

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE

FAKULTA ZÁHRADNÍCTVA A KRAJINNÉHO INŽINIERSTVA

Katedra zeleninárstva

**Akumulácia vybraných sekundárnych metabolitov v kultivarochoch
medovky lekárskej (*Melissa officinalis* L.)**

Autoreferát dizertačnej práce
na získanie vedecko-akademickej hodnosti philosophiae doctor
vo vednom odbore: 41-42-9 Záhradníctvo



Ing. Marcela Koreňová

Nitra, 2008

Dizertačná práca bola vypracovaná v externej forme doktorandského štúdia na Katedre zeleninárstva Fakulty záhradníctva a krajinného inžinierstva Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Doktorand: **Ing. Marcela Koreňová**
Katedra zeleninárstva
Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: **doc. Ing. Elena Vargová, PhD.**

Oponenti: **prof. RNDr. Zuzana Jureková, CSc.**
Katedra ekológie
Fakulta európskych štúdií a regionálneho rozvoja
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

prof. RNDr. Elena Masarovičová, DrSc.
Katedra fyziológie rastlín
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského v Bratislave

doc. Ing. Ernest Šturdík, CSc.
Katedra výživy a hodnotenia potravín
Fakulta chemickej a potravinárskej technológie
Slovenská technická univerzita v Bratislave

Autoreferát bol odoslaný dňa

Stanovisko k dizertácii vypracovala Katedra zeleninárstva, Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.

Obhajoba doktorandskej dizertácie sa koná dňa 9.10.2008 o 14.00 h pred komisiou pre obhajobu dizertačných prác vedného odboru 41-42-9 Záhradníctvo na Fakulte záhradníctva a krajinného inžinierstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.

Miesto konania: Pavilón záhradnej architektúry
Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
Tulipánová 7, 949 76 Nitra

Miestnosť: Poslucháreň TD-02

S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na dekanáte Fakulty záhradníctva a krajinného inžinierstva.

Predseda komisie pre obhajoby vo vednom odbore 41-42-9 Záhradníctvo

prof. Ing. Anna Jakábová, CSc.
Slovenská poľnohospodárska univerzita

ABSTRAKT

V práci sa sledoval obsah kyseliny rozmarínovej v kultivaroch medovky lekárskej (*Melissa officinalis* L.) pestovaných v Záhrade liečivých rastlín v Bratislave. Zároveň sa sledovali zmeny v obsahu tejto látky v rastlinách medovky v závislosti od sponu pestovania. Obsah kyseliny rozmarínovej sa stanovil vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC). Najvyšší obsah kyseliny rozmarínovej v listovej droge bol v *Melissa officinalis* L. cv. 'Citra' 7,25 %. Pestovateľský spon nemal vplyv na obsah kyseliny rozmarínovej.

V práci je uvedený popis odvodenia *in vitro* kultúry *Melissa officinalis* L. cv. 'Citra'. Kalusová pletivová kultúra bola odvodená na Murashige, Skoog (1962) médiu s pridaním rastových regulátorov-kyseliny 2,4-dichlórfenoxyoctovej a kinetínu. Kultúra sa udržiavala pasážovaním a čas pozorovania bol 47. dní. Charakterizované boli biologické parametre-sušina, obsah kyseliny rozmarínovej a jej antioxidačná aktivita. Obsah kyseliny rozmarínovej bol stanovený metódou HPLC a antioxidačná aktivita pomocou spektrofotometrie. Percento sušiny sa pohybovalo v intervale 4,87-3,24 %. Obsah kyseliny rozmarínovej v sušine kalusovej kultúry bol 4,92 %. Hodnoty SC_{50} boli v rozmedzí 28,4-53,11 $\mu\text{g/ml}$.

Zisťovalo sa pôsobenie elicitora-metyljasmonátu na zvyšovanie obsahu kyseliny rozmarínovej u *in vitro* kultúr v stonkách a koreňoch medovky lekárskej. Skúmala sa vhodná koncentrácia elicitora, dĺžka jeho pôsobenia i forma (kvapalina, plyn).

Vo variante A bola najvhodnejšia *in vitro* kultúra odvodená zo stonky, pričom koncentrácie 0,1 a 0,2 mmol/l zvyšovali obsah kyseliny rozmarínovej rovnocenne. Ako najvhodnejšia sa určila 72 h doba pôsobenia.

Vo variante B bola najvhodnejšia koncentrácia metyljasmonátu 100 $\mu\text{mol/l}$ po dobe pôsobenia 72 h. Obsah kyseliny rozmarínovej v *in vitro* kultúre bol najvyšší v stonke, v oboch variantoch.

Kľúčové slová: Medovka lekárska, kyselina rozmarínová, *in vitro* kultúry, elicitor, metyljasmonát, antioxidačná aktivita

ABSTRACT

This thesis deals with the quantitative determination of the content of rosmarinic acid in lemon balm (*Melissa officinalis* L.) cultivars grown in Garden of Medicinal Plants in Bratislava. Changes of the content of this compound in lemon balm plants in dependence on plant spacing was studied as well. The content of rosmarinic acid was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). The cultivar *Melissa officinalis* L. cv. 'Citra' showed highest content of rosmarinic acid 7,25 %. Spacing did not affect the content of rosmarinic acid significantly.

This thesis described the derivation of *in vitro* culture of *Melissa officinalis* L. cv. 'Citra'. The callus tissue culture was derived on Murashige, Skoog (1962) medium supplemented with plant-growth regulators-2,4 D and kinetin. The *Melissa officinalis* L. cv. 'Citra' culture was maintained by passaging, and studied for 47 days. The thesis characterized its biological parameters-content of the dry matter, rosmarinic acid and its antioxidant activity. The content of rosmarinic acid was determined by HPLC method and antioxidant activity by spectrophotometry. The percentage of the dry mass was between 4,87-3,24 %. The amount of the rosmarinic acid in the dry mass was 4,92 %. Values SC_{50} were between 28,4-53,11 $\mu\text{g/ml}$.

The influence of an elicitor-methyl jasmonate on the increase of rosmarinic acid content in an *in vitro* culture of the shoots and roots of lemon balm was followed. The optimal elicitor concentration, the duration and form of the application (solution, vapour) was studied.

In variant A, an *in vitro* culture derived from the shoot was the most favourable, and both elicitor concentrations, 0,1 and 0,2 mmol/l, respectively, had an equivalent effect on rosmarinic acid content increase. The most suitable duration of the application was 72 h.

In variant B, the optimal concentration of methyl jasmonate was found to be 100 $\mu\text{mol/l}$ after an application of 72 h. In both variants, the content of rosmarinic acid in the *in vitro* culture was highest in the shoot.

