UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie

Kateřina Bělonožníková

Vlastnosti rostlinných extraktů

Properties of plant extracts

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením své školitelky doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne: Podpis: ……

Kateřina Bělonožníková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce a zároveň vedoucí laboratoře paní doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc., a paní RNDr. Veronice Hýskové, Ph.D., za jejich odborné a cenné rady a ochotu kdykoliv pomoci.

Abstrakt

Rostliny syntetizují řadu látek označovaných jako sekundární metabolity. Patří mezi ně produkty fenylpropanoidní dráhy (flavonoidy, stilbeny, anthokyaniny, taniny), isoprenoidy a alkaloidy. Studiu sekundárních metabolitů rostlin je věnována značná pozornost, protože jsou spojovány s pozitivním vlivem na lidské zdraví a snížením rizika některých chorob včetně rakoviny, diabetu 2. typu a poruch kardiovaskulárního systému. Mechanismus účinku jednotlivých látek není dosud přesně znám, pozitivně se projevuje jejich antioxidační kapacita.

V této práci byly připraveny extrakty z 22 druhů ovoce a zeleniny, byl stanoven celkový obsah fenolických látek, flavonoidů a antioxidační kapacita pomocí metody FRAP (z angl. *ferric ion reducing antioxidant power*) a ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)].

Vysoký obsah fenolických látek byl zjištěn v extraktu z jahody, višně a kiwi. Nejvyšší antioxidační kapacitu měl extrakt z jahody.

Další sledovanou vlastností byl vliv extraktů z ovoce a zeleniny na aktivitu trávicích enzymů pankreatické lipasy a α-amylasy. Extrakt z citronu, červeného rybízu, josty, limetky a višně snížil aktivitu lipasy, extrakty z červeného rybízu, dýně, kiwi a nashi výrazně inhibovaly štěpení škrobu α-amylasou.

Klíčová slova: fenolické látky, flavonoidy, antioxidační kapacita, inhibice enzymů

Abstract

Plants synthesize a wide variety of compounds called secondary metabolites. These compounds comprise products of the phenylpropanoid pathway (flavonoids, stilbens, anthocyanines and tannins), isoprenoids, and alkaloids. Since plant secondary metabolites seem to affect human health in a positive way, decrease the risk of some diseases such as cancer, diabetes type 2 and disorders of the cardiovascular system, their studies attract a lot of attention.

The mechanism of the effect of individual compounds on human health has not been clarified yet, the positive effect is probably caused by their antioxidant capacity.

In this work 22 extracts from different kinds of fruit and vegetables were prepared. The total content of phenolic compounds and flavonoids, the antioxidant capacity by methods FRAP (ferric ion reducing antioxidant power) and ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)] were determined.

High content of phenolic compounds was established in the extract from strawberry, cherry and kiwi, the highest antioxidant capacity was found in the extract from strawberry.

Another studied attribute of extracts from fruit and vegetables was their influence on the activity of digestive enzymes pancreatic lipase and α-amylase. The extracts from lemon, red currant, jostaberry, lime and cherry decreased the activity of lipase, while the extracts from red currant, pumpkin, kiwi and nashi pear significantly inhibited the hydrolysis of starch by α-amylase.

Keywords: phenolic compounds, flavonoids, antioxidant capacity, enzyme inhibition

Obsah

1 Úvod **10**

1.1 Sekundární metabolity rostlin 10

1.2 Fenylpropanoidy 13

1.2.1 Flavonoidy 14

1.2.2 Stilbeny 20

1.2.3 Anthokyaniny 21

1.2.4 Taniny 25

1.3 Isoprenoidy 27

1.3.1 Syntéza isoprenoidů 28

1.3.2 Vliv isoprenoidů na prenylaci proteinů v živočišném organismu 30

1.4 Antioxidanty 31

1.5 Vliv sekundárních metabolitů na aktivitu lipasy 32

1.6 Vliv sekundárních metabolitů na aktivitu α-amylasy 33

2 Cíl práce **35**

3 Materiál a metody **36**

3.1 Chemikálie a roztoky 36

3.1.1 Rozpouštědla 36

3.1.2 Čisté látky 36

3.2 Přístrojové vybavení 37

3.3 Rostlinný materiál 38

3.4 Experimentální metody 39

3.4.1 Extrakce šťáv 39

3.4.2 Stanovení obsahu vody lyofilizací rostlinného materiálu 39

3.4.3 Stanovení zbytku po vysušení extraktu 39

3.4.4 Stanovení obsahu fenolických látek 40

3.4.5 Stanovení obsahu flavonoidů 40

3.4.6 Stanovení antioxidačních vlastností metodou ABTS 41

3.4.7 Stanovení antioxidačních vlastností metodou FRAP 42

3.4.8 Stanovení vlivu rostlinného extraktu na aktivitu lipasy 43

3.4.9 Stanovení vlivu rostlinného extraktu na aktivitu α-amylasy 43

3.4.10 Stanovení množství proteinů dle Bradforda 44

3.4.11 Výpočet obsahu fenolických látek, flavonoidů a antioxidační kapacity 44

3.5 Statistické vyhodnocení a regresní analýza 45
4 Výsledky **47**
4.1 Gravimetrické stanovení 47
4.2 Obsah fenolických látek 48
4.3 Obsah flavonoidů 49
4.4 Antioxidační vlastnosti 50
4.5 Vliv rostlinného extraktu na aktivitu lipasy 52
4.6 Vliv rostlinného extraktu na aktivitu α-amylasy 53
5 Diskuze **54**
6 Shrnutí **57**
Reference **58**

Seznam použitých zkratek a značek

Následující seznam zkratek a značek použitých v této práci zahrnuje i výrazy od udaných odvozené, tedy např. zkratka ABTS znamená primárně 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát), ale vztahuje se také na od něj odvozené tvary.

%v	objemové procento
%w	hmotnostní procento
%(w/v)	hmotnostní koncentrace v procentech
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. *Bovine Serum Albumine*)
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DPPH	*N*,*N*-di(fenyl)pikrylhydrazyl
EA	ekvivalent askorbátu
EC	číslo enzymové klasifikace (z angl. *Enzyme Commission number*)
EF	ekvivalent fenolu
EK	ekvivalent kvercetinu
ET	ekvivalent troloxu
FL	flavonoid
FRAP	redukční (antioxidační) síla (z angl. *ferric ion reducing antioxidant power*)
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. *high-performance liquid chromatography*)
IPP	isopentenyldifosfát
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou (z angl. *Low-Density Lipoprotein*)

MEP	2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfátová dráha
MVA	mevalonátová dráha
PAL	fenylalaninamoniumlyasa (EC 4.3.1.5)
PL	fenolická látka
p-NP	*p*-nitrofenol
p-NPP	*p*-nitrofenylpalmitát
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. *Reactive Oxygen Species*)
RNS	reaktivní formy dusíku (z angl. *Reactive Nitrogen Species*)
TEAC	antioxidační kapacita vyjádřená v ekvivalentech troloxu (z angl. *trolox equivalent antioxidant capacity*)
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-*s*-triazin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

Veškeré dále zmíněné sacharidy jsou v D-formě, pokud není uvedeno jinak.

Veškeré dále zmíněné aminokyseliny jsou v L-formě.

1 Úvod

1.1 Sekundární metabolity rostlin

Sekundární metabolity jsou organické sloučeniny vznikající v těle rostlin ale i mikroorganismů, které se přímo nepodílí na procesu růstu, vývoje či rozmnožování [1]. Biosyntéza některých sekundárních metabolitů může být omezena jen na určité rostlinné druhy [2]. Nejedná se tedy o látky spojené se zakladními metabolickými drahami.

Funkce sekundárních metabolitů bývá většinou ekologické povahy. Tyto látky slouží především jako ochrana proti predátorům, parazitům či chorobám; při mezidruhové kompetici a pro větší úspěšnost rozmnožování [3]. Jejich hlavní úloha by se tedy dala shrnout jako snaha poskytovat danému organismu výhody pro přežití.

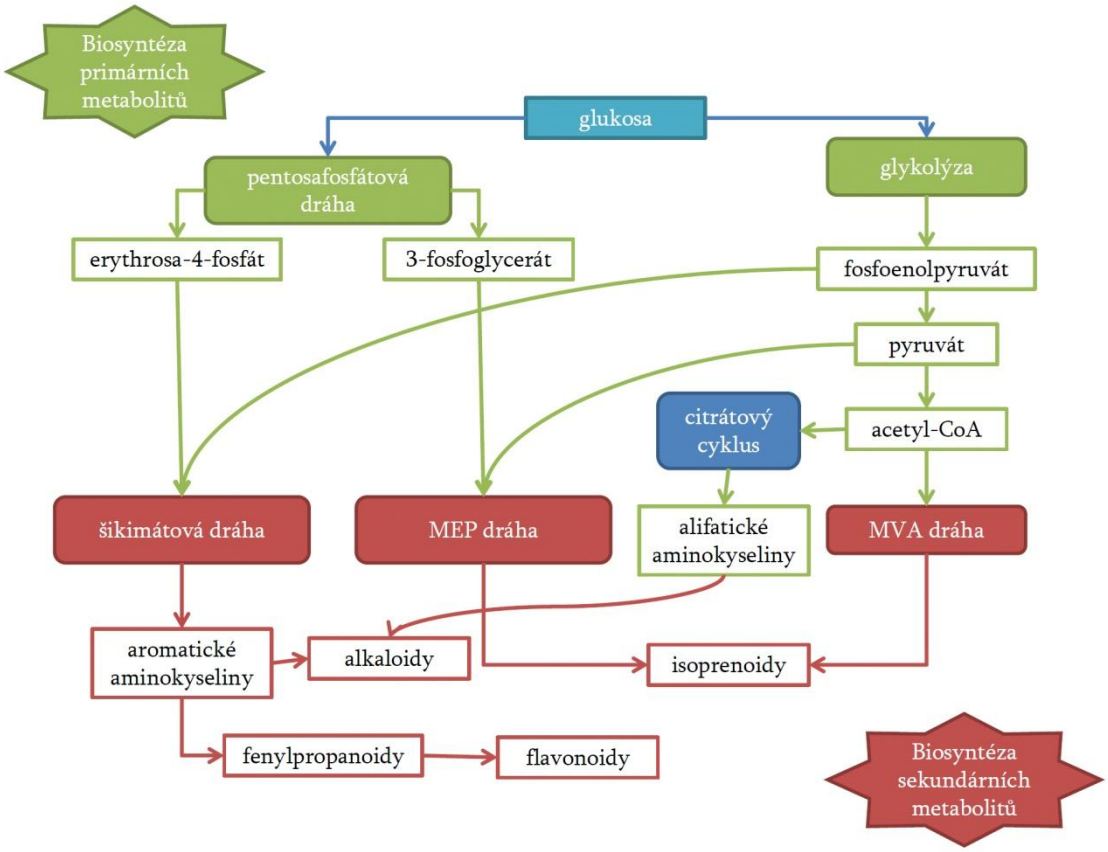
Na druhé straně primární metabolity jsou sloučeniny, které se účastní základních metabolických drah, fotosyntézy, respirace, růstu a vývoje [4]. Jedná se o látky, které se vyskytují ve všech rostlinách a mají vždy stejnou úlohu [5]. Do této skupiny řadíme např. sacharidy, mastné kyseliny, nukleotidy, aminokyseliny, organické kyseliny, cytochromy či chlorofyly [4, 5].

Význam sekundárních metabolitů pro rostlinu je dán jejich přisedlým způsobem života a nemožností utéct před predátory nebo před nevhodnými okolními podmínkami [5]. Funkcí sekundárních metabolitů je tedy jejich ochrana před predátory a patogeny jakou jsou viry, bakterie a houby. Jelikož rostliny jsou důležitým zdrojem potravy pro další organismy, chrání se rostliny sekundárními metabolity před herbivory, kterými jsou hmyz a především savci.

Rostlina je však také ohrožena abiotickým stresem jako je UV záření, ozon či herbicidy, před kterým ji tyto látky také dokážou bránit. Sekundární metabolity jsou velmi důležité v adaptaci na kontinuálně se měnící okolní podmínky, poskytují výhody při rozmnožování, tvoří pigmenty a intenzivní vůně, které jsou silnými atraktanty opylovačů a rozptylovačů semen. Díky těmto vlastnostem pomáhají rostlině při kompetici s jejími rivaly z rostlinné říše. Mohou sloužit i jako signální molekuly [1].

Sekundární metabolity mohou být přítomny konstitutivně nebo mohou být syntetizovány jako odpověď na stresové podmínky. Další možností je aktivace těchto látek po poškození integrity rostliny [5].

Biosyntéza sekundárních metabolitů představuje cesty, které navazují na primární metabolické dráhy (obr. 1.1), a ačkoli jsou charakterizovány velkou biochemickou diverzitou, syntetizují se pouze z malého počtu klíčových primárních metabolitů [1, 6].



Obrázek 1.1: Přehled hlavních metabolických drah biosyntézy sekundárních metabolitů [4,5,6].

Rostliny jsou významnou součástí stravy člověka, poskytují většinu esenciálních vitamínů a minerálů a množství dalších látek [7]. Od nepaměti jsou rostliny také zdrojem léčivých látek, nejprve byly používány ve formě čajů popř. mastí, později byly připravovány a vyráběny jako léčiva a dále synteticky upravovány za účelem získání látek ještě účinnějších [8].

Struktura sekundárních metabolitů se musela vyvinout tak, aby mohla interagovat s molekulárními cíli v buňkách a tkáních mikroorganismů, živočichů a jiných rostlin. Tím, že rostlinné sekundární metabolity připomínají endogenní metabolity, ligandy, hormony, signální transdukční molekuly, anebo neurotransmitery, mohou ovlivnit fyziologické funkce, případně i mít prospěšné léčebné účinky. Z tohoto důvodu mají sekundární metabolity potenciál fungovat jako antidepresiva, sedativa, svalové relaxanty nebo anestetika [9].

O některých sekundárních metabolitech se v poslední době mluví jako o nutraceutikách, látkách přítomných v potravě, jejichž prospěšnost plyne z dlouhodobé konzumace [7, 9, 10].

Sekundární metabolity jsou tedy ekonomicky důležité jako léčiva, doplňky stravy, dále jako ochucovadla a vůně, barvy a pigmenty či pesticidy [3, 8].

