., SALAS, P., HUBALEK, J., ADAM, V., TRNKOVA, L., HAVEL, L., BEKLOVA, M., ZEHNALÉK, J., PROVAZNIK, I., KIZEK, R. Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules*. **2010**, 15 (12), 8618-8640.
- [68] KEDARE, S. B., SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. **2011**, 48, 412-422.
- [69] MILARDOVIC, S., IVEKOVIC, D., GRABARIC, B. S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*. **2006**, 68 (2), 175-180.
- [70] BISKUP, I., GOLONKA, I. SROKA, Z., GAMIAN, A. Antioxidant activity of selected phenols estimated by ATBS and FRAP methods. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*. **2013**, 67, 958-963.
- [71] PRIOR, R. L., CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 27 (11-12), 1173-1181.
- [72] PUANGBANLANG, C., SIRIVIBULKOVIT, K., NACAPRICHA, D., SAMEENOJ, Y. A paper-based device for simultaneous determination of antioxidant activity and total phenolic content in food samples. *Talanta*. **2019**, 198, 542-549.
- [73] KEJŽAR, J., HUDOBIVNIK, M. J., NECEMER, M., OGRINC, N., RUTAR, J. M., ULRIH, N. P. Characterization of Algae Dietary Supplements Using Antioxidative Potential Elemental Composition, and Stable Isotopes Approach. *Frontiers in Nutrition*. **2021**, 7, 1-10.
- [74] COSKUN, O. Separation Techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*. **2016**, 3 (2), 156-160.
- [75] ŠTULÍK, K., ŠEVČÍK, J., PACÁKOVÁ, V., JELÍNEK, I., COUFAL, P., BOSÁKOVÁ, Z. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum. 2005.
- [76] OTRUSINOVÁ, J. *Analýza fenolických látek obsažených ve vinných hroznech a ve víně*. Univerzita Pardubice, 2008.

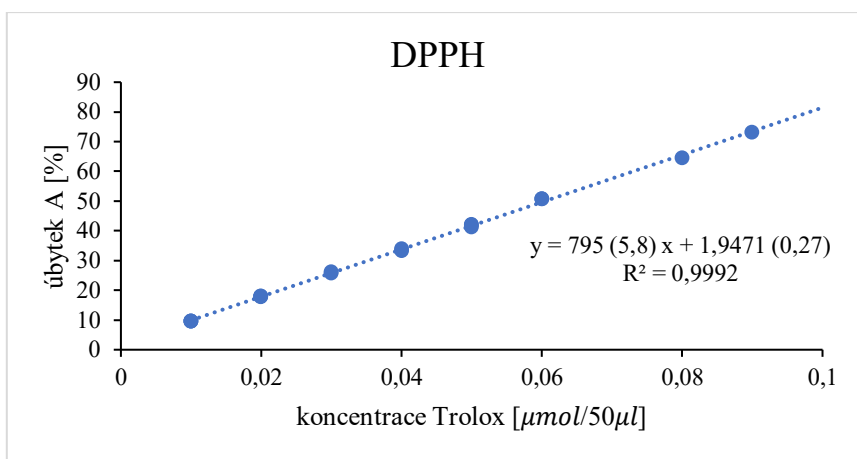
- [77] CABARKAPA, I., RAKITA, S., POPOVIC, S., TOMICIC, Z., SPASEVSKI, N., VULIC, J., DURAGIC, O. Characterization of organic Spirulina spp. and Chlorella vulgaris as one of the most nutrient-dense food. JOURNAL OF FOOD SAFETY AND FOOD QUALITY-ARCHIV FUR LEBENSMITTELHYGIENE. **2023**, 73 (3), 78-85.
- [78] ŠALOMOUNOVÁ, T. *Analýza významných biologicky aktivních látek v různých částech lichořeřišnice větší s využitím HPLC/MS/MS*. Univerzita Pardubice, 2019.
- [79] ANDRADE, L. M., ANDRADE, C. J., DIAS, M., NASCIMENTO, C. A. O., MENDES, M. A. Chlorella and Spirulina Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements: an Overview. *MOJ Food Processing and Technology*. **2018**, 6 (1), 45-58.
- [80] JAIME, L., MENDIOLA, J. A., HERRERO, M., SOLER-RIVAS, C., SANTOYO, S., SENORANS, F. J., CIFUENTES, A., IBANEZ, E. Separation and characterization of antioxidants from Spirulina platensis microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. *J. Sep. Sci.* **2005**, 28, 2111-2119.
- [81] MUSTAFA, A., TURNER, CH. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*. **2011**, 703 (1), 8-18.