Keywords: Lemon balm (*Melissa officinalis* L.), rosmarinic acid, *in vitro* cultures, elicitor, methyljasmonate, antioxidant activity

POUŽITÉ SKRATKY, SYMBOLY A ZNAČKY

DPPH	2,2 difenyl-1-pikryl-hydrazylový radikál
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
SC ₅₀	koncentrácia, ktorá spôsobí zníženie absorbanie na polovicu
SL1	Slovenský liekopis
Variant A	použité koncentrácie metyljasmonátu u <i>in vitro</i> kultúr odvodených zo stonky 0,1; 0,2 mmol/l; odvodených z koreňa 1, 2 mmol/l, odbery vzoriek po 24, 48, 72 h
Variant B	použité koncentrácie metyljasmonátu u <i>in vitro</i> kultúr odvodených zo stonky 50, 100, 200, 400 µmol/l; odvodených z koreňa 50, 200 µmol/l, odbery vzoriek po 24, 48, 72, 120 h

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. CIEĽ PRÁCE	6
3. MATERIÁL A METÓDY	7
3.1 Materiál použitý v poľných podmienkach	7
3.1.1 Rastlinný materiál	7
3.2 Metódy stanovenia kyseliny rozmarínovej použité u kultivarov pestovaných v poľných podmienkach	8
3.3 Materiál a metódy použité pri neelicitovaných <i>in vitro</i> kultúrach	9
3.3.1 Materiál	9
3.3.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity kalusovej kultúry <i>Melissa officinalis</i> L. cv. 'Citra'	10
3.4 Materiál a metódy použité pri elicitovaných <i>in vitro</i> kultúrach	11
4. VÝSLEDKY	11
5. ZÁVER	19
6. POUŽITÁ LITERATÚRA	20
7. PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S PROBLEMATIKOU	21

1. ÚVOD

Medovka lekárska (*Melissa officinalis* L.) je prastará liečivá rastlina známa tak v európskom, ako aj v ázijskom ľudovom liečiteľstve viac ako 2000 rokov.

Pre svoje výnimočné farmakologické účinky, akými sú antiflogistický, spazmolytický, antivirotický a antibakteriálny, ďalej choleretický, karminatívny, stomachický a sedatívny sa teší veľkej pozornosti a obľube. Na spomínaných účinkoch sa v najvyššej miere podieľa silica. Avšak jednou z nezanedbateľných obsahových látok je kyselina rozmarínová-derivát kyseliny hydroxyškoricovej, ktorá je chemotaxonomicky typická pre čeľaď *Lamiaceae* (hluchavkovité).

Vzhľadom na to, že za posledné roky spotreba liečivých rastlín stúpa, hľadajú sa nové možnosti získavania biologicky aktívnych látok. Jednou z možností ich získavania je použitie *in vitro* kultúr, nakoľko majú podobné resp. rovnaké spektrum sekundárnych produktov ako intaktná materská rastlina. Preto sa s úspechom využívajú na biochemické, fyziologické, morfológické ale i genetické štúdium. Cieľom kultivácie rastlinných explantátov *in vitro* je okrem iného zvýšiť dostupnosť farmaceuticky významných sekundárnych metabolitov. Jednou z metód, ktorou je možné dosiahnuť zvýšenú produkciu sekundárnych metabolitov v *in vitro* kultúrach, je elicitácia. Pri elicitácii sa využíva schopnosť *in vitro* kultúr reagovať na vonkajšie činitele celým radom obranných reakcií, ktorých výsledkom je zvýšená akumulácia sekundárnych metabolitov. Úspešná elicitácia je podmienená celým radom faktorov, ktoré sú špecifické pre každý elicitor a pre každú pletivovú kultúru.

Vzhľadom na vyššie uvedené skutočnosti práca pozostáva z dvoch častí. Prvá časť je venovaná intaktným rastlinám-kultivarom medovky lekárskej. Druhá časť je venovaná *in vitro* kultúram ako aj ovplyvňovaniu produkcie sekundárneho metabolitu-kyseliny rozmarínovej metódou elicitácie.

2. CIEĽ PRÁCE

Cieľom dizertačnej práce je:

- 1) Stanovenie vplyvu podmienok poľného pestovania na obsah sekundárneho metabolitu-kyseliny rozmarínovej v kultivaroch medovky lekárskej (*Melissa officinalis* L.).
- 2) Odvodenie kalusovej kultúry *Melissa officinalis* L. cv. 'Citra' a stanovenie obsahu kyseliny rozmarínovej v neelicitovanej *in vitro* kultúre.
- 3) Stanovenie korelačnej závislosti antioxidačnej aktivity s obsahom kyseliny rozmarínovej v kalusovej kultúre.

- 4) Stanovenie vhodnej koncentrácie a doby pôsobenia abiotického elicitora-metyljasmonátu na tvorbu sekundárneho metabolitu-kyseliny rozmarínovej v *in vitro* kultúrach medovky lekárskej odvodenej zo stonky (*Melissa officinalis* L. cv. 'Citra') a z koreňa (*Melissa officinalis* L. cv. 'Ildikó').

3. MATERIÁL A METÓDY

3.1 Materiál použitý v poľných podmienkach

3.1.1 Rastlinný materiál

Rastlinný materiál (*Melissae folium*) sa získal z porastu pochádzajúceho z osiva domáceho kultivaru medovky lekárskej (*Melissa officinalis* L. cv. 'Citra') a z osiva zahraničných kultivarov (tab. 1).

Rastliny sa pestovali v Záhrade liečivých rastlín Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, v slnečnej lokalite na ľahkej piesočnato-hlinitej pôde v dvoch sponoch: 0,40 × 0,60 m a 0,40 × 0,40 m. Vzorky vňate sa zbierali ručne za slnečného počasia 0,10 – 0,15 m nad zemou. V čase zberu, v roku 2004, išlo o dvojročný porast. Zber sa robil vždy vo vývojovej fáze tesne pred kvetom. Rastliny niektorých kultivarov prvého vegetačného roku v našich podmienkach neprezimovali.

Dátum zberu a usporiadanie pestovateľského pokusu sú zhrnuté v tab. 1.

Tabuľka 1: Pôvod osiva jednotlivých kultivarov medovky lekárskej a dátum zberu rastlinného materiálu (v roku 2004) vo vývojovej fáze tesne pred kvetom

kultivar č.	krajina	mesto	názov	dátum zberu			
				spon 0,4×0,6 m		spon 0,4×0,4 m	
				A	B	C	D
1	ČR	Olomouc	cv. 'Citra'	10.7.	*	10.7.	10.7.
2	ČR	Troubsko	cv. 'Citra'	6.7.	*	13.7.	12.7.
3	Holandsko	Enkhvizen	cv. 'CHAM.'	*	10.7.	15.7.	15.7.
4				6.7.	*	6.7.	6.7.
5				8.7.	8.7.	8.7.	12.7.
6	Maďarsko	Budakalász	cv. 'Ildikó'	6.7.	6.7.	6.7.	6.7.
7				8.7.	22.7.	8.7.	8.7.
8	Nemecko	Quedlinburg	cv. 'Citronella'	10.7.	12.7.	10.7.	10.7.
9				8.7.	*	8.7.	*
10				22.7.	*	22.7.	10.7.
11	Nemecko	Quedlinburg	cv. 'Quedlinburger'	8.7.	12.7.	22.7.	10.7.
12				8.7.	10.7.	15.7.	12.7.
13	Portugalsko	Lisabon	<i>ssp. officinalis</i>	8.7.	*	*	*
14	Portugalsko	Lisabon	bez označenia cv.	8.7.	*	*	*
15				8.7.	*	*	*
16	Španielsko	Madrid	bez označenia cv.	8.7.	*	*	*
17	Taliansko	Janov	<i>ssp. altissima coimbra</i>	8.7.	10.7.	8.7.	6.7.
18				10.7.	*	*	*