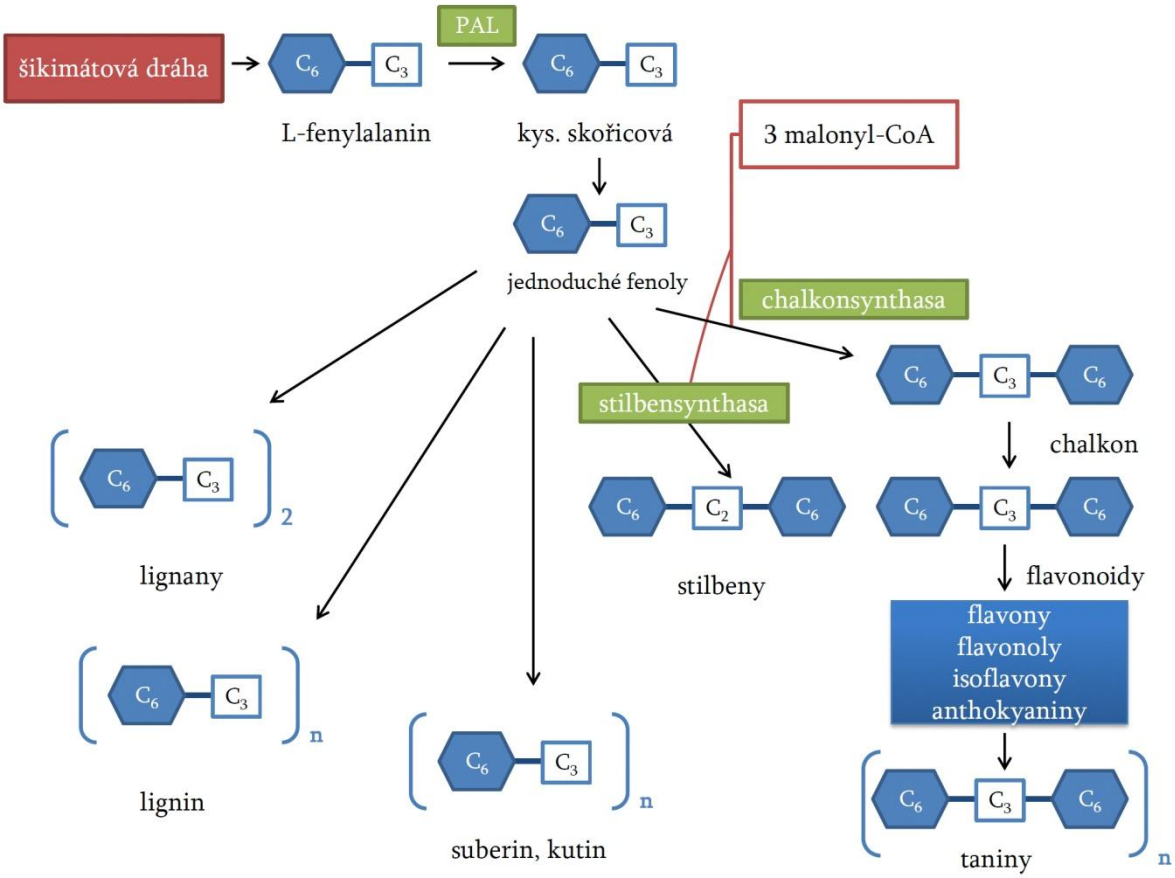
Z hlediska chemické struktury můžeme rostlinné sekundární metabolity rozdělit do následujících skupin [1]:

- fenylpropanoidy a jejich deriváty
- isoprenoidy
- alkaloidy

1.2 Fenylpropanoidy

Fenylpropanoidy patří mezi širokou skupinu polyfenolických látek. Jejich rozsáhlá diverizita je v principu výsledkem modifikací několika základních struktur získaných ze šikimátové dráhy [11].

Šikimátová dráha využívá jednoduché sacharidové metabolity z glykolýzy (fosfoenolpyruvát) a pentosafosfátové dráhy (erythrosa-4-fosfát) pro syntézu aromatických aminokyselin. Syntéza fenylpropanoidů (obr. 1.2) se odvozuje od deaminace fenylalaninu za tvorby kyseliny skořicové. Klíčovou a regulační reakci katalyzuje fenylalaninamoniumlyasa (PAL, EC 4.3.1.5), která reguluje růst a vývoj, ale též odpovídá na stimuly z okolního prostředí. Vliv na expresi a aktivitu PAL má tedy např. světlo, poškození rostliny, gamma záření, klíčení a diferenciace pletiv [1, 5].



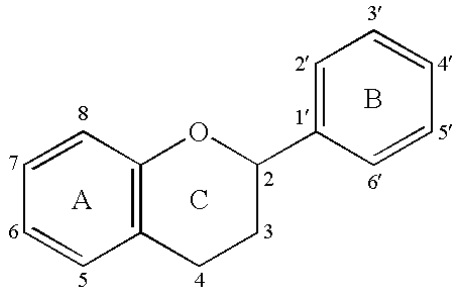
Obrázek 1.2: Stručný přehled produktů metabolismu fenylpropanoidů (upraveno dle [5, 11]).

Mezi nejpočetnější a zároveň i nejvýznamnější zástupce fenylpropanoidů patří flavonoidy, kumariny, stilbeny a ligniny [1, 12].

1.2.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou benzo-γ-pyron deriváty skládající se z fenolových a pyranových kruhů a jsou klasifikovány dle svých substitucí. Flavanový cyklický skelet (obr. 1.3), který se skládá ze dvou substituovaných benzenových kruhů (A a B) a pyranového kruhu C, napojeného na kruh A [6].

Flavonoidy se liší v poloze hydroxylových, methoxy a glykosidových skupin a v konjugaci mezi A- a B- kruhy [13].

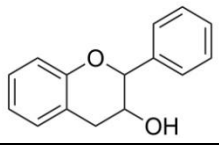
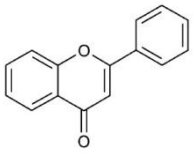
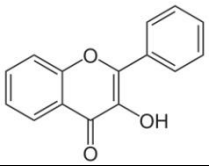
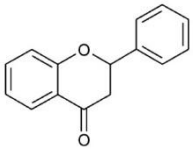
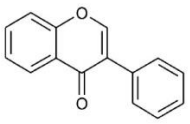


Obrázek 1.3: Základní struktura flavonoidů (upraveno dle [14]).

Fenylový kruh B (obr. 1.3) může být napojen na pyranový kruh v pozici 2 (flavonoidy, mezi něž patří většina flavonoidních barviv), 3 (isoflavonoidy, od nichž se odvozují insekticidy některých rostlin, zvané rotenony) nebo 4 (neoflavonoidy). Další klasifikace je založena na stupni oxidace pyranového kruhu: flavany, flavanoly, flavony, flavonoly, anthokyanidiny, chalkony [6].

V tabulce 1 na další straně 15 jsou shrnuty struktury a zdroje některých zástupců flavonoidů.

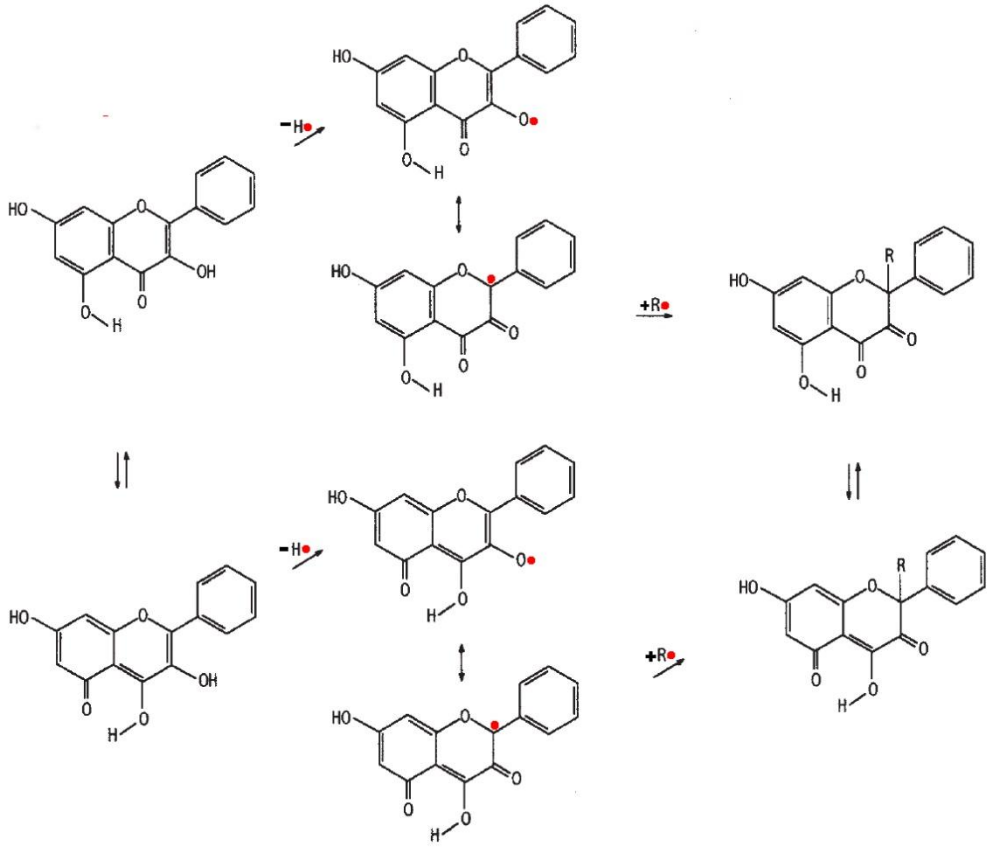
Tabulka 1: Stručný přehled některých zástupců flavonoidů (upraveno z [13]).

třída	základní struktura	flavonoid	znak substituce	zdroj
Flavanol		(+)-katechin (-)-epikatechin	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH	čaj čaj
Flavon		chrysin apigenin luteolin rutin	5,7-OH 3,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinosid	slupky ovoce petržel, celer mrkev, celer červené víno, slupka rajčete
Flavonol		kaempferol kvercetin myricetin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH	pór, brokolice rajče, cibule brusinka
Flavanon (dihydroflavon)		naringenin hesperidin	5,7,4'-OH 3,5,3'-OH, 4'-OMe, 7-rutinosid	citrusy pomeranč
Isoflavon		genistein daidzein	5,7,4'-OH 7,4'-OH	sojové boby sojové boby

Biologické a fyziologické účinky flavonoidů na lidské zdraví jsou bezpochyby centrem zájmu mnoha vědeckých studií. Bylo prokázáno, že flavonoidy vykazují antibakteriální, protivirové, protizánětlivé, antialergické, protirakovinové a antiulcerózní vlastnosti. Dále inhibují oxidaci LDL lipoproteinů, čímž zabraňují vzniku arterosklerózy, působí proti shlukování krevních destiček (antitrombotický efekt), podporují relaxaci srdečního svalstva (antihypertenzní a antiarytmický efekt) a udržení permeability cév [10, 15].

Ochranné působení flavonoidů je připisováno jejich schopnosti vychytávat volné radikály (obr. 1.4 na straně 16), vázat do komplexů ionty přechodných kovů (obr. 1.5 na straně 17), a tak měnit jejich dostupnost jako katalyzátorů oxidačně-redukčních reakcí, aktivovat antioxidační enzymy a inhibovat oxidasy [10].

Pro tyto děje je pravděpodobně klíčová polyfenolická struktura flavonoidů. Avšak aby mohl být polyfenol definován jako antioxidant, musí splňovat dvě základní podmínky: za prvé, pokud je přítomen v nízké koncentraci vůči substrátu, který lze oxidovat, musí pozdržet, retardovat nebo zabránit jeho autooxidaci nebo oxidaci zprostředkovanou volnými radikály; za druhé musí být jeho vlastní radikál po zachycení elektronu stabilní [16].



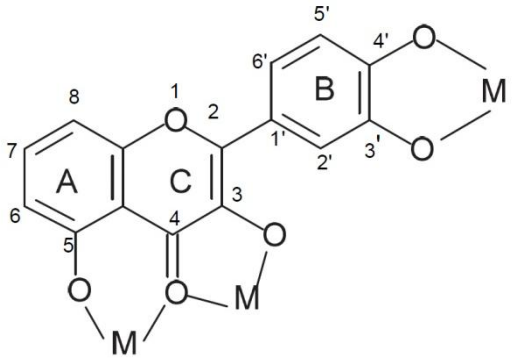
Obrázek 1.4: Mechanismus zachycení a přeměny radikálu galanginem (upraveno dle [17])

Další vlastností flavonoidů je schopnost chelatovat ionty kovů (obr. 1.5). Chelatace kovů (převážně iontů železa a mědi) brání vzniku radikálů, které poškozují cílové biomolekuly. Navíc, využití chelatorů jako jsou flavonoidy, je výhodnější než používání syntetických struktur kvůli nebezpečí jejich toxicity. Ve struktuře některých flavonoidů se nachází tři potenciální koordinační místa:

a) mezi 5-hydroxy a 4-karbonylovou skupinou

b) mezi 3-hydroxy a 4-karbonylovou skupinou

c) mezi 3',4'-hydroxy skupinou v B kruhu (obr. 1.5 na straně 17).

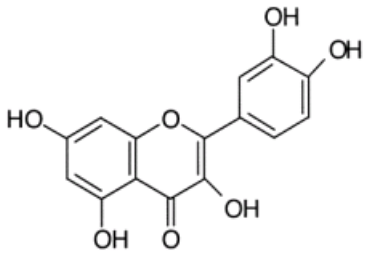


Obrázek 1.5: Potenciální koordinační místa pro vazbu iontů ve struktuře některých flavonoidů (upraveno dle [18]). M značí ion kovu.

Celková antioxidační aktivita flavonoidů je tedy kombinací přímé reakce s volnými radikály a chelatace látek zodpovědných za tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) [18].
Pro člověka je nejdůležitějším resp. nejčastějším zdrojem flavonoidů ovoce (např. jahody, meruňky, maliny), zelenina (např. petržel, cuketa, rajče), léčivé rostliny (např. hluchavka bílá, vinná réva), a od nich odvozené nápoje jako je čaj, víno nebo káva [19].

1.2.1.1 Metabolismus kvercetinu

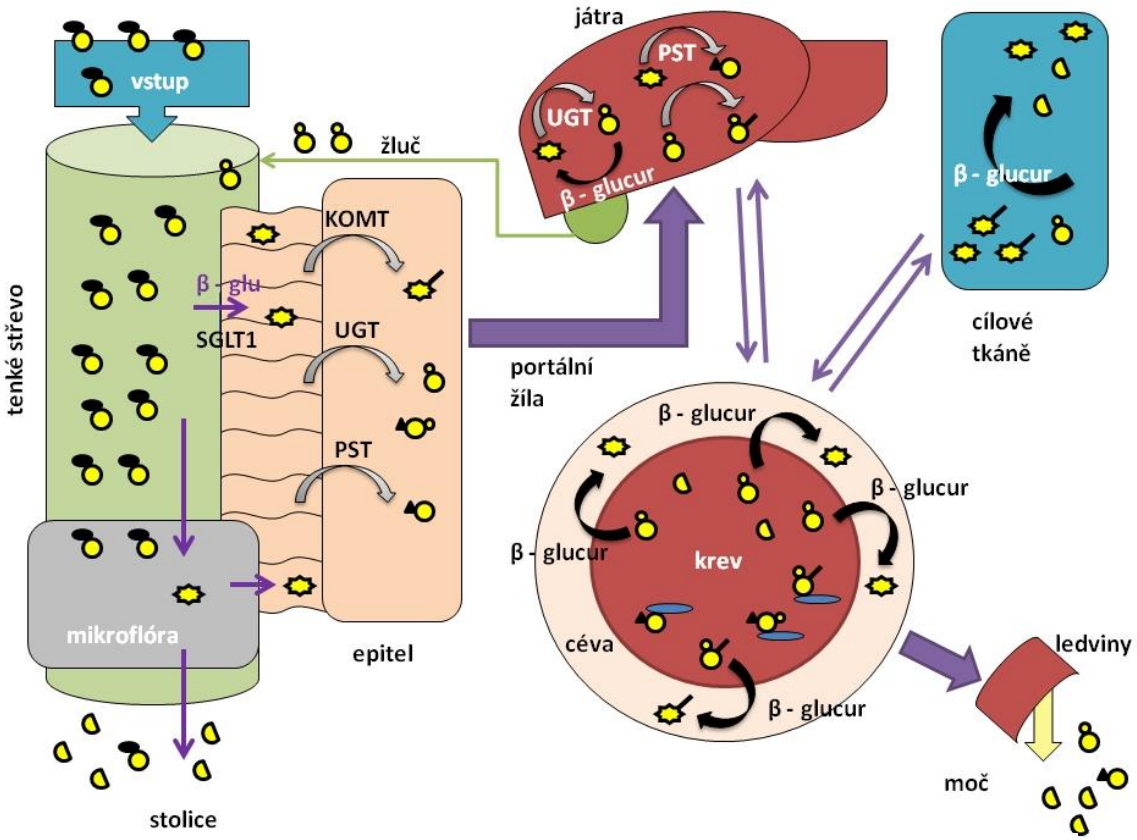
Mezi nejvíce zastoupené flavonoidy v zelenině, která je součástí naší potravy, patří kvercetin (obr. 1.6). Tato látka byla také využita jako modelový flavonoid pro studie jeho biologických účinků a vlivu na lidský organismus [5].



Obrázek 1.6: Struktura kvercetinu [4].