6 PŘÍLOHY

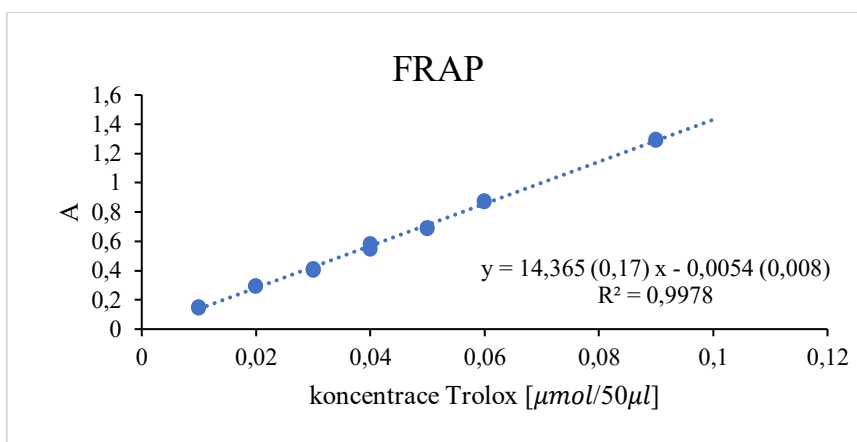
OBRÁZKY



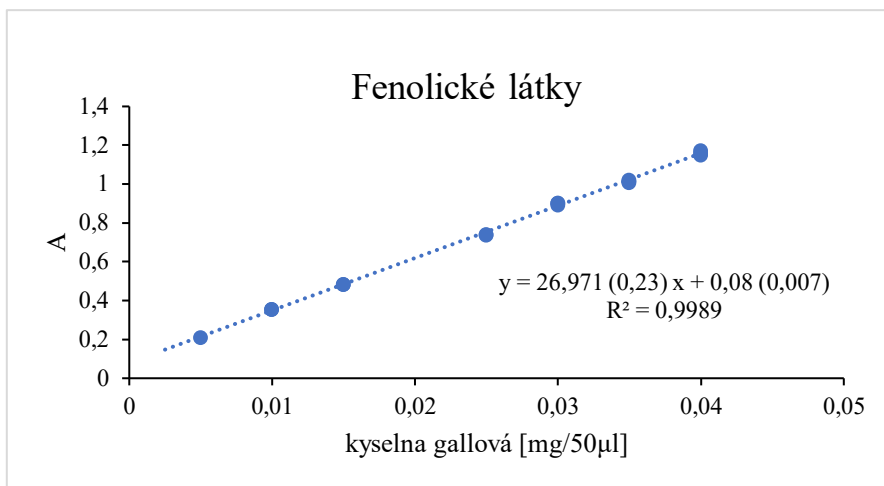
Obrázek P1: Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství Troloxu



Obrázek P2 : Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství Troloxu



Obrázek P3: Kalibrační křivka závislosti nárůstu A na množství Troloxu



Obrázek P4: Kalibrační křivka závislosti nárůstu A na množství kyseliny gallové

TABULKY

Tabulka P5: Hodnoty TEAC, ABTS

J1	10,63±0,63
J2	71,95±1,21
J3	190,196±1,15
Ch1	18,75±0,63
Ch2	16,37±1,23
Ch3	43,45±1,61
SB1	71,94±1,62
SB2	46,49±1,25
SB3	42,42±1,1
S1	67,01±0,27
S2	42,38±1,12
S3	109,61±1,03

Tabulka P6: Hodnoty TEAC, DPPH

J1	4,01±0,7
J2	49,88±0,94
J3	184,86±1,43
Ch1	1,78±0,74
Ch2	0,85±0,7
Ch3	6,8±1,18
SB1	3,86±1,04
SB2	6,45±0,86
SB3	5,15±0,81
S1	4,94±1,18
S2	2,95±0,64
S3	3,801±0,86

Tabulka P7: Hodnoty TEAC, FRAP

J1	20,31±0,92
J2	55,99±0,6
J3	161,18±2,35
Ch1	1,19±1,74
Ch2	1,74±0,23
Ch3	37,02±1,54
SB1	33,51±2,03
SB2	15,48±0,8
SB3	28,77±1,87
S1	12,63±1,77
S2	6,98±1,37
S3	40,19±0,8

Tabulka P8: Obsah fenolických látek

J1	1,35±0,32
J2	10,25±0,34
J3	29,4±0,45
Ch1	2,91±0,3
Ch2	1,63±0,23
Ch3	5,86±0,28
SB1	4,69±0,82
SB2	0,3±0,27
SB3	4,28±0,3
S1	3,49±0,62
S2	4,54±0,44
S3	1,34±0,05