Vysvetlivky: A, B, C, D-trsy jednotlivých kultivarov medovky lekárskej pestované v 2 sponoch
*-rastlina neprezimovala

3.2 Metódy stanovenia kyseliny rozmarínovej použité u kultivarov pestovaných v poľných podmienkach

Suchý materiál sa rozdrobí na jemný prášok a naváži sa z neho 0,500 g. Toto množstvo sa extrahuje s 50 ml metanolu v Soxhletovom extraktore 3 h. Hotový extrakt sa ihneď odparí do sucha na vákuovej rotačnej odparovačke. Tesne pred analýzou sa odparok rozpustí v metanole a po prefiltrovaní sa doplní na 25,0 ml.

Z odmernej banky sa odoberie do Eppendorfovej skúmavky 0,5 ml extraktu. Potom sa pridá 0,2 ml tetrachlórmetánu. Vznikne číry roztok, ktorý sa dobre premieša. Po pridaní 0,3 ml vody sa roztok rozdelí na dve fázy. Zmes sa dôkladne pretrepe, aby sa farbivá a ostatné

nežiadúce látky v čo najväčšej miere vyextrahovali do tetrachlórmetánu. Potom sa zmes centrifuguje 10 min. rýchlosťou 10 000 otáčok/min. Oddelená horná vrstva (vodno-metanolová) sa použije na analýzu metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie-HPLC.

3.3 Materiál a metódy použité pri neelicitovaných *in vitro* kultúrach

3.3.1 Materiál

Rastliny medovky lekárskej (*Melissa officinalis* L. cv. 'Citra') boli predpestované zo sterilných semien na agarovom živnom médiu, ktoré obsahovalo makroprvky a mikroprvky podľa Murashige, Skoog (1962) bez rastových regulátorov .

Pre ďalšie kultivácie po vyklíčení semien bolo použité tekuté živné médium, ktoré obsahovalo anorganické látky (mikroprvky, makroprvky) ako u agarového živného média, doplnené o organické látky, vitamíny a rastové regulátory.

Živné média boli pripravené pipetovaním predpísaných množstiev zo zásobných roztokov o známej koncentrácii.

Agarové médium bolo rozlievané po 15 ml do sklenených nádob s objemom 50 ml.

Tekuté živné médium bolo rozlievané do Erlenmayerových baniek s objemom 100 ml s papierovými mostíkmi, ktoré boli určené na kultiváciu explantátov a kalusov, bolo dávkané po 25 ml tekutého média. Banky boli uzatvorené a sterilizované v autokláve pri teplote 121 °C a tlaku 0,1 MPa po dobu 20 min.

Na sterilizáciu semien *Melissa officinalis* L. cv. 'Citra' bol použitý 70 % roztok etanolu, 15 % roztok SAVA a destilovaná voda.

Vysterilizované semená boli uložené na agarové živné médium po jednom, maximálne po dvoch. Rastlina, vyklíčená na agarovom živnom médiu, bola sterilizovaná pinzetou položená na sterilný filtračný papier. Sterilným skalpelom bola rozrezaná na niekoľko častí. Umiestnené boli na mostíky ponorené v živnom médiu v bankách. Koniec baniek sa opálil a uzatvoril. Na primárnych explantátoch sa sledoval rast kalusu.

Z kalusu sa v jeden deň naočkoval potrebný počet baniek-kalusov, z ktorých sa odoberali vzorky v 3-4 dňových intervaloch. Vzorky boli odoberané na 5., 8., 12., 15., 19., 22., 26., 29., 33., 36., 40., 43., 47. deň. Odoberalo sa 3 až 7 vzoriek. Pre HPLC stanovenie a stanovenie antioxidantnej aktivity boli použité priemerné vzorky. Kyselina rozmarínová sa stanovila už vyššie popísanou metódou HPLC.

3.3.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity kalusovej kultúry *Melissa officinalis* L. cv. 'Citra'

Roztok DPPH sa pripravil navažovaním 4 mg DPPH do 100 ml odmernej banky a následným doplnením metanolu na 100 ml ($c_{\text{DPPH}} = 10^{-4}\text{M}$).

1 mg sušiny (kalusovej kultúry *Melissa officinalis* L. cv. 'Citra') sa nechal extrahovať v 3 ml metanolu 7 dní v tme na chladnom mieste (2-6 °C).

Po týždni sa extrakty prefiltrovali do skúmaviek. 1 ml extraktu sa dal na meranie vychytávania DPPH radikálu a 200 μl extraktu sa dalo sušiť do sušiarne pri 50 °C na stanovenie obsahu sušiny.

Voľné radikály boli vychytávané 2,2 difenyl-1-pikryl-hydrazyl (DPPH) je metóda, ktorá sa všeobecne používa na stanovenie antioxidačnej aktivity rôznych prírodných a syntetických produktov (Nessa et al., 2004).

Princíp metódy spočíva v tom, že antioxidant poskytne vodík, ktorý reaguje s DPPH. Po zachytení vodíka DPPH dochádza k odfarbeniu roztoku, čo možno registrovať spektrofotometricky, sledovaním intenzity absorpčného pásu pri 517 nm v metanolovom roztoku DPPH. Pridávaním antioxidantu sa intenzita tohoto pásu znižuje. Na základe vyhodnotenia závislosti intenzity absorpcie verzus koncentrácie antioxidantu možno vypočítať tzv. SC_{50} hodnoty (scavenger concentration) t.j. koncentrácia, ktorá spôsobí zníženie intenzity absorpcie na polovicu (Tsimogiannis, 2004).

Postup pri testovaní: jednotlivé vzorky pre samotné meranie sa zarobili do skúmaviek, do ktorých sa pridávali 1,8 ml roztoku DPPH v metanole, rôzne množstvo (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 až 200 μl) metanolového roztoku antioxidantu a doplnili patričným množstvom metanolu (0 až 200 μl) na celkový objem 2 ml tak, že výsledná koncentrácia DPPH bola 0,091 mmol/l. Absorbancia každej vzorky bola meraná vždy po 15 min. od pridania antioxidantu pri laboratórnej teplote 24 °C. So vzrastajúcou koncentráciou antioxidantu vo vzorke intenzita absorpcie klesala až po určitú minimálnu hodnotu, ktorá sa už s ďalším pridávaním antioxidantu nemenila.

Hodnoty SC_{50} , ktoré predstavujú antioxidačnú účinnosť obsahových látok boli vypočítané pomocou vyhodnocovacieho počítačového programu Peakfit.

Antioxidačná aktivita sa merala na UV VIS spektrofotometri-Hewlet 8452A Packard diode array.