Ke vstřebávání kvercetinu dochází v tenkém střevě po odštěpení sacharidové složky β-glukosidasou. Pravděpodobně již ve střevních buňkách dochází k modifikacím aglykonu pomocí methylové skupiny (vzniká isorhamnetin), kyseliny glukuronové nebo sulfatace. Tyto metabolity jsou transportovány do jater a po dalších úpravách a vazbě na albumin transportovány cévním systém k jednotlivým orgánům a tkáním. Již v endotelových

buňkách a dalších tkáních může docházet působením β-glukuronidasy opět k odštěpení volného aglykonu, který je pravděpodobně nejdůležitější pro biologické účinky. Z těla může být modifikovaný kvercetin vyloučen močí nebo též z jater žlučí jako kvercetinglukuronid. Část metabolitů kvercetinu je dále metabolizována střevními bakteriemi (obr. 1.7) [20, 21, 22].



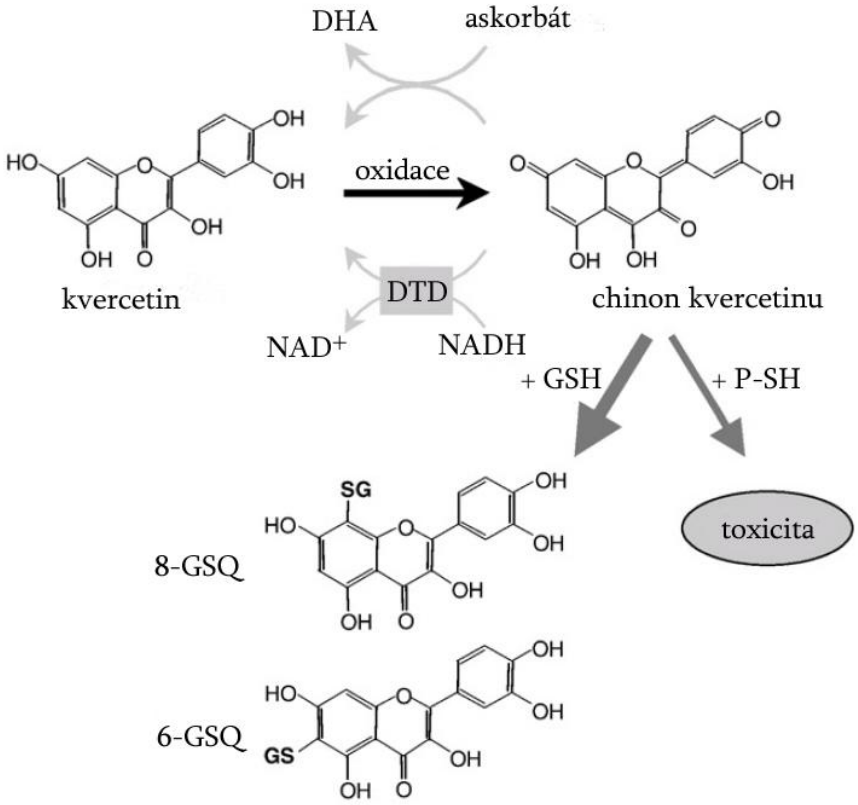
	glykosid kvercetinu
	kvercetin
	isorhamnetin
	kvercetinsulfát
	kvercetinglukuronid
	isorhamnetinglukuronid
	kvercetinsulfátglukuronid
	fenolické kyseliny
	albumin

β – glu	β – glukosidasa
β – glucur	β – glucuronidasa
KOMT	katechol-O-methyltransferasa
PST	fenolsulfotransferasa
SGLT1	glukosový transporter
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa

Obrázek 1.7: Metabolismus kvercetinu v lidském organismu (upraveno podle [20]).

V literaruře byla popsána řada biologických účinků kvercetinu včetně antiproliferačních a ochranou před tvorbou tumorů. Tyto účinky souvisí především s antioxidačními vlastnostmi, kvercetin může poskytovat elektrony reaktivním formám kyslíku, a tím snížit možnost poškození DNA. Rovněž chelatace kovů, které se podílejí na vzniku ROS, přispívá ke snížení oxidačního poškození DNA [23].

Z kvercetinu po oxidaci vzniká toxický chinon kvercetinu, který je schopen arylovat thioly proteinů. V buňce existují mechanismy ochrany před tímto produktem. Chinon může být konjugován s glutathionem nebo enzymaticky redukován za spotřeby NADH, redukčním činidlem může být i askorbát (obr. 1.8).



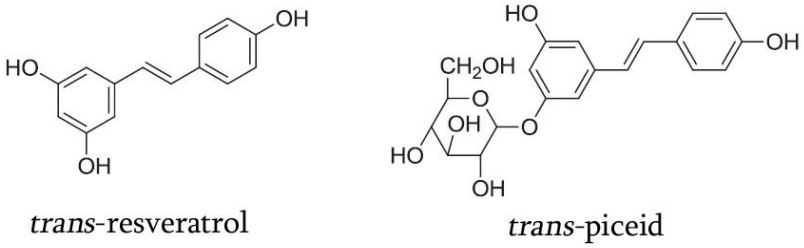
Obrázek 1.8: Oxidace kvercetinu. (upraveno dle [24]). Přehled uvedených zkratek: dehydroaskorbát (DHA); DT-diaforasa (DTD); glutathion (GSH); thiolové skupiny proteinů (P-SH); 8-glutathionylkvercetin (8-GSQ); 6-glutathionylkvercetin (6-GSQ).

Při vyšší koncentraci kvercetinu v plazmě, které je možno dosáhnout pouze dlouhodobým podáváním kvercetinu jako potravinového doplňku nebo intravenózní aplikací, převládají prooxidativní účinky, které mohou ovlivňovat všechna stádia kancerogeneze. Bylo popsáno snížení exprese onkogenů, např. Ras, MEK a PI3K, naopak zvýšená exprese

tumor supresorových genů jako p53 a p21 a cesta aktivace apoptózy účinkem kvercetinu [25].

1.2.2 Stilbeny

Stilbeny zahrnují skupinu bioaktivních sloučenin, jejichž hlavním zástupcem je *trans*-resveratrol (3,5,4'- trihydroxystilben) a jeho přírodní glykosid *trans*-piceid. Struktura stilbenů je obecně charakterizována připojením druhého aromatického kruhu k 9'-C atomu fenylpropanoidového zbytku (obr. 1.9) [5].

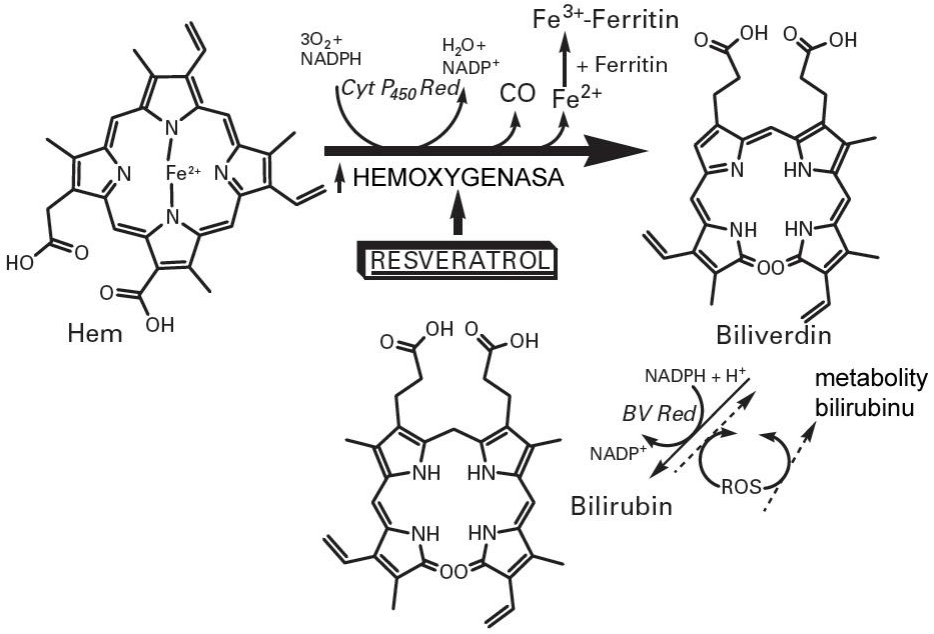


Obrázek 1.9: Struktury *trans*-resveratrolu a *trans*-piceidu [26].

Molekula *trans*-resveratrolu je pro člověka zajímavá z hlediska svých protizánětlivých, protinádorových a antioxidačních vlastností [26, 27, 28].

Červené víno představuje nejdůležitější zdroj *trans*-resveratrolu pro člověka. Tato molekula je pravděpodobně nejpodstatnějším faktorem tzv. francouzského paradoxu. Ten popisuje epidemiologické zjištění o nízkém výskytu kardiovaskulárních onemocnění francouzské populace, navzdory tomu, že jejich strava je bohatá na nasycené tuky, ale obsahuje také denní příjem přiměřeného množství červeného vína. *Trans*-resveratrol je biosyntetizován vinnou révou (a dalšími rostlinami) zejména jako odpověď na patogen *Botrytis cinerea* [26, 27].

Jedním z míst účinku *trans*-resveratrolu je pravděpodobně indukce hemoxygenasy. Jedná se o enzym, jehož funkcí je rozštěpit hem, který poté uvolňuje ionty železa, oxid uhelnatý a biliverdin, který je rychle konvertován na bilirubin (obr. 1.10 na straně 21). Uvolněné ionty železa se podílí na udržení homeostázy tohoto prvku v těle. Na druhé straně ionty železa se mohou účastnit Fentonovy reakce (reakce s peroxidem vodíku za tvorby volných radikálů). Oxid uhelnatý při fyziologické koncentraci se může vázat s guanylátcyklasou a působit vazodilatačně. Bilirubin i biliverdin mají schopnost zachycovat volné radikály [28].

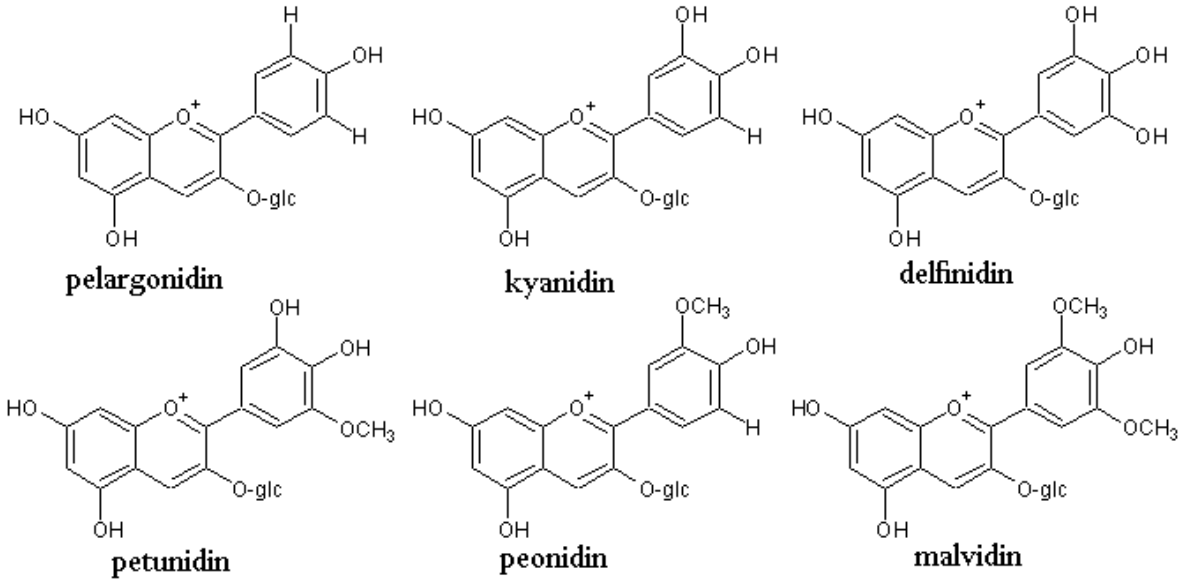


Obrázek 1.10: Účinek t*rans*-resveratrolu při degradaci hemu a indukci hemoxygenasy (upraveno dle [28]). Přehled uvedených zkratek: NADPH:cytochrom P450 reduktasa (Cyt P_{450} Red); biliverdinreduktasa (BV Red).

1.2.3 Anthokyaniny

Flavonovým glykosidům jsou velmi příbuzná ve vodě rozpustná červená, modrofialová až modrá barviva květů, listů a plodů vyšších rostlin, nazývaná anthokyaniny.

Chemicky jsou anthokyaniny glykosidy, jejichž aglykon tvoří anthokyanidiny, což jsou hydroxyderiváty heterocyklu flavanu (obr. 1.11 na straně 22), jehož kladně nabitý kyslík v pyranovém kruhu umožňuje vznik oxoniových solí s anionty. Cukernou složkou anthokyaninů bývá glukosa, galaktosa, rhammosa, arabinosa nebo jejich spojením vzniklé oligosacharidy [6].

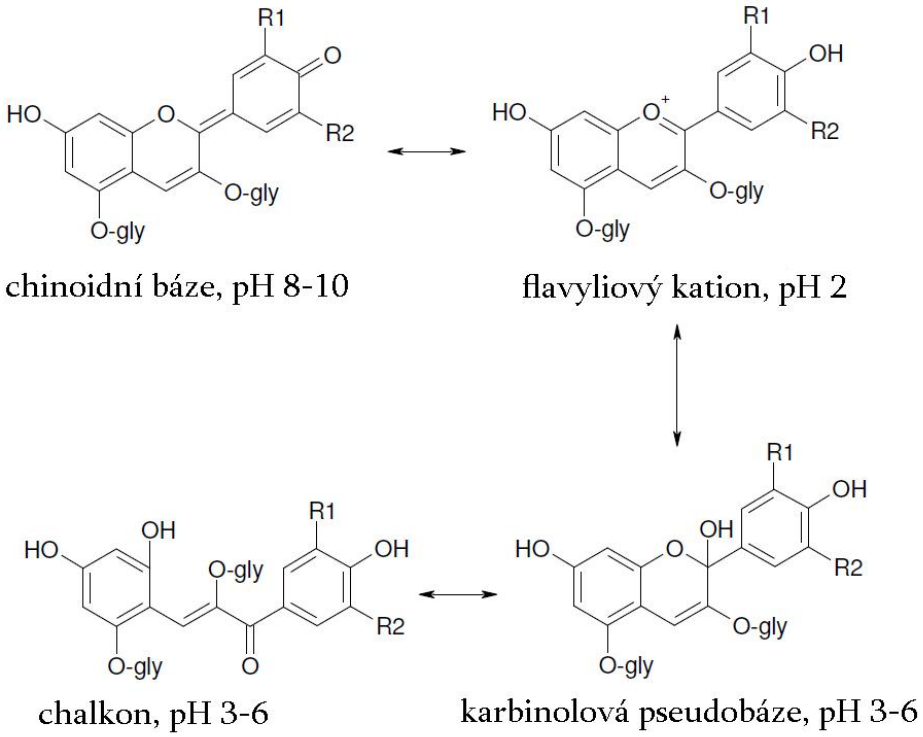


Obrázek 1.11: Struktura zástupců anthokyaninů (upraveno dle [29]). Z možných glykosidů jsou znázorněny β-glukosidy.

Barva květů a plodů je kromě červených až modrých anthokyaninů (z řečtiny *kyaneos* - modrý a *anthos* - květ) a anthoxanthinů (z řečtiny *xanthos* - žlutý), též ovlivněna pomocí flavonolů a flavonů (z latiny *flavus* - žlutý) a chalkonů a auronů, které se dříve nazývaly anthochlory (z řečtiny *chloros* - zelený) [19].

Na jedné straně anthokyaniny slouží jako přírodní barviva (pigmenty) ovoce a zeleniny, ale jedná se také o bezpečné a prokázané antioxidanty. Studie *in vitro* a *in vivo* ukázala, že anthokyaniny projevují potenciální účinek na zlepšení kardiovaskulárního stavu, zdraví oka, pokožky, ale také ochranu před infekcí močového měchýře. Dále se zkoumá jejich antikarcinogenní potenciál a možnost jejich využití jako při léčbě pacientů s diabetem 2. typu [30].