3.4 Materiál a metódy použité pri elicovaných *in vitro* kultúrach

Kalusové kultúry medovky lekárskej (*Melissa officinalis* L.) odvodené zo stoniek (*Melissa officinalis* L. cv. 'Citra') a koreňov (*Melissa officinalis* L. cv. 'Ildikó') sterilne vyklíčených rastlín sa vniesli do suspenzie. Základné živné médium Murashige, Skoog (1962) bolo doplnené kinetínom (0,1 mg/l) a kyselinou 4-dichlórfenoxyoctovou (1,0 mg/l). Po rozpustení všetkých zložiek tvoriacich kultivačné médium sa médium nalievalo do sterilných 100 ml Erlenmayerových baniek v objeme 20 ml. Po uzavretí polyuretánovou zátkou a hliníkovou fóliou sa banky sterilizovali v autokláve pri tlaku 120 kPa po dobu 15 min.

Obsah žiadenej kyseliny rozmarínovej bol regulovaný pridávaním elicitora metyljasmonátu použitím viacerých koncentrácií a časových intervalov odberu.

Variant A: koncentrácia 0,1 a 0,2 mmol/l v prípade suspenzných kultúr odvodených zo stoniek medovky; 1 a 2 mmol/l v prípade suspenzných kultúr odvodených z koreňov medovky. Vzorky boli odoberané v časových intervaloch 24, 48 a 72 h.

Variant B: koncentrácie 50, 100, 200 a 400 μ mol/l v prípade suspenzných kultúr odvodených zo stoniek medovky; 50 a 200 μ mol/l v prípade suspenzných kultúr odvodených z koreňov medovky. Vzorky boli odoberané v časových intervaloch 24, 48, 72 a 120 h od začiatku kultivácie.

Extrakt sa pripravil rozdrobením suchého materiálu na jemný prášok. Z materiálu sa naváži 10 mg do Eppendorfovej skúmavky. Toto množstvo sa extrahuje s 1,0 ml metanolu v ultrazvukovej vani po dobu 30 min. Následne sa centrifuguje 10 min rýchlosťou 10 000 otáčok/min. Supernatant sa zleje do 5 ml odmernej banky, k sedimentu sa pridá znovu 1,0 ml metanolu. Extrakcia sa opakuje trikrát. Spojené supernatanty v odmernej banke sa doplnia metanolom na objem 5,0 ml extraktu. Potom sa pridá 0,2 ml tetrachlórmétanu a 0,3 ml vody. Zmes sa centrifuguje 10 min. rýchlosťou 10 000 otáčok/min. Oddelenú hornú (vodno-metanolovú) fázu zmesi použijeme na analýzu HPLC.

4. VÝSLEDKY

Obsah kyseliny rozmarínovej v kultivaroch rastlín medovky lekárskej (*Melissa officinalis* L.) bol vypočítaný na základe vyhodnotenia plôch pík, vypočítaním podľa koeficientu kalibračnej krivky kyseliny rozmarínovej.

Kvalitatívne hodnotenie sa robilo na základe štandardu kyseliny rozmarínovej a jeho retenčného času. Retenčný čas kyseliny rozmarínovej na chromatograme roztoku štandardu i upraveného extraktu rastlinného materiálu bol v rozmedzí 13,1-13,8 min.

Na výpočet obsahu kyseliny rozmarínovej v jednotlivých vzorkách kultivarov poľného pestovania bol použitý vzorec:

$$w_{\%} = \frac{(P - b) \times V \times 5}{k \times m \times s \times 10^6} \times 100$$

w – obsah kyseliny rozmarínovej vo vzorke [%]

P – plocha píku kyseliny rozmarínovej v meranej vzorke [mV.s]

V – objem extraktu z drogy [25,0 ml konšt.]

k, b – koeficienty z rovnice lineárnej regresie kalibračnej krivky $y = kx + b$, kde

y – plocha píku roztoku štandardu kyseliny rozmarínovej [mV.s]

x – koncentrácia roztoku vzorky štandardu kyseliny rozmarínovej [$\mu\text{g/ml}$]

[$k = 169,8 \text{ (mV.s.ml)/}\mu\text{g, konšt.}$]

[$b = 870,0 \text{ mV.s, konšt.}$]

m – hmotnosť návažku drogy [asi 0,500 g]

s – sušina <0,1>

Výsledky analýzy sú zhrnuté v tabuľke 2.

Tabuľka 2: Výsledky HPLC stanovenia obsahu kyseliny rozmarínovej (%) v jednotlivých kultivároch medovky lekárskej

kultivar č.	obsah KR (%)				smerodajná odchýlka			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1	7,25	*	6,49	6,72	0,14	*	0,01	0,01
2	5,01	*	6,33	5,39	0,08	*	0,18	0,23
3	*	5,19	5,30	5,57	*	0,05	0,21	0,05
4	6,81	*	4,45	4,91	0,17	*	1,02	0,17
5	6,20	5,19	6,77	6,30	0,05	0,09	0,38	0,14
6	7,21	4,99	5,74	5,63	0,26	0,04	0,04	0,18
7	5,75	6,01	6,95	5,18	0,11	0,12	0,05	0,13
8	5,88	3,48	6,39	6,14	0,01	1,01	0,09	0,01
9	5,73	*	4,67	*	0,13	*	0,22	*
10	6,35	*	6,34	5,83	0,10	*	0,24	0,01
11	6,36	6,05	6,79	6,39	0,28	0,23	0,21	0,30
12	5,49	4,63	5,82	5,39	0,21	0,06	0,15	0,14
13	5,49	*	*	*	0,21	*	*	*
14	5,32	*	*	*	0,27	*	*	*
15	5,11	*	*	*	0,18	*	*	*
16	5,44	*	*	*	0,18	*	*	*
17	7,45	5,91	7,46	6,31	0,06	0,07	0,27	0,03
18	5,74	*	*	*	0,09	*	*	*

Vysvetlivky: 1-18-charakteristika kultivarov (tab. 1 str. 8)

A, B, C, D-trsy jednotlivých kultivarov medovky lekárskej pestované v 2 sponoch

A-B-spon 0,4 × 0,6 m; C-D- spon 0,4 × 0,4 m

KR-kyselina rozmarínová

*-porast neprezimoval

Obsah kyseliny rozmarínovej v sledovaných drogách sa pohybuje v rozmedzí 5,11-7,07 % (tab. 2). Všetky odrody pri zohľadnení priemernej vzorky z obidvoch sponov a štyroch trsov spĺňajú požiadavky SL 1 (4 % hydroxyškoricových derivátov vyjadrených ako kyselina rozmarínová pri použití spektrofotometrickej metódy). Metóda HPLC pritom poskytuje nižšie hodnoty ako spektrofotometria, ktorú predpisuje Slovenský liekopis, keďže ide o stanovenie jedinej látky, kým spektrofotometriou sa stanovuje celý komplex hydroxyškoricových derivátov (Gracza, Ruff, 1984; Lamaison et al., 1991).

Najvyšší obsah kyseliny rozmarínovej v rámci prípustného poddruhu *officinalis* má kultivar 'Citra' (6,82 %, 5,20 %) (tab. 2). Spomedzi všetkých vzoriek majú vyšší obsah iba vzorky z poddruhu *altissima* (7,07 %, 5,74 %) (tab. 2), ktorý sa považuje za nežiaducu prímes v liekopisnej droge *Melissae folium*. Preto aj napriek vyššiemu obsahu kyseliny rozmarínovej nie je vhodná na terapeutické účely. Pomerne vysoký obsah kyseliny rozmarínovej má aj maďarský kultivar 'Ildikó', nemecký kultivar 'Quedlinburger' a holandský kultivar 'CHAM'. (tab. 2). U kultivarov č. 13-16, ktoré pochádzajú zo Španielska a Portugalska, neprezimovali všetky trsy rastlín, pre porovnanie sú k dispozícii iba výsledky paralelných stanovení v rámci jedného trsu rastlín (tab. 2). Preto je problematické vysloviť všeobecnejšie závery o obsahu kyseliny rozmarínovej v týchto kultivaroch. Introdukcia rastlín z južných oblastí Európy predstavuje pravdepodobne zložitejší agronomický problém. V zostávajúcich vzorkách bol obsah kyseliny rozmarínovej v porovnaní s ostatnými vzorkami relatívne nižší. Z výsledku pokusov vyplynulo, že jednotlivé sledované kultivary medovky lekárskej sú výrazne ovplyvnené poveternostnými podmienkami stanovišťa (vymrznutie), nielen v kvantitatívnej rovine (množstvo drogy), ale aj v kvalitatívnej (kyselina rozmarínová). Z uvedeného dôvodu bola v ďalších pokusoch pozornosť zameraná na získanie optimálnej *in vitro* kultúry, kde sú vonkajšie vplyvy eliminované.

V zmysle cieľa práce bola vytýčená úloha stanoviť obsah kyseliny rozmarínovej v neelicitovanej kalusovej kultúre medovky lekárskej.

Tabuľka 3: Množstvo sušiny (%) a obsah kyseliny rozmarínovej (%) v neelicitovanej kalusovej kultúre *Melissa officinalis* L. cv. 'Citra' počas 47-dňovej subkultivácie

Deň odberu	Percento sušiny (%)	± I.S. 0,05	Obsah RA (%)
5.	4,87	0,19	2,60
8.	4,80	0,31	2,75
12.	4,73	0,14	2,69
15.	4,59	0,15	3,00
19.	4,16	0,16	3,54
22.	4,06	0,32	3,63
26.	3,69	0,17	3,71
29.	3,44	0,19	3,79
33.	3,24	0,25	3,86
36.	4,06	0,33	4,08
40.	3,85	0,36	4,79
43.	3,47	0,22	4,84
47.	3,87	0,18	4,92

Obsah kyseliny rozmarínovej bol stanovený v lyofilizovanej sušine pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC). V počiatočnej fáze (lag fáze) bolo množstvo kyseliny rozmarínovej najnižšie 2,6-3,0 %, lebo bunky v kalusovej kultúre sa adaptujú na nové životné prostredie. S prispôbením sa na živné médium a podmienky prostredia sa bunky začínajú deliť vo vysokej miere. V exponenciálnej fáze sa nachádzajú mladé, ale aj staršie bunky, ktoré sa už nedelia a môžu tvoriť bioaktívnu látku-kyselinu rozmarínovú. Množstvo kyseliny rozmarínovej sa po 29. deň mierne zvyšovalo, dosiahlo hodnotu 3,79 %.

Schopnosť syntetizovať tento sekundárny metabolit vekom buniek aj celkovej kultúry narastá, a preto v poslednej fáze (stacionárna fáza) t.j. cca 33. až 47.deň-kultúra obsahovala najviac kyseliny rozmarínovej 3,86-4,92 % v sušine (tab. 3).

Počas 47. dní sa sledovala krivka rastu kultúry a hodnoty SC_{50} . Bolo zistené, že obsahové látky, ktoré sa v sušine *Melissa officinalis* L. cv. 'Citra' nachádzajú, majú schopnosť vychytávať DPPH radikály.

Hodnoty SC_{50} sa menili podľa množstva sušiny kalusovej kultúry. V počiatočnej fáze rastu kalusu do 20 dní bol obsah sušiny najvyšší aj antioxidačná aktivita bola vysoká. Hodnoty SC_{50} (tab. 4) sa pohybovali v intervale od 39,26-28,4 $\mu\text{g/ml}$. Ale v exponenciálnej fáze rastu sa hodnoty SC_{50} zvýšili, a to znamená, že sa znížila antioxidačná schopnosť obsahových látok.

V poslednej fáze rastu, kedy sa aj obsah sušiny mierne zvýšil, boli hodnoty SC_{50} porovnateľné s tými na začiatku rastu (tab. 4).

Tabuľka č. 4: Hodnoty SC_{50} obsahových látok kalusovej kultúry *Melissa officinalis* L. cv. 'Citra' počas 47-dňovej subkultivácie

Deň subkultivácie	Hodnoty SC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
0	37,71
5	34,19
8	34,55
12	33,13
15	39,26
19	28,40
22	39,36
26	53,19
29	43,80
33	29,34
36	45,86
40	35,82
43	40,23
47	37,25

V tejto práci bol dosiahnutý stabilný rast kalusovej kultúry za použitia fytohormónov-kyseliny 2,4-dichlórfenoxyoctovej a kinetínu. Ďalšia časť tejto práce bola zameraná na stanovenie kyseliny rozmarínovej v kultúre *Melissa officinalis* L. cv. 'Citra'. Kyselina rozmarínová bola stanovená metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie.

Antioxidačná aktivita je v dnešnej dobe veľmi skúmanou témou, preto jedným z cieľov tejto práce bolo zistiť, či aj obsahové látky v kalusovej kultúre *Melissa officinalis* L. cv. 'Citra' majú antioxidačnú schopnosť. Antioxidačnú aktivitu kyseliny rozmarínovej *in vitro* s použitím DPPH radikálu v metanolovom extrakte *Salvia verticillata* L. študovali Bektas et al. (2007). Zistili, že uvedený extrakt vykazoval hodnoty SC_{50} $14,5 \pm 1,21 \mu\text{g/mg}$. V predloženej práci, boli hodnoty SC_{50} vyššie ako hodnoty metanolového extraktu *Salvia verticillata* L. Najoptimálnejšia hodnota bola dosiahnutá na 19. deň- SC_{50} 28,4 $\mu\text{g/ml}$.

Na stanovenie obsahu kyseliny rozmarínovej v elicitovaných *in vitro* kultúrach bola taktiež použitá metóda HPLC. Retenčný čas kyseliny rozmarínovej na chromatograme roztoku štandardu i upraveného extraktu rastlinného materiálu bol u *in vitro* kultúr v rozmedzí 15,3-15,8 min.