Unikátnost anthokyaninů se projevuje také ve schopnosti elektronové delokalizace, kdy se tvoří různé rezonanční struktury v závislosti na hodnotě pH. Ve vodné fázi koexistují v rovnováze čtyři specifické strukturní formy anthokyaninů (obr. 1.12 na straně 23): chinoidní báze (modrá, převládající v zásaditém pH v rozmezí 8 - 10), flavyliový kation (červenooranžová, převažující v silně kyselém pH okolo hodnoty 2), karbinolová pseudobáze (bezbarvá) a chalkon (bezbarvá, v rozmezí pH 3 - 6). Procentuální zastoupení rozdílných specifických forem se může lišit, neboť závisí na pH a na konkrétní struktuře daného anthokyaninu [30, 31].



Obrázek 1.12: Rezonanční struktury anthokyaninů v závislosti na pH (upraveno z [31]).

Tabulka 2 na straně 24 shrnuje přehled hlavních zástupců anthokyaninů z vybraných druhů ovoce.

Tabulka 2: Přehled zástupců anthokyaninů v různých druzích ovoce (upraveno z [4, 19]).

český název	latinský název	hlavní anthokyaninová barviva
borůvka	*Vaccinium myrtillus*	Dp 3-rutinosid, 5-glukosid a 3-glukosid
hruška (slupka)	*Prunus persica*	Cy 3-rutinosid, 3-glukosid, 3-galaktosid a 3-arabinosid
jahoda*)	*Fragaria sp.*	Pg a Cy 3-glukosidy
mango	*Mangifera indica*	Pn 3-galaktosid
malina[b)]	*Rubus idaeus*	Cy a Pg-3-glukosylrutinosid, 3-soforosid, 3-rutinosid, 3-glukosid
pomeranč*)	*Citrus sinensis*	Cy a Dp 3-glukosidy
oliva	*Olea europea*	Cy triosidy, 3-rutinosid a 3-glukosid a acylované Cy pigmenty
rybíz červený*)	*Ribes rubrum*	Cy 3-glukosid, 3-rutinosid, 3-sambubiosid, 3-soforosid, 3- glykosylrutinosid, 3-xylosylrutinosid
švestka	*Prunus domestica*	Cy a Pn 3-glukosidy a 3-rutinosidy
višně*)	*Prunus cerasus*	Cy 3-glukosid, 3-rutinosid, 3-soforosid, 3-glukosylrutinosid, 3-sambubiosid, Pn 3-glukosid a 3-rutinosid

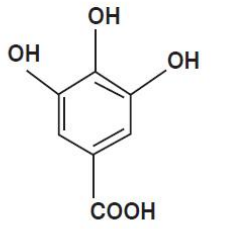
*) Ovoce studované v této práci. Přehled uvedených zkratek: kyanidin (Cy), pelargonidin (Pg), peonidin (Pn), delfinidin (Dp), petunidin (Pt), malvidin (Mv).

1.2.4 Taniny

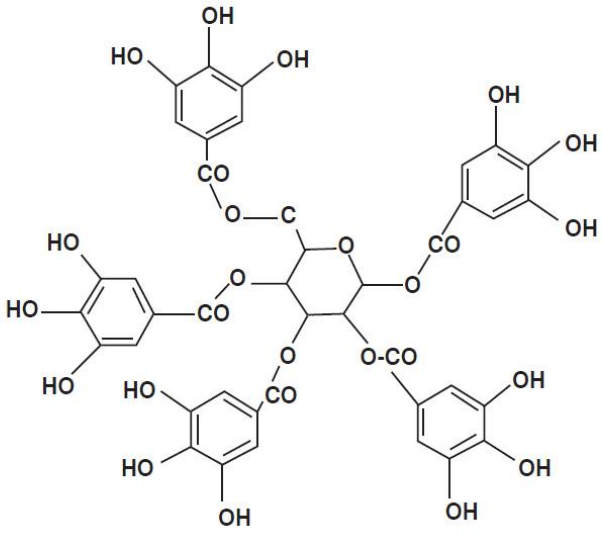
Taniny jsou přírodní polyfenolické sloučeniny o relativní molekulové hmotnosti (M_r) 500 – 3000. Mohou vytvářet interakce s dalšími makromolekulami, jako jsou bílkoviny, celulosa nebo pektiny [6, 32]. Můžeme je rozdělit na dvě základní skupiny: hydrolyzovatelné a kondenzované taniny, které mají zcela odlišnou chemickou stavbu.

1.2.4.1 Hydrolyzovatelné taniny

Hydrolyzovatelné taniny jsou většinou estery glukosy nebo jiných sacharidů s aromatickými hydroxykyselinami gallovou nebo *m*-digallovou (*m*-galloylgallovou) kyselinou, tzv. gallotaniny (obr. 1.13), nebo ellagovou kyselinou, ellagitaniny. Zbytky těchto kyselin se mohou vázat na pět volných hydroxylových skupin glukosy. Hydrolyzovatelné taniny nacházíme zejména v kůře a dřevě některých stromů [6].



kyselina gallová



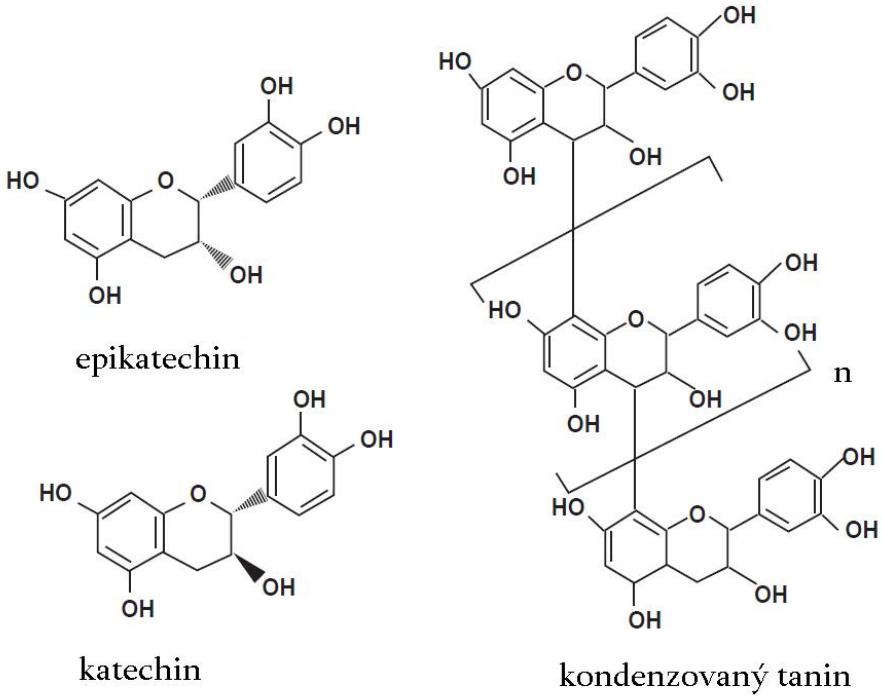
gallotanin

Obrázek 1.13: Gallotanin jako jednoduchý příklad hydrolyzovatelných taninů, jedná se o pentagalloylglukosu. (upraveno dle [33]).

Hydrolyzovatelné taniny jsou přítomny pouze ve stopovém množství v běžně přijímané stravě [6].

1.2.4.2 Kondenzované taniny

V případě kondenzovaných taninů neboli proanthokyanidinů se jedná o polymerní látky, jejichž monomerními jednotkami jsou flavonoidy flavany, zejména flavan-3-oly, zvané katechiny (obrázek 1.14). Kondenzované taniny jsou široce zastoupeny v ovoci, zelenině, pícninách, rostlinách, kakau, červeném vínu a určitých obilovinách (čirok, proso) a luštěninách [6, 33].



Obrázek 1.14: Příklad struktury kondenzovaného taninu [33]. Flavanové jednotky jsou spojovány vazbami mezi atomy uhlíku 4 a 8. Katechiny mají strukturu blízkou anthokyanidinům a flavanolu; mnohé vyšší oligomery a polymery proanthokyanidinů jsou kondenzované taniny. Kondenzované taniny se vyskytují ve formě dimerů a trimerů, které však snadno podléhají enzymové oxidaci za vzniku polymerních hnědě až červeně zbarvených látek. Příkladem je hnědnutí rozříznutého jablka nebo mechanicky poškozeného listu [6].

Kondenzované taniny mají širokou škálu biologických a farmakologických aktivit zahrnující antioxidační, kardioprotektivní, protinádorové a analgetické účinky, bez způsobení výrazných toxikologických efektů.

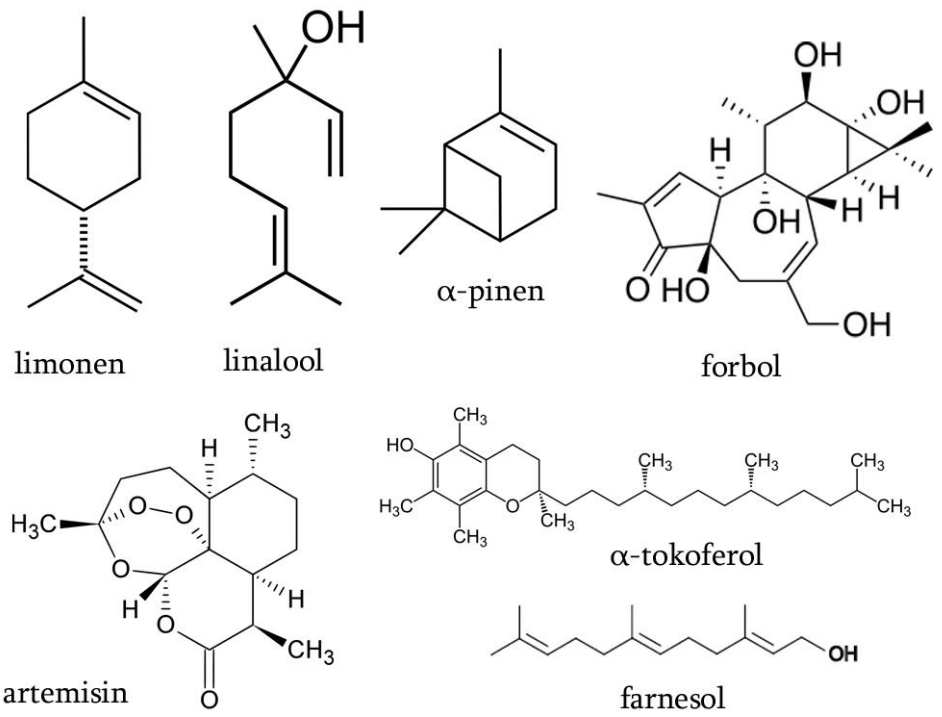
Bylo pozorováno, že taniny dokáží zlepšit příjem glukosy díky mediátorům signalizačních drah pro inzulin, jako jsou PI3K (fosfoinositid-3-kinasa) a p38 MAPK (mitogenem aktivovaná protein kinasa) aktivace a translokace glukosovým transporterem (GLUT-4). Redukce glykémie (hladiny glukosy v krvi) fenolickými sloučeninami byla přisouzena schopnostem redukce absorpce živin (př. katechiny čaje inhibují absorpci glukosy v tenkém střevu), snížení příjmu potravy (př. epigallokatechingalláty výrazně redukují příjem potravy), indukce regenerace β-buněk. Taniny byly také popsány jako antihyperglykemické látky v metabolismu diabetických krys. Taniny jsou tedy zkoumány v souvislosti s regulací metabolismu diabetiků 2. typu [32].

1.3 Isoprenoidy

Isoprenoidy jsou přítomné ve všech živých organismech, avšak jejich nejrozmanitější skupinu nalézáme u rostlin. V primárním metabolismu slouží jako složky membrán (steroidy), fotosyntetické pigmenty (chlorofyly, karotenoidy), přenašeče elektronů (chlorofyly, chinony) a rostlinné hormony (kyselina abscisová, cytokininy, gibberelliny a brassinosteroidy). Mezi isoprenoidy patří i sekundární metabolity jako esenciální oleje (monoterpeny), atraktanty hmyzu, fytoalexiny (sekvi-, di-, triterpeny), antimikrobiální látky a tzv. antikrmiva (mono- a seskviterpeny) chránící rostlinu před různými predátory [5].

Rostlinné isoprenoidy jsou důležité i komerčně, například ochucovadla jídel, nápojů, vůně, přírodní insekticidy (př. pyrethrin), rozpouštědla (př. terpentýn), a polymerní látky jako kaučuk. Také nachází uplatnění jako farmaka nebo jejich prekurzory [5]. Například artemisinin je účinné antimalarikum. Taxol se používá při léčbě rakoviny. β-karoten a α-tokoferol jsou důležitými vitaminy [34].

Na obrázku 1.15 na straně 28 jsou znázorněny vybrané struktury isoprenoidu vyšších rostlin.

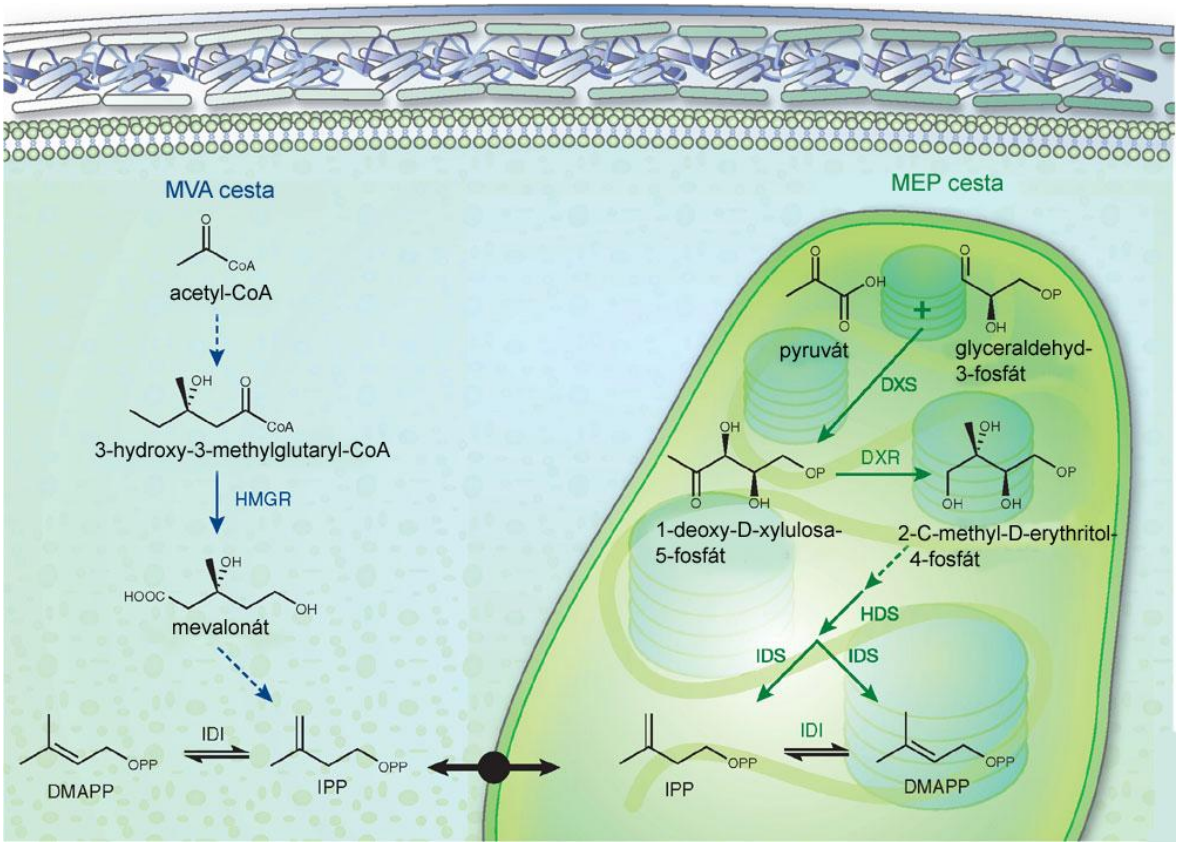


Obrázek 1.15: Vybrané struktury zástupců isoprenoidů [5].