Na výpočet obsahu kyseliny rozmarínovej v jednotlivých vzorkách bol použitý vzorec:

$$w_{\%} = \frac{(P - b) \times V \times 5}{k \times m \times s \times 10^6} \times 100$$

w – obsah kyseliny rozmarínovej vo vzorke (%)

P – plocha píku kyseliny rozmarínovej v meranej vzorke (mV.s)

V – objem extraktu z drogy (5,0 ml, konšt.)

k, b – koeficienty z rovnice lineárnej regresie kalibračnej krivky $y = kx + b$, kde

y – plocha píku roztoku štandardu kyseliny rozmarínovej (mV.s)

x – koncentrácia roztoku vzorky štandardu kyseliny rozmarínovej ($\mu\text{g/ml}$)

[$k = 341,6463$ (mV.s.ml)/ μg , konšt.]

[$b = -2720,935$ mV.s, konšt.]

m – hmotnosť návažky drogy (asi 0,010 g)

s – sušina <0,1>

Tabuľka 5: Výsledky HPLC stanovenia obsahu kyseliny rozmarínovej (%) v elicovaných stonkách a koreňoch medovky lekárskej (variant A)

Vysvetlivky : c – koncentrácia metyljasmonátu (mmol/l)

w – obsah kyseliny rozmarínovej v sušine *in vitro* kultúr (%)

Stonka			Koreň		
Metyljasmónát c (mmol/l)	Odber (h)	Priemer w KR (%)	Metyljasmónát c (mmol/l)	Odber (h)	Priemer w KR (%)
kontrola	24	0,14	kontrola	24	0,10
	48	0,23		48	0,07
	72	0,36		72	0,09
0,1	24	0,08	1	24	0,13
	48	0,17		48	0,10
	72	1,16		72	0,13
0,2	24	0,10	2	24	0,15
	48	0,16		48	0,11
	72	1,01		72	0,31

Elicitácia je metóda, ktorá využíva obranné reakcie rastlín v podmienkach *in vitro*. Predpokladom úspešnej elicítácie je použitie vhodného elicitora, jeho koncentrácie ako aj stanovenie optimálnej doby pôsobenia. Vplyv metyljasmonátu v roztoku, t.j. jeho pridaním priamo do živného média bol sledovaný u suspenznej kultúry *Melissa officinalis* L. cv. ‘Citra’ odvodenej zo stonky. Obsah kyseliny rozmarínovej u kontrolnej vzorky sa s rastúcim časom veľmi nemenil (tab. 5). Ani pôsobenie metyljasmonátu v množstve 0,1 a 0,2 mmol/l jej obsah po 24 a 48 h výrazne nezmenilo. Zmeny nastali až po 72 h u obidvoch koncentrácií. Pridaním elicitora v množstve 0,1 mmol/l sa zvýšil obsah kyseliny rozmarínovej na 1,2 %, čo predstavuje 3,5-násobný nárast oproti kontrole. Dvojnásobné množstvo elicitora, t.j. 0,2 mmol/l už obsah kyseliny rozmarínovej nezväčšilo, naopak jej obsah sa o niečo znížil. Dosiahol

3-násobné zvýšenie oproti kontrole. Túto skutočnosť je možné vysvetliť možným počiatočným fyto toxickým pôsobením uvedeného množstva elicitora. Vplyv metyljasmonátu v plynnej fáze bol sledovaný u suspenznej kultúry *Melissa officinalis* L. cv. 'Ildikó' odvodenej z koreňov. Už porovnaním kontroly bol zistený nižší obsah kyseliny rozmarínovej (tab. 5) ako u kultúry odvodenej zo stoniek, a to cca 3,5 krát. Počas dĺžky trvania experimentu sa po 24, 48 a 72 h veľmi nezmenil.

Mierne sa zvýšil obsah kyseliny rozmarínovej pôsobením elicitora v množstve 1,0 mmol/l, a to z 0,1 % kontrolnej vzorky na 0,13 % po 24 h. Po 48 h nastal mierny pokles aj u kontroly a je tiež kopírovaný poklesom kyseliny rozmarínovej po 48 h, a na návrat k takmer rovnakej hodnote 0,13 % po 72 h.

Omnoho výraznejší vplyv na obsah kyseliny rozmarínovej bol zaznamenaný pri koncentrácii 2,0 mmol. Po 24 h bol obsah kyseliny rozmarínovej 0,15 % oproti kontrole, čo predstavuje nárast iba o 0,5 %, po 48 h sa taktiež mierne znížil a dosiahol úroveň pôsobenia 1,0 mmol/l koncentrácie elicitora. Podstatný obrat nastal po 72 h pôsobenia, kedy sa obsah kyseliny rozmarínovej zvýšil oproti kontrole až na 0,3 %, čo predstavuje trojnásobný nárast. Tento nárast je o to viac prekvapujúci, že u stoniek najvyšší nárast predstavoval 3,5-násobné zvýšenie a to pri nižšej koncentrácii elicitora (0,1 mmol/l) naopak, pri 0,2 mmol/l bol obsah kyseliny rozmarínovej nižší. Obsah kyseliny rozmarínovej v kontrolných vzorkách je porovnateľný u suspenzných kultúr odvođených zo stoniek ako aj z koreňa. U stonky vplyv elicitora na obsah kyseliny rozmarínovej je vyšší už pri jeho nižších koncentráciách. Ďalšie zvyšovanie koncentrácie elicitora by viedlo k jeho toxicite. Suspenzná kultúra odvođená z koreňa je menej citlivá, reakcia na elicitor sa prejavila až pri vyššej koncentrácii elicitora (2 mmol/l) a až po dlhšom pôsobení (72 h).

Tabuľka 6: Výsledky HPLC stanovenia obsahu kyseliny rozmarínovej (%) v elicitovaných stonkách a koreňoch medovky lekárskej (variant B)

Vysvetlivky: c-koncentrácia metyljasmonátu (mmol/l)

w-obsah kyseliny rozmarínovej v sušine *in vitro* kultúr (%)

KR-kyselina rozmarínová

Stonka			Koreň		
Metyljasmonát c (µmol/l)	Odber (h)	Priemer w KR (%)	Metyljasmonát c (µmol/l)	Odber (h)	Priemer w KR (%)
50	24	1,93	50	24	2,58
	48	2,09		48	2,81
	72	3,07		72	2,64
	120	0,40		120	2,60
100	24	1,67	200	24	2,48
	48	5,19		48	2,57
	72	5,41		72	3,07
	120	0,25		120	2,50
200	24	2,52	kontrola	24	2,21
	48	4,54		48	2,25
	72	4,45		72	1,98
	120	1,96		120	1,93
400	24	3,01			
	48	3,28			
	72	3,04			
	120	2,43			
kontrola	24	1,81			
	48	1,55			
	72	2,11			
	120	0,66			

Ako rozsah optimálnej koncentrácie elicitora sa ukázali koncentrácie elicitora 100 µmol/l a 200 µmol/l kde maximum elicitácie bolo dosiahnuté po 48 až 72 h od pridania elicitora. Potom obsah postupne klesal. Maximálny obsah kyseliny rozmarínovej v *in vitro* kultúrach odvođených zo stoniek medovky lekárskej bol 5,41 % (pri koncentrácii 100 µmol/l metyljasmonátu, po 72 h od pridania elicitora), resp. 4,54 % (pri koncentrácii 200 µmol/l, po 48 h).

Pri koncentrácii elicitora 400 µmol/l bolo maximum dosiahnuté pri 48 h, a to 3,28 %. Od tejto hodnoty obsah postupne klesal, čo môže byť spôsobené vysokou koncentraciou elicitora, ktorý má už inhibičný vplyv na tvorbu kyseliny rozmarínovej v danej *in vitro* kultúre medovky lekárskej. Pri pokusoch s ovplyvnením tvorby kyseliny rozmarínovej v *in vitro* kultúrach odvođených z koreňov medovky lekárskej (*Melissa officinalis* L. cv. 'Ildikó') boli použité dve koncentrácie elicitora: 50 µmol/l a 200 µmol/l. Pri koncentrácii elicitora 50 µmol/l

bolo maximum dosiahnuté po 48 hodinách od pridania elicitora (2,81 %). Pri koncentrácii elicitora 200 $\mu\text{mol/l}$ to bolo po 72 h (3,07 %), môžeme teda pozorovať prechodné zvýšenie približne o 50 % v porovnaní s kontrolnými vzorkami, následne však obsah kyseliny rozmarínovej v *in vitro* kultúre opäť výrazne poklesol (tab. 6). Na základe výsledkov možno konštatovať, že najvyšší obsah kyseliny rozmarínovej bol stanovený vo vzorkách *in vitro* kultúr odvodených zo stoniek medovky lekárskej pri pridání elicitora metyljasmonátu v koncentrácii 100 $\mu\text{mol/l}$ v čase po 72 h od pridania elicitora (5,41 % v sušine *in vitro* kultúr). Zvýšenie obsahu kyseliny rozmarínovej v týchto vzorkách bolo približne 2,5-násobné v porovnaní s kontrolnými vzorkami.

5. ZÁVER

Pri pestovaní medovky v poľných podmienkach sa nepotvrdil vplyv sponu na obsah kyseliny rozmarínovej v listovej droge. Zo sledovaných kultivarov medovky lekárskej v poľných podmienkach západného Slovenska najvyšší obsah kyseliny rozmarínovej bol získaný v kultivare Citra.

V neelicitovanej kalusovej kultúre *Melissa officinalis* L. cv. 'Citra' bol stanovený obsah kyseliny rozmarínovej v intervale 2,6-4,92 %. Sušina sa pohybovala v rozmedzí 3,24-4,87 %.

Schopnosť syntetizovať sekundárny metabolit-kyselinu rozmarínovú vekom buniek neelicitovanej *in vitro* kultúry narastá, v poslednej fáze na 47. deň obsahovala kultúra najviac kyseliny rozmarínovej v sušine 4,92 %.

Antioxidačná aktivita SC_{50} bola najväčšia v počiatočnej fáze rastu kalusu a to na 19. deň-28,4 $\mu\text{g/ml}$.

V exponenciálnej fáze rastu kultúry, kedy sa zvyšovali hodnoty SC_{50} došlo k zníženiu antioxidačnej aktivity obsahových látok.

Použitím elicitora-metyljasmonátu (0,1 a 0,2 mmol/l u suspenzných kultúr odvodených zo stoniek medovky lekárskej) sa obsah kyseliny rozmarínovej v porovnaní s kontrolnou vzorkou po 24 a 48 h nemenil.

Elicitor v množstve 0,1 mmol/l zvýšil obsah kyseliny rozmarínovej po 72 h na 1,2 % v sušine. Dvojnásobné množstvo elicitora 0,2 mmol/l už obsah kyseliny rozmarínovej nezvyšovalo.

Použitím rôznych koncentrácií elicitora (50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/l}$) a času odberu (zo stonky), maximálny obsah kyseliny rozmarínovej bol zistený pri koncentrácii 100 $\mu\text{mol/l}$ metyljasmonátu po 72 h od pridania a to 5,41 % v sušine.

Rôzne koncentrácie elicitora síce zvyšovali množstvo kyseliny rozmarínovej v suspenznej kultúre odvodenej z koreňa, ale hodnoty boli nižšie ako v suspenznej kultúre odvodenej zo stonky.

Suspenzné kultúry odvodené zo stonky medovky lekárskej využívajú vplyv elicitora na zvýšenie množstva kyseliny rozmarínovej efektívnejšie.

6. POUŽITÁ LITERATÚRA

BEKTAS, T., EMINAGAOGLU, O., AKPULAT, A. H. et al. 2007. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* L., subsp. *Amasiaca* B. In *Food Chemistry*, vol. 100, 2007, no. 3, p. 985-989.

GRACZA, L., RUFF, P. 1984. Rosmarinsäure in Arzneibuchdrogen und ihre HPLC Bestimmung. In *Arch. Pharm.*, vol. 317, 1984, p. 339-345.

LAMAISON, J. I., PETITJEAN-FREYTET, C., DUBAND, F. 1991. Rosmarinic Acid Content and Antioxidant Activity in French Lamiaceae. In *Fitoterapia*, vol. 62, 1991, p.166-167.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. Arensed medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. In *Physiologia Plantarum*, vol. 15, 1962, p. 473-497.

NESSA, F., ISMAIL, Z., MOHAMED, N. et al. 2004. Free radical-scavenging activity of organic extracts and of pure flavonoids of *Blumea balsamifera* leaves. In *Food Chemistry*, vol. 88, 2004, no. 2, p. 243-252.

TSIMOGIANNIS, D., I., 2004 Free radical scavenging and antioxidant activity of 5, 7, 3', 4'-hydroxy- substituted flavonoids. In *Food Scien. Emerg. Technology*, vol. 5, 2004, p. 523-528.

7. PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S PROBLEMATIKOU

Kategória	AED - Vedecké práce v domácich recenzovaných vedeckých zborníkoch, monografiách
Autor	Tóth, Jaroslav UKOFAFG
Názov	Rosmarinic Acid - An Important Phenolic Active Compounds of Lemon balm (Melissa officinalis L.) / Jaroslav Tóth ... [et al.]
Zdroj. Dok.	Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae, roč. 50. - ISBN 80-223-1879-5. - Bratislava : Univerzita Komenského, 2003. - S. 139-146
Spoluautori	Mrlianová, Mária UKOFAFG
Spoluautori	Tekel'ová, Daniela UKOFAFG
Spoluautori	Koreňová, Marcela UKOFAHO
Ohlasy	[o1] 2007 Razboršek, M.I. - Vončina, D.B. - Doleček, V. - Vončina, E. : In: Determination of major phenolic acids, phenolic diterpenes and triterpenes in rosemary (Rosmarinus officinalis L.) by gas chromatography and mass spectrometry. Acta Chimica Slovenica, Vol. 54, No. 1, 2007. s. 67 - SCOPUS
Ohlasy	[o1] 2007 Mencherini, T. - Picerno, P. - Scesa, C. - Aquino, R. : In: Triterpene, antioxidant, and antimicrobial compounds from Melissa officinalis. Journal of Natural Products, Vol. 70, No. 12, 2007. s. 1894 - SCOPUS
Ohlasy	[o1] 2007 Šafra, J. - Pospíšilová, M. - Honegr, J. - Spilková, J. : In: Determination of selected antioxidants in Melissae herba by isotachopheresis and capillary zone electrophoresis in the column-coupling configuration. Journal of Chromatography A, Vol. 1171, No. 1-2, 2007. s. 132 - SCOPUS
Ohlasy	[o1] 2005 Mehrabani, M. - Ghassemi, N. - Sajjadi, E. - Ghannadi, A. - Shams-Ardakani, M. : In: Main phenolic compound of petals of Echium amoenum Fisch. and C.A. Mey., a famous medicinal plant of Iran. Daru, Vol. 13, No. 2, 2005. s. 69 - SCOPUS
Ohlasy	[o1] 2005 Babulka, P. : In: Melissa (Melissa officinalis L.) [La melisse (Melissa officinalis L.)]. Phytotherapie, Vol. 3, No. 3, 2005. s. 117 - SCOPUS
Ohlasy	[o1] 2007 Sanchez-Medina, A. - Etheridge, Ch. - Hawkes, G.E. - Hylands, P. - Pendry, B.A. - Hughes, M.J. - Corcoran, O. : In: Comparison of rosmarinic acid content in commercial tinctures produced from fresh and dried lemon balm (Melissa officinalis). Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol. 10, No. 4, 2007. s. 463 - SCI
URL	http://www.fpharm.uniba.sk/Dokumenty/Acta_Facultatis/L/Pharm-15%20Tóth%20J-Mrlianová%20M-Tekel'ová%20D-Koreňová%20M.pdf
Info	2004 dostupné na www

Kategória	AED - Vedecké práce v domácich recenzovaných vedeckých zborníkoch, monografiách
Autor	Vargová, E.
Názov	Kyselina rozmarínová - významná účinná obsahová látka medovky lekárskej / E. Vargová ... [et al.]
Zdroj. dok.	Aktuálne problémy riešené v agrokomplexe [elektronický zdroj]. - ISBN 80-8069-295-5. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2003. - S. 169-171
Spoluautori	Koreňová, Marcela UKOFAHO
Spoluautori	Tóth, Jaroslav UKOFAFG
Spoluautori	Blanáriková, Vít'azoslava UKOFABM

Kategória	AFH - Abstrakty príspevkov z domácich konferencií
Autor	Blanáriková, Vít'azoslava UKOFABM
Názov	Vplyv elicitora na produkciu kyseliny rozmarínovej v suspenznej kultúre Melissa officinalis L. / Vít'azoslava Blanáriková ... [et al.]
Zdroj. dok.	Syntéza a analýza liečiv. 36. konferencia. - Bratislava : [s.n.], 2007. - S. 96
Podujatie	Syntéza a analýza liečiv. 36. konferencia , Bratislava , 11.-13.9.2007. SK
Spoluautori	Koreňová, Marcela UKOFAHO
Spoluautori	Stano, Ján UKOFAHO
Spoluautori	Mičieta, Karol UKOPRBBO
Kategória	AFL - Postery z domácich konferencií
Autor	Tóth, Jaroslav UKOFAFG
Názov	HPLC stanovenie obsahu kyseliny rozmarínovej v medovke lekárskej / Jaroslav Tóth ... [et al.]
Zdroj. dok.	Liečivé rastliny v novom miléniu. - Hlohovec : Slovakofarma, 2001. - S. 25
Podujatie	Liečivé rastliny v novom miléniu. Jubilejná konferencia , Ľubovnianske kúpele , 27.-28.9.2001. SK
Spoluautori	Mrlianová, Mária UKOFAFG
Spoluautori	Tekeľová, Daniela UKOFAFG
Spoluautori	Koreňová, Marcela UKOFAHO
Kategória	AFK - Postery zo zahraničných konferencií
Autor	Tóth, Jaroslav UKOFAFG
Názov	Comparison of Two Subspecies of Lemon Balm (Melissa officinalis L.) Using HPLC and GC-MS Methods / Jaroslav Tóth ... [et al.]
Zdroj. dok.	Modern Analytical Methods for Food and Beverage Authentication. - Lednice : [s.n.], 2002. - S 56.
Podujatie	EuroConference Modern Analytical Methods for Food and Beverage Authentication , Lednice , 29.- 31.8. 2002. CZ
Spoluautori	Mrlianová, Mária UKOFAFG
Spoluautori	Tekeľová, Daniela UKOFAFG
Spoluautori	Koreňová, Marcela UKOFAHO
Spoluautori	Hrabinská, Anna
Spoluautori	Kocmanová, Eva
Kategória	AFK - Postery zo zahraničných konferencií
Autor	Tóth, Jaroslav UKOFAFG
Názov	Obsah kyseliny rozmarínovej v nadzemných orgánoch Melissa officinalis L. cv. Citra / Jaroslav Tóth ... [et al.]
Zdroj. dok.	Chemické listy. - ISSN 0009-2770. - Roč. 96, č. 6 (2002), s. 522-523
Podujatie	54. sjezd chemických společností , Brno , 30.6.-4.7.2002. CZ
Spoluautori	Mrlianová, Mária UKOFAFG
Spoluautori	Tekeľová, Daniela UKOFAFG
Spoluautori	Koreňová, Marcela UKOFAHO
Spoluautori	Kocmanová, Eva

Kategória	AFL - Postery z domácich konferencií
Autor	Koreňová, Marcela UKOFAHO
Názov	Vplyv spôsobu pridávania elicitora - metyljasmonátu na tvorbu kyseliny rozmarínovej v suspenznej kultúre <i>Melissa officinalis</i> L. / Marcela Koreňová ... [et al.]
Zdroj. dok.	Farmaceutický obzor. - ISSN 0014-8172. - Roč. 73, č. 9-10 (2004), s. 274
Podujatie	VII. zjazd Slovenskej farmaceutickej spoločnosti. Pokroky v liekových formách a nové excipienty. Sympóziu , Nitra , 9.-11.9.2004. SK
Spoluautori	Tóth, Jaroslav UKOFAFG
Spoluautori	Blanáriková, Vít'azoslava UKOFABM
Spoluautori	Stano, Ján UKOFAHO
Spoluautori	Mrlianová, Mária UKOFAFG

Kategória	AFL - Postery z domácich konferencií
Autor	Koreňová, Marcela UKOFAHO
Názov	Vplyv metyljasmonátu na tvorbu kyseliny rozmarínovej v suspenznej kultúre <i>Melissa officinalis</i> L. cv. Citra / Marcela Koreňová ... [et al.]
Zdroj. dok.	10. pracovný deň Sekcie prírodných liečiv a 20 rokov odborných konferencií o liečivých rastlinách. Zborník abstraktov. - Stará Ľubovňa : Vilor, 2005. - S. 38
Podujatie	10. pracovný deň Sekcie prírodných liečiv a 20 rokov odborných konferencií o liečivých rastlinách , Ľubovnianske kúpele , 5.-7.9.2005. SK
Spoluautori	Blanáriková, Vít'azoslava UKOFABM
Spoluautori	Tóth, Jaroslav UKOFAFG
Spoluautori	Stano, Ján UKOFAHO