1.3.1 Syntéza isoprenoidů

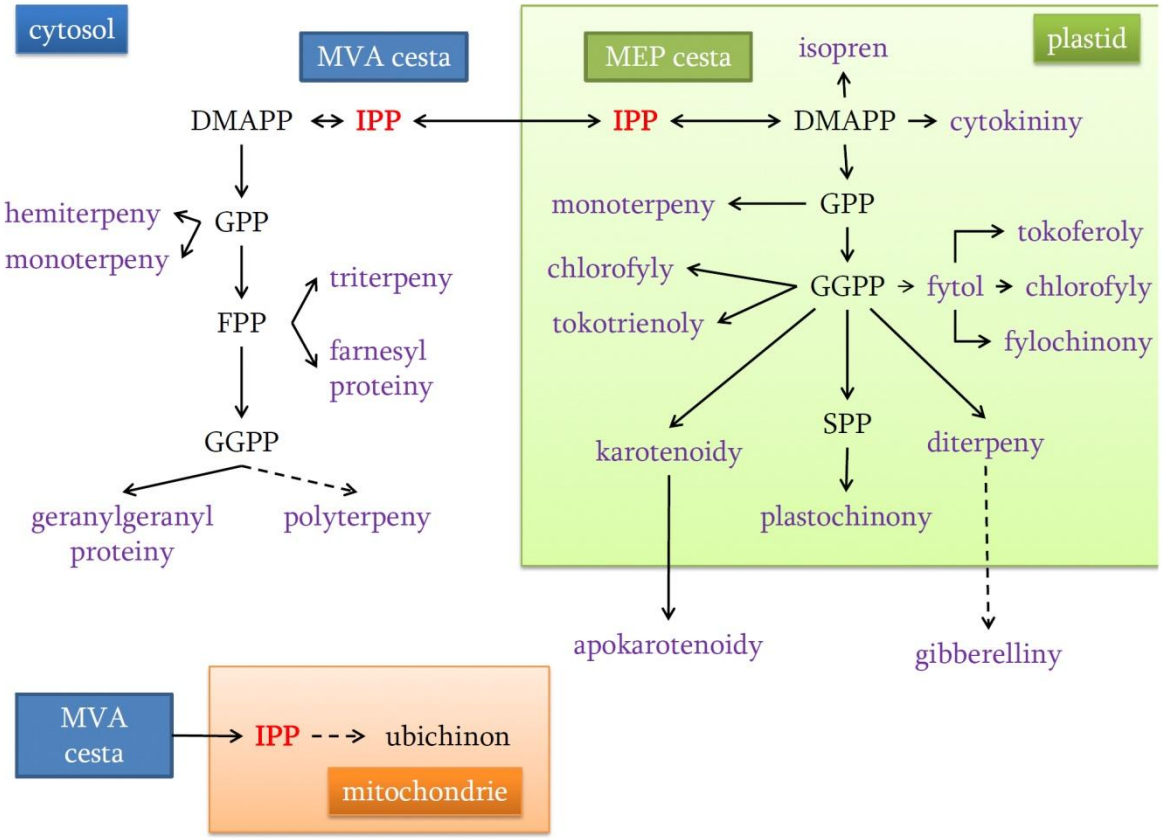
Prekurzorem pro syntézu isoprenoidů je isopentenyldifosfát. Jeho syntéza probíhá ve vyšších rostlinách a v některých skupinách řas dvěma cestami, z nichž jedna je lokalizována v cytosolu a druhá v plastidech [5].

Obě cesty jak plastidová (2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfátová, MEP), tak mevalonátová (MVA) cesta (obr. 1.16 na straně 29) produkují isopentenyldifosfát (IPP) a dimethylallyldifosfát (DMAPP) [35]. Prekurzorem isoprenoidní biosyntetické dráhy pro syntézu steroidů v cytosolu je acetyl-CoA. Na druhé straně pro plastidovou cestu syntézy jsou prekurzory pyruvát a glyceraldehyd-3-fosfát.



Obrázek 1.16: Porovnání cytosolové a plastidové cesty biosyntézy isoprenoidů (upraveno dle [36]). Mevalonátová (MVA) cesta v cytosolu je znázorněna vlevo, kde jsou uvedeny zkratky těchto enzymů: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reduktasa (HMGR); isopentenyldifosfát isomerasa (IDI). Vpravo je znázorněna plastidová (MEP) cesta, kde jsou uvedeny zkratky těchto klíčových enzymů: 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát synthasa (DXS); 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát reduktasa (DXR); hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-difosfát synthasa (HDS); isopentenyldifosfát/dimethylallyldifosfát synthasa (IDS); a isopentenyldifosfát isomerasa (IDI). Čárkované šipky indikují vícekrokové reakce.

Mevalonátová cytosolární (MVA) cesta je zodpovědná za syntézu sterolů, triterpenů, některých seskviterpenů a postranního řetězce ubichinonu. Plastidová (MEP) cesta zodpovídá za syntézu velké skupiny rostlinných isoprenoidů, jako jsou hemiterpeny, monoterpeny jako pinen a limonen, diterpeny (např. fytolové řetězce, gibereliny či kyselina abietová), stejně jako tetraterpeny (karotenoidy). Také postranní řetězce chlorofylu a plastochinonu jsou syntetizovány touto cestou (obr. 1.17 na straně 30) [5].



Obrázek 1.17: Přehled látek vznikajících z IPP a DMAPP rozdělených dle jejich kompartmentace v rostlinách (upraveno z [37]). Mevalonátová (MVA) cesta poskytuje IPP pro syntézu sterolů (např. sitosterol, stigmasterol, a cholesterol) a brassinolidů v cytosolu a ubichinonu-9 a -10 v mitochondrii. Plastidová (MEP) cesta směřuje k syntéze monoterpenů, gibberelinů, karotenoidů a plastochinonu-9. Přehled uvedených zkratek: dimethylallyldifosfát (DMAPP); 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát (DXP); farnesyldifosfát (FPP); geranylgeranyldifosfát (GGPP); geranyldifosfát (GPP); isopentenyldifosfát (IPP); mevalonát (MVA); solanesyldifosfát (SPP). Čárkované šipky indikují vícekrokové reakce [37, 38].

1.3.2 Vliv isoprenoidů na prenylaci proteinů v živočišném organismu

Isoprenoidy při nízké koncentraci inhibují biosyntézu HMG-CoA reduktasy, což má za následek omezení množství intermediátů pro prenylaci G-proteinů, což snižuje rychlost buněčné proliferace [39]. Na druhé straně při vyšší koncetraci isoprenoidy inhibují post-translační prenylaci proteinů (př. limonen, perillyl alkohol). Prenylace, katalyzovaná prenyl-protein transferasami, zahrnuje vazbu lipofilních farnesylových nebo geranylgeranylových skupin na cysteinový zbytek blízko koncové karboxyskupiny proteinů regulujících buněčný růst. Mezi takové proteiny se řadí tzv. malé G-proteiny

(př. Ras, RhoA a Rac 1). Prenylací dochází k modifikaci těchto proteinů, což ovlivní jejich vazebné schopnosti. Takto modifikovaný protein se pak může navázat do nesprávného místa. Bylo prokázáno, že isoprenoidy (např. monoterpeny limonen a perillylalkohol) selektivně inhibují isoprenylaci malých G proteinů o velikosti 21 - 26 kDa, a to kompetitivní inhibicí prenyl-protein transferas. Další možnost přístupu chemoterapie je tedy využití zacílení isoprenoidů na onkogenní formy Ras proteinů [39, 40].

1.4 Antioxidanty

Jako antioxidant byla definována jakákoli látka, které dokáže při nízké koncentraci v porovnání s oxidovatelným substrátem, významně pozdržet anebo inhibovat oxidaci tohoto substrátu. Fyziologická role antioxidantů tedy představuje snahu zabránit poškození buněčných komponent, které nastávají v důsledku chemických reakcí s volnými radikály [41, 42].

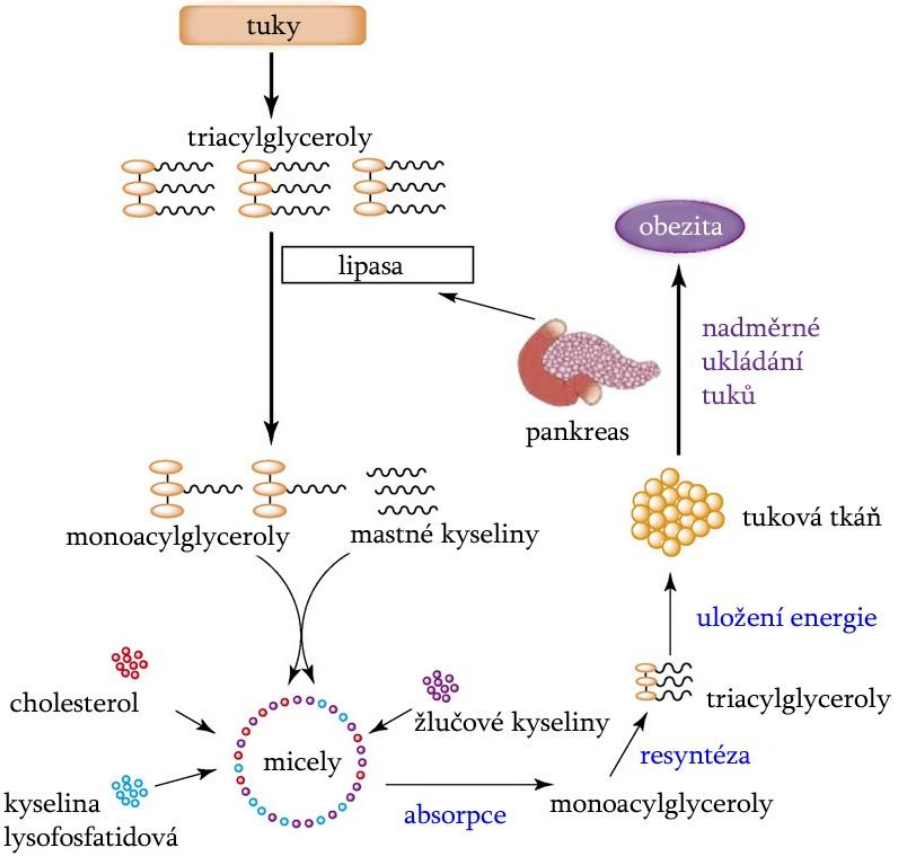
Volný radikál lze definovat jako jakoukoli molekulární strukturu, která obsahuje nepárový elektron v atomovém orbitalu a která je současně schopná nezávislé existence. Většina radikálů je vysoce reaktivních, neboť se mohou stát donorem elektronu anebo jeho akceptorem [41].

Mezi volné radikály patří sloučeniny obsahující kyslík (ROS) nebo dusík (RNS). ROS zahrnuje superoxidový ($O_2^{\cdot -}$), hydroxylový ($HO^{\cdot}$), peroxylový ($ROO^{\cdot}$), lipid peroxylový ($LOO^{\cdot}$) a alkoxylový ($RO^{\cdot}$) radikál. Na druhé straně RNS zahrnuje oxid dusnatý ($NO^{\cdot}$) a oxid dusičitý ($NO_2^{\cdot}$). Kyslíkaté a dusíkaté volné radikály mohou být snadno konvertovány na své ne-radikálové formy, které jsou ovšem taktéž nebezpečné zdraví. V případě peroxidu vodíku (H_2O_2), ozonu (O_3), singletového kyslíku ($^1O_2$), kyseliny chlorné ($HClO$), kyseliny dusité (HNO_2), peroxynitritu ($ONOO^-$), oxidu dusitého (N_2O_3), lipidového peroxidu ($LOOH$) se sice nejedná o volné radikály, ale obecně o oxidanty, které mohou snadno vést k volným radikálovým reakcím v živých organismech [42].

Enzymová a neenzymová antioxidační obrana zahrnuje superoxiddismutasu, glutathion peroxidasu, katalasu, kyselinu askorbovou (vitamin C), α-tokoferol (vitamin E), glutathion, β-karoten a vitamin A [42, 43]. Proteiny vážící ionty přechodných kovů (např. ionty železa a mědi) brání jejich interakci s peroxidem vodíku a superoxidem, které by produkovaly vysoce reaktivní hydroxylové radikály [41].

1.5 Vliv sekundárních metabolitů na aktivitu lipasy

Pankreatická lipasa (EC 3.1.1.3) má nejvýznamnější podíl na hydrolýze tuků v trávicím traktu. Hydrolyticky štěpí triacylglyceroly na 2-monoacylglyceroly a mastné kyseliny. Pankreatická lipasa je tvořena dvěma doménami, větší N-terminální doména je katalytická, menší C-terminální doména váže kolipasu, která je nutná pro její enzymovou aktivitu. V katalytickém centru se vyskutuje vedle serylového zbytku (Ser-152, lidská pankreatická lipasa) ještě histidylový a aspartylový zbytek (His-263, Asp-176), které tvoří podobnou trojici jako u serinových proteas [44, 45]. Obrázek 1.18 popisuje fyziologickou úlohu pankreatické lipasy.



Obrázek 1.18: Fyziologická role pankreatické lipasy v absorbci lipidů (upraveno dle [44])

Obezita patří mezi jeden z nejdůležitějších rizikových faktorů pro diabetes mellitus 2. typu. Z důvodu spojitosti mezi cirkulujícími volnými mastnými kyselinami a inzulinové rezistence, se lipolýza tukových tkáních stává centrem vědeckého zájmu [46].

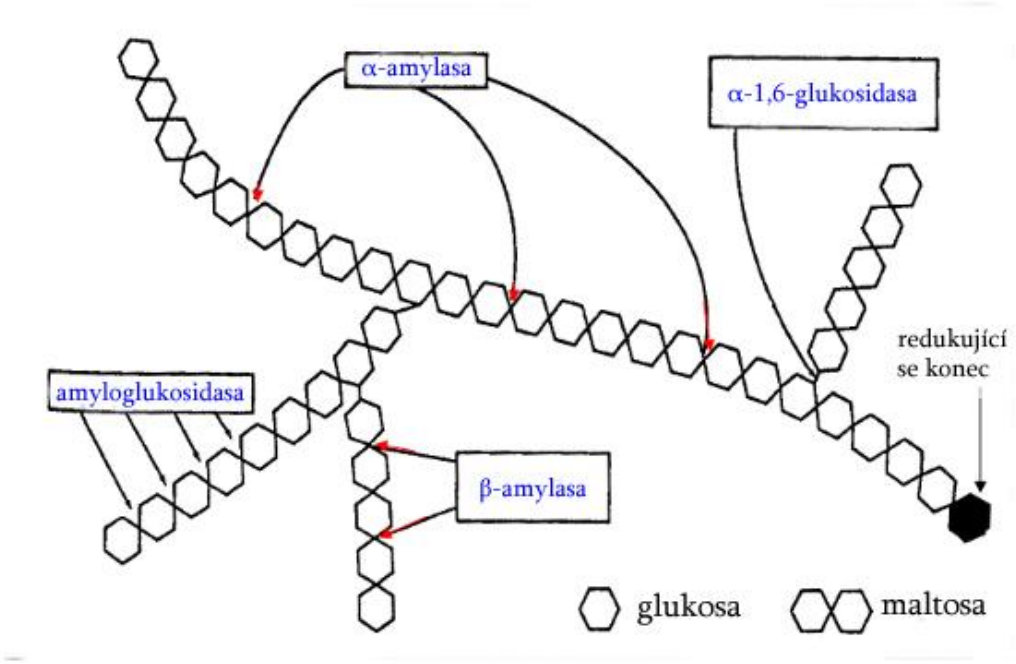
Aktivita pankreatické lipasy je inhibována některými sloučeninami, nejznámnější je její derivát ze *Streptomyces toxytricini* známý jako orlistat. Ten se váže kovalentě na OH-skupinu v aktivním centru a tím lipasu ireverzibilně inaktivuje. Tato sloučenina je vyráběna jako léčivo, ale má však řadu vedlejších účinků, a proto jsou tedy hledány jiné inhibitory s výhodnějšími vlastnostmi. [45, 47]

Bylo zjištěno, že extrakty z některých rostlin a přímo některé sloučeniny mají schopnost snížit aktivitu lipasy. Jedná se například o saponiny (esciny z jírovce maďalu, čajové saponiny z čajovníku čínského) a polyfenoly jako jsou flavonoidy. [47, 48]

1.6 Vliv sekundárních metabolitů na aktivitu α-amylasy

Za hydrolýzu polysacharidů přijatých v potravě, tedy škrobu a glykogenu, je zodpovědná α-amylasa (EC 3.2.1.1). α-Amylasa hydrolyticky štěpí α(1→4) vazby mezi glukosovými jednotkami a produktem jsou tedy limitní dextriny, maltotriosa, maltosa a isomaltosa. α-Amylasa je přítomná ve slinách a je součástí pankreatické šťávy. Další hydrolýzy se již účastní α-glukosidasy v tenkém stěvě. Druhý enzym α-glukosidasa neboli maltasa (EC 3.2.1.20) katalyzuje konečný krok v trávícím procesu sacharidů odbouráváním 1,4-α vazeb za tvorby glukosy (obr. 1.19 na straně 34). [49, 50].

Řada fenolických látek z rostlin se váže na α-amylasu i α-glukosidasu a snižují jejich aktivitu. Tento účinek může být prospěšný, neboť koncentrace glukosy v krvi po jídle (tzv. postprandiální) se může zvyšovat pozvolněji. Hledání inhibitorů α-amylasy má význam v souvislosti s léčbou diabetu, kde nízká hladina inzulinu znesnadňuje transport glukosy z krve do buněk. Bylo zjištěno, že kyselina listová, eskuletin, kvercetin a isorhamnetin přítomné v měsíčku lékařském inhibují aktivitu α-amylasy [50, 51].



Obrázek 1.19: Mechanismus aktivity pankreatické α-amylasy (upraveno dle [52]). Mezi další sacharidy hydrolyzující enzymy patří: amyloglukosidasa, která hydrolyzuje vazby α-D-(1→4) i α-D-(1→6); β-amylasa, která štěpí vazby α-D-(1→4) a odštěpují se maltosové jednotky; α-1,6-glukosidasa, která štěpí vazbu α-D-(1→6), jedná se o tzv. odvětvovací enzym.

2 Cíl práce

Mezi hlavní cíle předkládané bakalářské práce patří:

1. Shromáždit informace o syntéze a metabolismu sekundárních metabolitů rostlin.

2. Porovnat obsah fenolických látek, flavonoidů a antioxidační kapacitu vybraných extraktů z ovoce a zeleniny.

3. Zjistit vliv extraktů z ovoce a zeleniny na aktivitu pankreatické lipasy a α-amylasy.

3 Materiál a metody

Pokud v textu není uvedeno jinak, pak je výraz "voda" ekvivalentní výrazu "destilovaná voda" a "roztok" je ekvivalentní výrazu "vodný roztok".

3.1 Chemikálie a roztoky

V následujících seznamech jsou uvedeny všechny chemické látky a chemické přípravky, které byly během experimentů používány. Ve vhodných případech jsou připojeny i údaje o čistotě použité chemikálie, popř. další užitečné informace.

3.1.1 Rozpouštědla

destilovaná voda (100 %w, vyrobena na pracovišti)

ethanol 96% Ph. Eur. (96 %v, *Lach-Ner*, ČR)

methanol p. a. (100 %w, *Lach-Ner*, ČR)

3.1.2 Čisté látky

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát) diamonný (tablety 10 mg; *Sigma-Aldrich*, USA)

4-nitrofenylpalmitát (*Sigma-Aldrich*, USA)

α-amylasa z prasečího pankreatu (*Sigma-Aldrich*, USA)

aceton (*Lachema*, ČR)

azurový škrob (*Sigma-Aldrich*, USA)

Bradfordovo činidlo (*Sigma-Aldrich*, USA)

Brilliant Blue G (*Sigma-Aldrich*, USA)

BSA (>96%w, *Sigma-Aldrich*, USA)

činidlo fenolové Folin-Ciocâlteu (*Dr. Kulich Pharma*, ČR)

fenol p. a. (>99 %w; *Sigma-Aldrich*, USA)

hydroxid sodný čistý (*Lachema*, ČR)

chlorid hlinitý p. a. (>99 %w, bezvodý; *Sigma-Aldrich*, USA)

chlorid železitý, hexahydrát (*Lachema*, ČR)

cholát sodný, hydrát (*Sigma-Aldrich*, USA)

kvercetin, dihydrát (*Sigma-Aldrich*, USA)

kyselina L-askorbová (>99 %w, *Sigma-Aldrich*, USA)

kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová (97 %w, také trolox; *Sigma-Aldrich*, USA)

kyselina chlorovodíková p. a. (>35 %w; *Lach-Ner*, ČR)

kyselina octová (99,8 %w; *Lach-Ner*, ČR)

kyselina *o*-fosforečná (min 85 %w, *Lachema*, ČR)

kyselina trichloroctová (*Avondale laboratories*, Anglie)

lipasa z prasečího pankreatu (*Sigma-Aldrich*, USA)

peroxodisíran draselný p. a. (>99 %w; *Sigma-Aldrich*, USA)

2,4,6-tripyridyl-*s*-triazin (>98 %w; *Sigma-Aldrich*, USA)

tris(hydroxymethyl)-aminomethan, (>99%, *Fluka Biochemika*, ČR)

uhličitan sodný p. a. (99,8 %w, bezvodý; Lachema, ČR)

3.2 Přístrojové vybavení

analytické váhy XE series, 100 A (*Denver Instrument Company*, USA)

centrifuga UNIVERSAL 32R (*Hettlich Zentrifugen*, SRN)

laboratorní váhy Kern 440-45 (*Kern*, SRN)

lyofilizátor Lyovac GT2E (*Finn-Aqua*, Finsko)

odšťavňovač ESF 103 (*AEG*, SRN)

pH metr UltraBasic UB-10 (*Denver Instrument*, USA)

spektrofotometr Helios α (*ThermoSpectronic*, Anglie)

spektrofotometr Ultrospec 2100 pro UV/VIS (*Biochrom*, Anglie)

sušárna HS 62A (*ZPA Dukla Prešov*, ČSSR)

thermostat EL-02 (*Major Science*, USA)

vortex V1-plus (*BioSan*, Litva)

3.3 Rostlinný materiál

V následující tabulce 3 je seznam druhů ovoce (popř. zeleniny), které byly použity v této bakalářské práci. Je zde uvedena zpracovaná část rostliny i její původ s dobou pořízení.

Tabulka 3: Seznam použitých rostlin.

český název (*latinský název* [53])	část rostliny; stav	původ (doba pořízení)
avokádo (*Persea americana* P. Mill.)	plod; čerstvý	obchod (11/2013)
broskvoň obecná (*Prunus persica* L. Batsch)	plod; čerstvý	obchod (07/2013)
citron (*Citrus limon* L. Burm.f.)	plod; čerstvý	obchod (11/2013)
cuketa (*Cucurbita pepo 'Goldena'*)	plod; čerstvý	obchod (11/2013)
grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad.)	plod; čerstvý	obchod (11/2013)
jahodník obecný (*Fragaria vesca* L.)	plod; čerstvý	obchod (07/2013)
josta (*Ribes nigrum* L.)	plod; čerstvý	soukromý (07/2013)
kaki (*Diospyros kaki* L. f.)	plod; čerstvý	obchod (11/2013)
kiwi [*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) Liang & Ferguson]	plod; čerstvý	obchod (11/2013)
lilek rajče (Solanum lycopersicum L.)	plod; čerstvý	obchod (11/2013)
limetka (*Citrus limetta* Risso)	plod; čerstvý	obchod (11/2013)
mandarinka obecná (*Citrus reticulata* Blanco)	plod; čerstvý	obchod (11/2013)
máslová dýně (*Cucurbita pepo* L.)	plod; čerstvý	obchod (11/2013)
meruňka obecná (*Prunus armeniaca* L.)	plod; čerstvý	obchod (07/2013)
nashi [*Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai]	plod; čerstvý	obchod (11/2013)
ostružiník maliník (*Rubus idaeus* L.)	plod; čerstvý	obchod (07/2013)
petržel obecná [*Petroselinum crispum* (Mill.) Hill]	kořen; čerstvý	obchod (11/2013)
pomelo [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.]	plod; čerstvý	obchod (11/2013)
pomeranč (*Citrus sinensis* L. Osbeck)	plod; čerstvý	obchod (11/2013)
rybíz bílý (*Ribes rubrum* L.)	plod; čerstvý	soukromý (07/2013)
rybíz červený (*Ribes rubrum* L.)	plod; čerstvý	soukromý (07/2013)
višeň obecná (*Prunus ceracus* L.)	plod; čerstvý	soukromý (07/2013)

3.4 Experimentální metody

Všechny experimenty byly prováděny, pokud v textu není uvedeno jinak, při laboratorní teplotě (cca 22 °C).

3.4.1 Extrakce šťáv

K získání extraktu (rostlinné šťávy) bylo použito odšťavňovací zařízení. Zvážený rostlinný materiál byl nadrobno nakrájen a následně odšťavněn. Získaná šťáva byla filtrována od větších rostlinných zbytků přes dvě vrstvy gázy a byl změřen její objem. Filtrát byl poté centrifugován po dobu 10 min při zrychlení 9400g a teplotě 4 °C.

Připravené extrakty (šťávy) byly skladovány pro další použití v mikrozkumavkách a v uzavřených lahvičkách v mrazničce při teplotě - 28 °C nebo nižší.

3.4.2 Stanovení obsahu vody lyofilizací rostlinného materiálu

Metoda byla upravena dle [54, 55]. Do předem zvážené lyofilizační láhve bylo naváženo přesně přibližně 100,0 g rostlinného materiálu. Vzorek byl poté lyofilizován po dobu 48 hod při teplotě -55°C do úplného vysušení.

K výpočtu množství vody v rostlinném materiálu byla použita rovnice 3.1,

$$w_{H_2O} = \left[1 - \frac{m(f)}{m(i)}\right] 100\% \qquad (3.1),$$

kde w_{H_2O} ... hmotnostní procento vody v rostlinném materiálu; [w_{H_2O}] = %w; m ... hmotnost rostlinného materiálu; [m] = g; i ... před lyofilizací; f ... po lyofilizaci.

3.4.3 Stanovení zbytku po vysušení extraktu

Zbytek po vysušení extraktu byl stanoven upravenou metodou dle [55]. Do předem zvážené Petriho misky bylo rychle naváženo přesně asi 3,0 g extraktu. Poté byl vzorek umístěn do sušárny o teplotě (80 ± 5) °C po dobu 3 hod do úplného odpaření těkavých látek, především vody. Petriho miska byla následně zvážena.

K výpočtu obsahu netěkavých látek v extraktu byla použita rovnice 3.2,

$$w_{NL} = \frac{m(f)}{m(i)} 100\% \qquad (3.2),$$

kde w_{NL} ... hmotnostní zlomek netěkavých látek v extraktu [w_{NL}] = %w; m ... hmotnost extraktu; [m] = g; i ... počátek odpařování; f ... konec odpařování.

3.4.4 Stanovení obsahu fenolických látek

Obsah fenolických látek byl stanoven dle [55, 56]. Do zkumavky bylo pipetováno 200 µl vzorku – rostlinného vzorku předem vhodně zředěného destilovanou vodou – a 1000 µl 10%v fenolového činidla (Folinova činidla) a po dvou minutách 800 µl 75g.l^{-1} roztoku uhličitanu sodného (Na_2CO_3), načež byla reakční směs promíchána.

Po 28 min inkubace byla absorbance této směsi změřena na spektrofotometru při vlnové délce 760 nm a tloušťce kyvety 10,0 mm proti roztoku slepého vzorku, v němž byl zředěný rostlinný extrakt nahrazen destilovanou vodou.

Kalibrace metody byla provedena nahrazením ředěného rostlinného extraktu roztokem fenolu, a to v koncentračním rozsahu 200 - 850 µmol.l^{-1}. Poté byla provedena lineární regresní analýza experimentálně získaných dat, na jejímž základě byla vytvořena kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 760 nm na molární koncentraci fenolu neboli koncentraci molekvivalentů fenolu v ředěném roztoku; z této závislosti byla odvozena rovnice 3.3,

$$c_{PL}^{ex} = f_{dil} \frac{A_{760} - k_2}{k_1} \qquad (3.3),$$

kde c_{PL}^{ex} … molární koncentrace fenolu, resp. molekvivalentů fenolu, v extraktu, [c_{PL}^{ex}] = molEF.l^{-1}; A_{760} … absorbance při vlnové délce 760 nm; f_{dil} … faktor ředění extraktu; k_1, k_2 … regresní konstanty, k_1 = (1043 ± 1) l.molEF^{-1}, k_2 = (0,1383 ± 0,0001).

3.4.5 Stanovení obsahu flavonoidů

Stanovení obsahu flavonoidů bylo upraveno dle [57, 58]. Do zkumavky byl pipetován 1 ml rostlinného extraktu předem vhodně zředěného vodou; 0,50 ml 1,2%w roztoku chloridu hlinitého ($AlCl_3$) a 0,50 ml 120mM roztoku octanu draselného ($CH_3COO^-K^+$). Směs byla na závěr promíchána.

Pomocí spektrofotometru byla změřena absorbance této směsi při vlnové délce 415 nm a tloušťce kyvety 10,0 mm proti roztoku slepého vzorku, v němž byl roztok chloridu hlinitého nahrazen destilovanou vodou.

Kalibrace metody byla provedena nahrazením ředěného rostlinného extraktu 50%v ethanolovým roztokem kvercetinu, a to v koncentračním rozsahu 25 - 125 μmol.l^{-1}. Pro tento účel byla provedena lineární regresní analýza experimentálně získaných hodnot, na jejímž základě byla sestavena kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 415 nm na molární koncentraci kvercetinu neboli koncentraci molekvivalentů kvercetinu v neředěném vzorku; z této závislosti odvozením plyne rovnice 3.4,

$$c_{FL}^{ex} = f_{dil}\,\frac{A_{415}-k_2}{k_1} \qquad (3.4),$$

kde c_{FL}^{ex} … molární koncentrace kvercetinu, resp. molekvivalentů kvercetinu, v extraktu, [c_{FL}^{ex}] = molEK.l^{-1}; A_{415} … absorbance při vlnové délce 415 nm; f_{dil} … faktor ředění extraktu; k_1, k_2 … regresní konstanty, k_1 = (7600 ± 0) l.molEK^{-1}, k_2 = -(0,021 ± 0,009).

3.4.6 Stanovení antioxidačních vlastností metodou ABTS

Antioxidační vlastnosti byly stanoveny metodou ABTS dle [55, 59]. Roztok činidla byl připraven následovně: Tableta obsahující 10,0 mg amonné soli ABTS a nejvýše 2,46 mg peroxodisíranu draselného ($K_2S_2O_8$) byly rozpuštěny v 3000 μl destilované vody a po minimálně 16 hodinové inkubaci v temnu byl roztok zředěn destilovanou vodou cca 55krát (přibližně na absorbanci 1,30 při vlnové délce 734 nm).

Do zkumavky bylo pipetováno 200 μl rostlinného extraktu vhodně zředěného destilovanou vodou a 1000 μl cca 110μLmol.l^{-1} roztoku kationradikálu ABTS. Dále bylo do referentní zkumavky místo zředěného rostlinného extraktu pipetováno 200 μl destilované vody. Roztok byl vždy na závěr promíchán.

Hodnota absorbance referentního roztoku byla následně odečtena od absorbance měrného roztoku a tímto byla získána hodnota úbytku absorbance za daný časový úsek.

Metoda byla kalibrována nahrazením ředěného rostlinného extraktu 50%v ethanolovým roztokem troloxu v koncentračním rozsahu 20 - 250 μmol.l^{-1}. Z výstupu regresní analýzy experimentálně získaných bodů byla získána kalibrační závislost záporného úbytku absorbance při vlnové délce 734 nm na molární koncentraci troloxu / koncentraci

molekvivalentů troloxu ve zředěném roztoku; z nalezené závislosti pak vychází rovnice 3.5,

$$c_{ET}^{ex} = -f_{dil}\,\frac{\Delta A_{734} - k_2}{k_1} \quad (3.5),$$

kde c_{ET}^{ex} … molární koncentrace troloxu, resp. molekvivalentů troloxu, v extraktu, $[c_{ET}^{ex}]$ = molET.L^{-1}; ΔA_{734} … úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm; f_{dil} … faktor ředění extraktu; k_1, k_2 … regresní konstanty, k_1 = (4500 ± 100) L.molET^{-1}, k_2 = -(0,0126 ± 0,0118).

3.4.7 Stanovení antioxidačních vlastností metodou FRAP

Antioxidační vlastnosti byly stanoveny metodou FRAP dle [55, 56]. Do zkumavky bylo pipetováno 200 µl rostlinného extraktu vhodně zředěného destilovanou vodou a 1000 µl FRAP činidla skládajícího se z 25%v cca 700µmol.l^{-1} roztoku TPTZ ve 40mmol.l^{-1} kyselině chlorovodíkové (HCl), 10%v 20mmol.l^{-1} roztoku chloridu železitého ($FeCl_3$) a z 65%v 300mmol.l^{-1} octanového pufru o pH 3,6. Směs byla po přídavku činidla promíchána na magnetické míchačce.

Po 10 minutách inkubace připravené reakční směsi byla na spektrofotometru změřena její absorbance při vlnové délce 593 nm a tloušťce kyvety 10,0 mm proti roztoku slepého vzorku, v němž byl ředěný rostlinný extrakt nahrazen destilovanou vodou.

Kalibrace metody byla provedena nahrazením ředěného rostlinného extraktu roztokem kyseliny askorbové, a to v koncentračním rozsahu 25 - 125 µmol.l^{-1}. Podle výsledků regresní analýzy experimentálně získaných dat byla sestavena kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 593 nm na molární koncentraci askorbátu neboli koncentraci molekvivalentů askorbátu v neředěném vzorku, pomocí níž byla vytvořena rovnice 3.6,

$$c_{EA}^{ex} = f_{dil}\,\frac{A_{593} - k_2}{k_1} \quad (3.6),$$

kde c_{EA}^{ex} … molární koncentrace askorbátu, resp. molekvivalentů askorbátu, v extraktu, $[c_{EA}^{ex}]$ = molEA.l^{-1}; A_{593} … absorbance při vlnové délce 593 nm; f_{dil} … faktor ředění extraktu; k_1, k_2 … regresní konstanty, k_1 = (5200 ± 910) l.molEA^{-1}, k_2 = (0,14 ± 0,01).

3.4.8 Stanovení vlivu rostlinného extraktu na aktivitu lipasy

Vliv rostlinného extraktu na aktivitu lipasy byl stanoven dle [60, 61]. Z důvodu srážení acetonového roztoku *p*-nitrofenylpalmitátu (*p*-NPP) v reakční směsi, byla vždy před použitím centrifugována při 4 °C, 16600*g* po dobu 5 min. Reakční směs se skládala z 500 µl 100 mmol.l^{-1} Tris-HCl o pH 8,0; 20 µl 20 mmol.l^{-1} *p*-NPP, 30 µl 10%w cholátu sodného a 120 µl vhodně zředěného rostlinného extraktu. Reakce byla spuštěna přídavkem 50 µl 20 mg.ml^{-1} roztokem lipasy v 100 mmol.l^{-1} Tris-HCl o pH 8,0. V tomto okamžiku byla měřena absorbance při 400 nm v závislosti na čase po dobu 15 min v kyvetě o tloušťce 10,0 mm při laboratorní teplotě. V kontrolním vzorku bylo 120 µl ředěného rostlinného extraktu nahrazeno stejným množstvím destilované vody. Všechny extrakty byly ředěny ve stejném poměru.

Specifická aktivita lipasy (a_{sp}) byla stanovena dle rovnice 3.7. Molární absorpční koeficient *p*-nitrofenolu (*p*-NP) při 400 nm byl určen na hodnotu (15 460 ± 470) mol.l^{-1}cm^{-1} (s_r = 1,4 %).

$$a_{sp} = \frac{\Delta A_{400}}{\varepsilon_{400}^{p\text{-NP}} \cdot l} \cdot \frac{1}{\Delta t} \cdot \frac{V_{RS}}{V_E} \cdot \frac{1}{c_P} \qquad (3.7)$$

a_{sp} … specifická aktivita enzymu, [a_{sp}] = U.g^{-1}; ΔA_{400} … změna absorbance při 400 nm, [ΔA_{400}] = 0; $\varepsilon_{400}^{p\text{-NP}}$ … molární absorpční koeficient *p*-NP, [$\varepsilon_{400}^{p\text{-NP}}$] = mol.l^{-1}cm^{-1}; l … optická dráha, [l] = cm; Δt … čas reakce, [Δt] = min; V_{RS} … objem reakční směsi, [V_{RS}] = ml; V_E … objem enzymu, [V_E] = ml; c_P … hmotnostní koncentrace proteinů v roztoku enzymu, [c_P] = g.l^{-1}.

3.4.9 Stanovení vlivu rostlinného extraktu na aktivitu α-amylasy

Vliv rostlinného extraktu na aktivitu α-amylasy byl stanoven dle [62,63]. Do mikrozkumavky bylo pipetováno 200 µl 1% (w/v) azurového škrobu, který byl před použitím vařen cca 5 min, 200 µl 100 mmol.l^{-1} Tris-HCl pufru o pH 8,0; 100 µl vhodně zředěného rostlinného extraktu. Směs byla předehřáta na 37 °C a reakce byla spuštěna přidáním 100 µl 40 µg.ml^{-1} roztoku α-amylasy. Reakce probíhala 10 minut při 37 °C a poté byla zastavena přídavkem 600 µl 20%v kyseliny trichloroctové (CCl_3COOH). Poté byl roztok centrifugován 5 min při 16600*g* při 4°C. Na spektrofotometru byla změřena absorbance supernatantu při vlnové délce 590 nm a tloušťce kyvety 10,0 mm proti roztoku

slepého vzorku, který obsahoval kyselinu trichlorooctovou před přidáním α-amylasy. V kontrolním vzorku bylo 100 µl ředěného rostlinného extraktu nahrazeno stejným množstvím destilované vody. Všechny extrakty byly ředěny ve stejném poměru.

Aktivita α-amylasy byla přepočítána podle soupravy pro stanovení α-amylasy *Lachema*, ČR.

3.4.10 Stanovení množství proteinů dle Bradforda

Množství proteinů bylo stanoveno metodou dle Bradforda [64]. Do zkumavky bylo pipetováno 100 µl vhodně zředěného roztoku enzymu a následně přidáno 1000 µl Bradfordova činidla. Směs byla řádně promíchána. Po 5 min inkubace za laboratorní teploty byla na spektrofotometru změřena absorbance při 595 nm v kyvetě o tloušťce 10,0 mm oproti roztoku slepého vzorku, kde byl roztok enzymu nahrazen stejným množstvím destilované vody.

Kalibrace metody byla provedena nahrazením ředěného roztoku enzymu roztokem BSA, a to v koncentračním rozsahu 35 - 290 µg.ml^{-1}. Podle výsledků regresní analýzy experimentálně získaných dat byla sestavena kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 595 nm na hmotnostní koncentraci BSA, pomocí níž byla vytvořena rovnice 3.8,

$$c_{\mathrm{BSA}} = f_{dil}\,\frac{A_{595}-k_2}{k_1} \quad (3.8),$$

kde c_{BSA} … hmotnostní koncentrace BSA, [c_{BSA}] = g.l^{-1}; A_{595} … absorbance při vlnové délce 595 nm; f_{dil} … faktor ředění roztoku enzymu; k_1, k_2 … regresní konstanty, k_1 = (3,6 ± 0,5) l.gBSA^{-1}, k_2 = (0,13 ± 0,02).

3.4.11 Výpočet obsahu fenolických látek, flavonoidů a antioxidační kapacity

Uměle vytvořená veličina "molární zastoupení" *z* mající význam molu ekvivalentů (nebo také "molekvivalentu") dané standardní látky X v hmotnostní jednotce rostlinné sušiny, přednostně pak [z] = molEX.kg^{-1}, byla použita k jednotnému vyhodnocení metod stanovení v odstavcích 3.4.4 až 3.4.7 na straně 40 až 42 (dle [55]).

Pro výpočet molárního zastoupení byla vytvořena obecná rovnice 3.8 na straně 45.

$$z = \frac{c_{EX}^{ex} V}{(1 - w_{H_2O}) m} \qquad (3.8),$$

kde z ... zastoupení molekvivalentů daného kalibračního standardu v sušině; c_{EX}^{ex} ... koncentrace molekvivalentů standardu v extraktu, $[c_{EX}^{ex}]$ = molEX.l^{-1}; V ... objem šťávy, $[V]$ = ml; w_{H_2O} ... hmotnostní zlomek vody v rostlinném materiálu, $[w_{H_2O}]$ = 0; m ... hmotnost čerstvého ovoce (resp. zeleniny), $[m]$ = g.

Pro konkrétní metody se jednalo o molární zastoupení fenolických látek z_{PL} vztažených na fenol (odstavec 3.4.4 na straně 40), molární zastoupení flavonoidů z_{FL} vztažených na kvercetin (odstavec 3.4.5 na straně 40), zastoupení molekvivalentů troloxu z_{ABTS} (odstavec 3.4.6 na straně 41) a zastoupení molekvivalentů kyseliny askorbové/askorbátu z_{FRAP} (odstavec 3.4.7 na straně 42).

3.5 Statistické vyhodnocení a regresní analýza

Veškerá stanovení (kromě lyofilizace) byla provedena třikrát.

Použité statistické metody byly prevzaty z literatury [65]. Ze získaných souboru *n* hodnot byly nejprve podle Deanova-Dixonova testu vyloučeny odlehlé hodnoty, a to tak, že bylo pro minimální a maximální hodnotu souboru vypočteno kritérium Q_{min}
a Q_{max} (vztahy 3.9, 3.10 a 3.11 na straně 46) a toto následně bylo porovnáno s kritickou hodnotou kritéria Q_k (v tabulce 4), tj. pokud { Q_{min}; Q_{max} } > Q_k, byla daná krajní hodnota vyloučena.

Tabulka 4: Hodnoty tabelovaných koeficientu pro statistické hodnocení výsledku na hladině významnosti 0,05 (α = 0,05) [65].

n	k_n	K_n	Q_k
2	0,886	6,40	/
3	0,591	1,30	0,941
4	0,486	0,72	0,765

$$Q_{min} = \frac{x_{min+1} - x_{min}}{R} \qquad (3.9)$$

$$Q_{max} = \frac{x_{max} - x_{max-1}}{R} \qquad (3.10)$$

$$R = x_{max} - x_{min} \qquad (3.11)$$

Q ... kritérium; *x* ... hodnota dané veličiny; *R* ... rozpětí; min ... nejnižší (hodnota); (min + 1) ... druhá nejnižší; max ... nejvyšší; (max - 1) ... druhá nejvyšší.

Interval spolehlivosti byl vypočten podle vztahu 3.12,

$$L_{1,2} = K_n R \qquad (3.12),$$

kde $L_{1,2}$ ... interval spolehlivosti; K_n ... tabelovaný koeficient (tab. 4); *R* ... rozpětí.

Relativní směrodatná odchylka byla vypočtena podle vztahu 3.13,

$$s_r = \frac{k_n R}{\tilde{x}} 100\% \qquad (3.13),$$

kde s_r ... relativní směrodatná odchylka; k_n ... tabelovaný koeficient (tab. 4); *R* ... rozpětí; $\tilde{x}$ ... medián.

Výsledky jsou uváděny ve tvaru **medián ± interval** a eventuálně **odchylka**, tj. $\tilde{x} \pm L_{1,2}$ (s_r = y %); v grafech pak obousměrné chybové úsečky značí právě interval spolehlivosti.

K vyhodnocení experimentálních závislostí byl použit program *MS Excel*.

4 Výsledky

Všech 22 druhů ovoce (popř. zeleniny) bylo odšťavněno a tím byl získán stejný počet rostlinných extraktů, jež vytvářejí výchozí soubor pro všechna následující stanovení.

4.1 Gravimetrické stanovení

Gravimetrické stanovení bylo provedeno za účelem standardizace výsledků. Množství netěkavých látek v rostlinném extraktu bylo stanoveno odpařením vody v sušárně, čerstvé ovoce (resp. zelenina) bylo lyofilizováno. Výsledky stanovení obsahu vody lyofilizací rostlinného materiálu (odstavec 3.4.2 na straně 39) a stanovení zbytku po vysušení extraktu (odstavec 3.4.3 na straně 39) jsou uvedeny v tabulce 5.

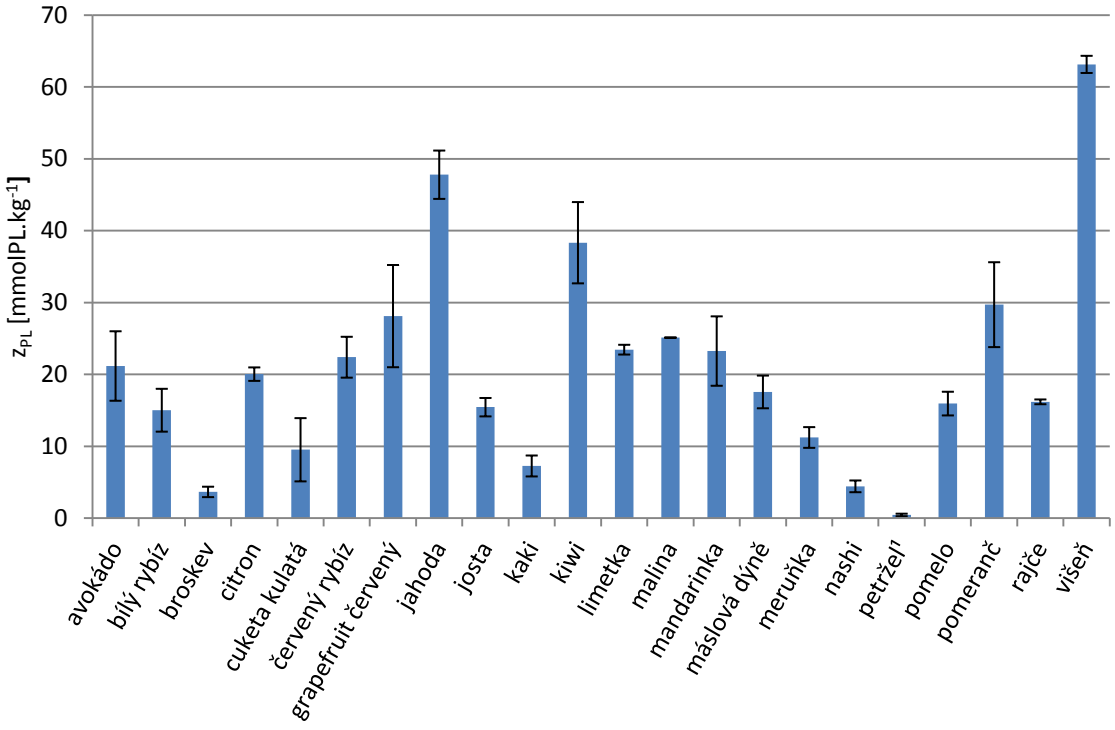
Tabulka 5: Gravimetrické stanovení čerstvého ovoce a daného extraktu

název	w_{H_2O}[%w]	w_{NL} [%w]	$s_{r,\,NL}$
avokádo	73%	2 ± 0	0%
bílý rybíz	83%	11 ± 0	0%
broskev	82%	5 ± 0	0%
citron	85%	7 ± 0	0%
cuketa kulatá	93%	3 ± 0	0%
červený rybíz	82%	11 ± 0	0%
grapefruit červený	84%	9 ± 0	0%
jahoda	89%	4 ± 0	0%
josta	63%	8 ± 1	7%
kaki	82%	7 ± 1	8%
kiwi	86%	5 ± 1	12%
limetka	77%	7 ± 0	0%
malina	86%	4 ± 0	0%
mandarinka	81%	11 ± 0	0%
máslová dýně	92%	3 ± 0	0%
meruňka	84%	5 ± 0	0%
nashi	86%	10 ± 0	0%
petržel	67%	9 ± 3	13%
pomelo	83%	4 ± 0	0%
pomeranč	85%	10 ± 1	6%
rajče	94%	4 ± 0	0%
višeň	86%	12 ± 0	0%

w_{H_2O} … hmotnostní procento vody v čerstvém ovoci (popř. zelenině); $[w_{H_2O}]$ = %w; w_{NL} ... hmotnostní zlomek netěkavých látek v extraktu $[w_{NL}]$ = %w; $s_{r,\,NL}$ … relativní odchylka pro w_{NL}; $[s_{r,\,NL}]$ = %.

4.2 Obsah fenolických látek

V získaných rostlinných extraktech bylo stanoveno celkové množství fenolických látek dle metody uvedené v odstavci 3.4.4 na straně 40. Obsah fenolických látek je vyjádřen jako molární zastoupení ekvivalentu fenolu v sušině výchozího materiálu. Výsledky tohoto stanovení pro jednotlivé rostlinné extrakty jsou uvedeny na obrázku 4.1.

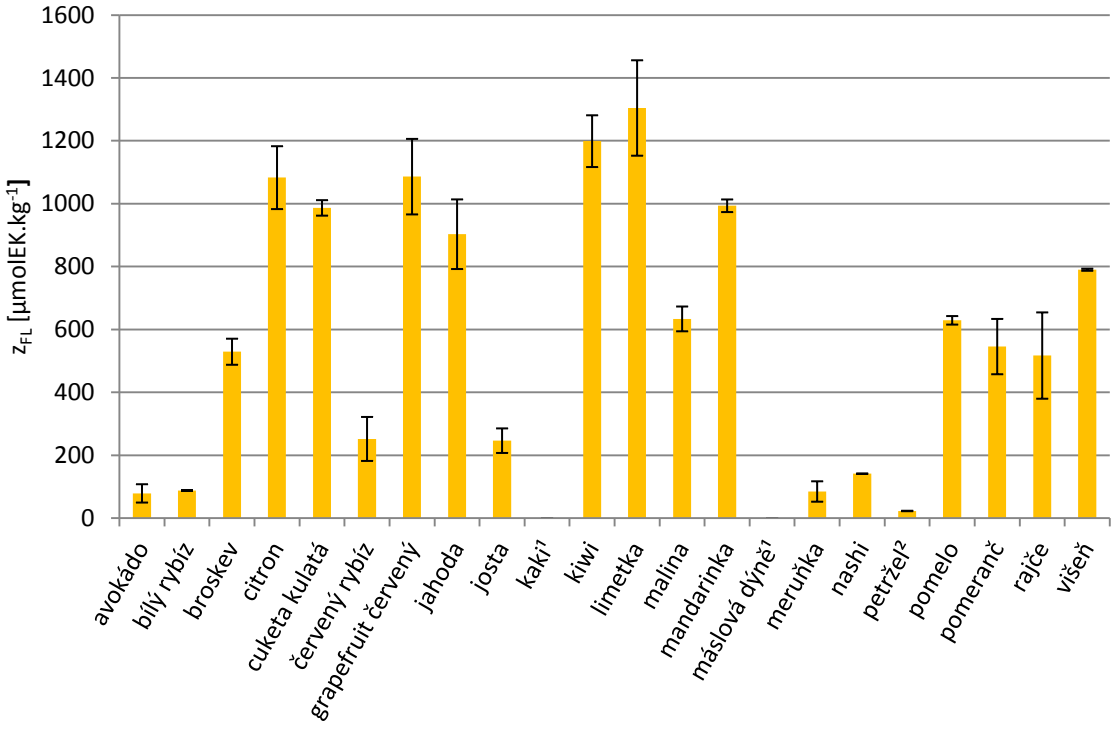


Obrázek 4.1: Stanovení obsahu fenolických látek – molární zastoupení ekvivalentu fenolu v sušině výchozího materiálu. $^{1}z_{PL}$(petržel) = 0,4 mmolPL.kg^{-1}

Obsah fenolických látek se nachází v intervalu 0,4 – 63 mmolPL.kg^{-1}. Největší obsah fenolických látek byl stanoven v extraktu z višně, jahody a kiwi. Naopak nejméně fenolických látek bylo zjištěno v extraktech z petržele, broskve a nashi.

4.3 Obsah flavonoidů

V získaných rostlinných extraktech bylo stanoveno celkové množství flavonoidů dle metody uvedené v odstavci 3.4.5 na straně 40. Obsah flavonoidů je uveden jako molárního zastoupení ekvivalentu kvercetinu v sušině rostlinného materiálu. Výsledky tohoto stanovení pro jednotlivé rostlinné extrakty jsou uvedeny v obrázku 4.2.

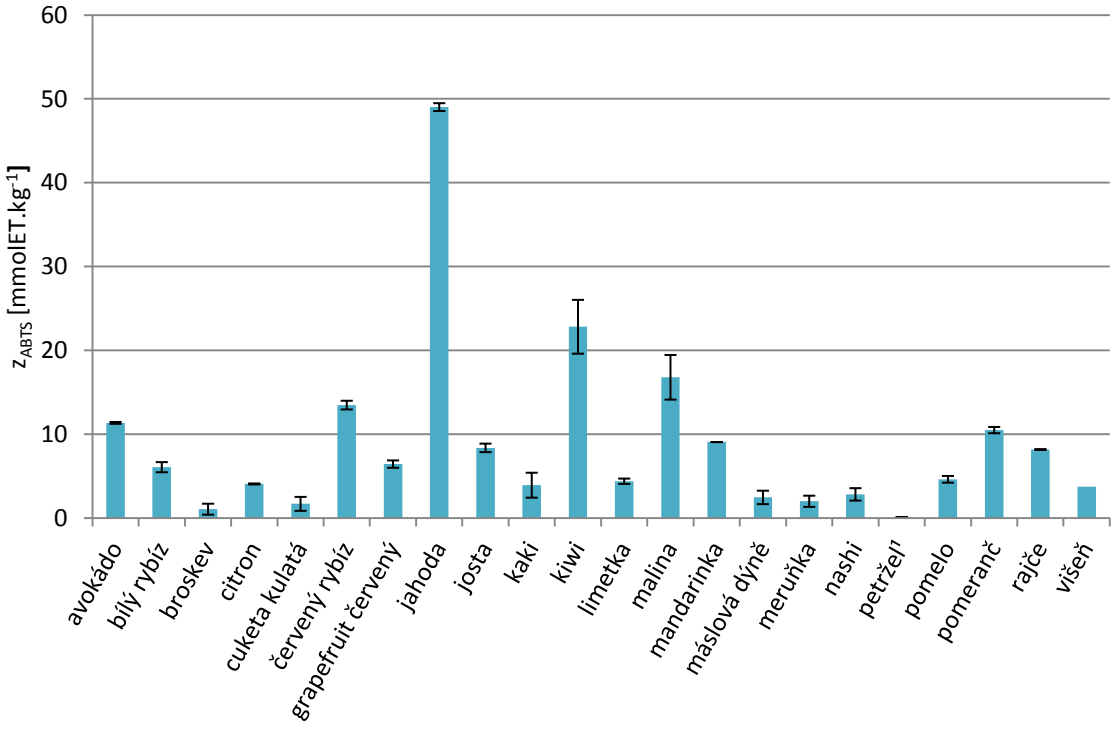


Obrázek 4.2: Stanovení obsahu flavonoidů – molární zastoupení ekvivalentu kvercetinu v sušině výchozího materiálu. ¹V extraktu nebyla detekována přítomnost flavonoidů. ² z_{FL}(petržel) = 23 µmolEK.kg^{-1}

Obsah flavonoidů se nachází v intervalu 23 - 1300 µmolEK.kg^{-1}. Nejvyšší obsah flavonoidů byl stanoven v extraktech z limetky, kiwi a grapefruitu červeného. Nejmenší obsah flavonoidů byl zjištěn v extraktech z petržele, avokáda a meruňky.

4.4 Antioxidační vlastnosti

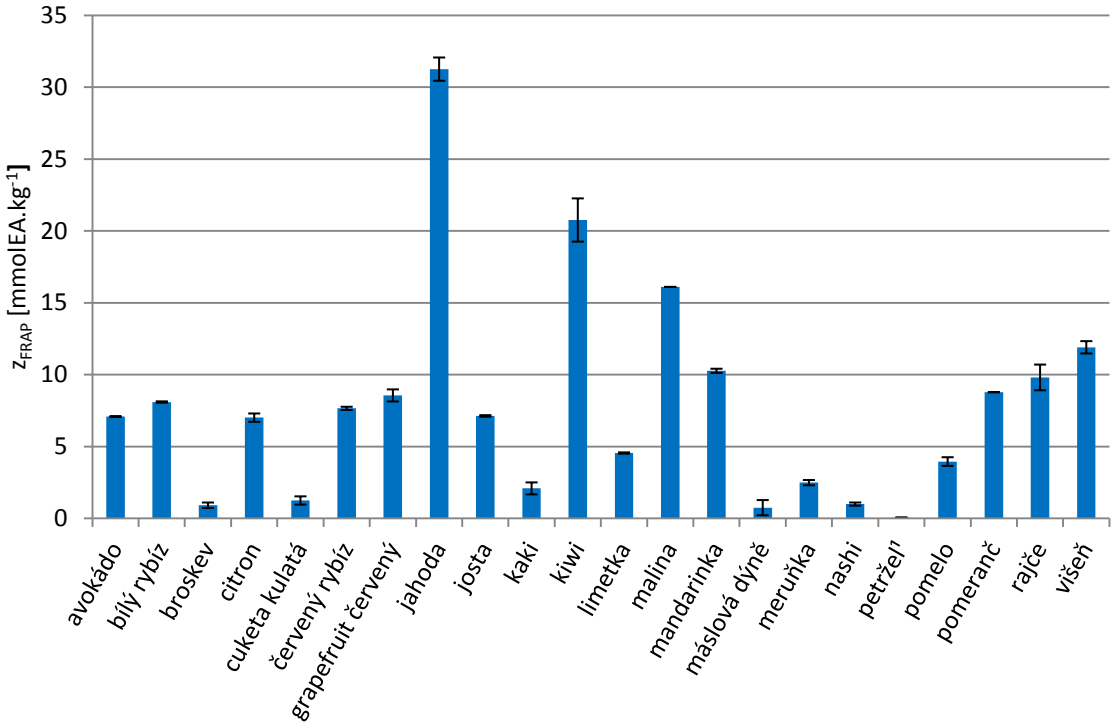
V získanných rostlinných extraktech byly sledovány antioxidační vlastnosti dle metody ABTS uvedené v odstavci 3.4.6 na straně 41. Obsah antioxidačních látek je vyjádřen jako molární zastoupení ekvivalentu troloxu v sušině výchozího materiálu. Výsledky tohoto stanovení pro jednotlivé rostlinné extrakty jsou uvedeny v obrázku 4.3.



Obrázek 4.3: Stanovení antioxidačních vlastností metodou ABTS – molární zastoupení ekvivalentu troloxu v sušině. [1]z_{ABTS}(petržel) = 0,1 mmolET.kg^{-1}

Antioxidační kapacita stanovená metodou ABTS se nachází v intervalu 0,1 - 49,0 mmolET.kg^{-1}. Nejvyšší antioxidační kapacita byla stanovena v extraktech z jahody, kiwi a maliny. Nejmenší antioxidační kapacita byla zjištěna v extraktech z petržele, broskve a cukety kulaté.

V získaných rostlinných extraktech byly dále sledovány antioxidační vlastnosti dle metody FRAP uvedené v odstavci 3.4.7 na straně 42. Obsah antioxidačních látek je vyčíslen jako molární zastoupení ekvivalentu askorbátu v sušině výchozího materiálu. Výsledky tohoto stanovení pro jednotlivé rostlinné extrakty jsou uvedeny v obrázku 4.4.

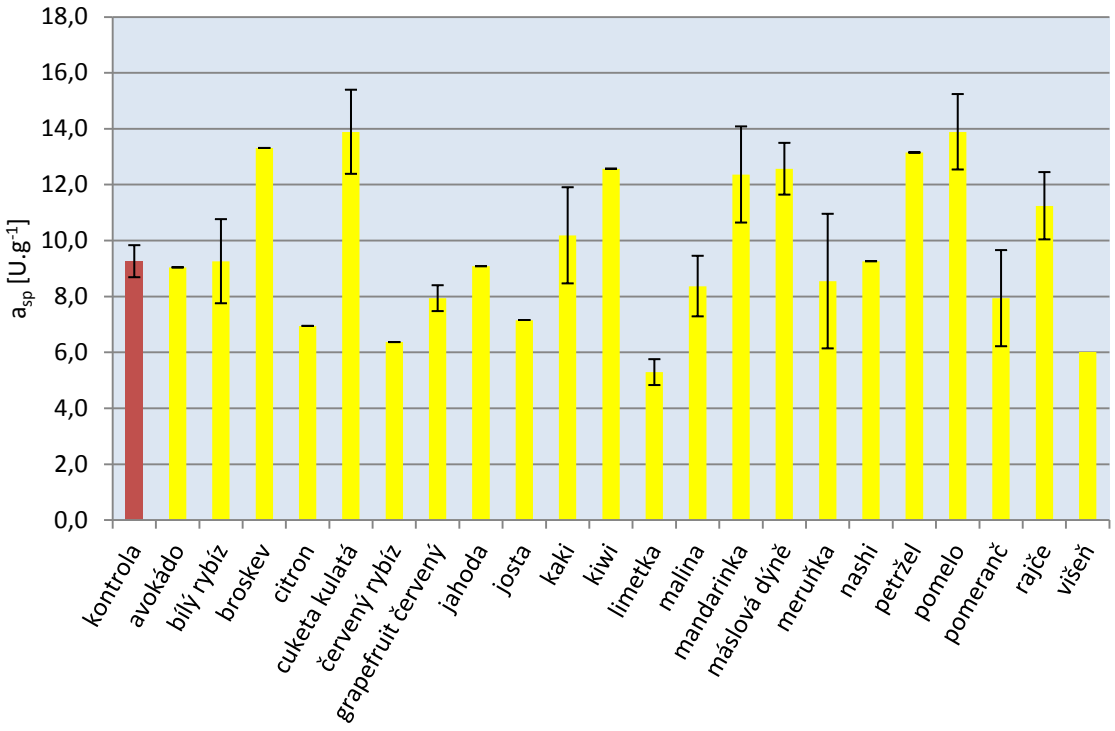


Obrázek 4.4: Stanovení antioxidačních vlastností metodou FRAP – molární zastoupení ekvivalentu askorbátu v sušině. [1]z_{FRAP}(petržel) = 0,1 mmolEA.kg^{-1}

Antioxidační kapacita stanovená metodou FRAP se nachází v intervalu 0,1 – 32,0 mmolEA.kg^{-1}. Nejvyšší antioxidační kapacita byla stanovena v extraktech z jahody, kiwi a maliny. Nejmenší antioxidační kapacita byla zjištěna v extraktech z petržele, máslové dýně a broskve.

4.5 Vliv rostlinného extraktu na aktivitu lipasy

Byl sledován vliv rostlinného extraktu na aktivitu lipasy dle metody uvedené v odstavci 3.4.8 na straně 43. Na obrázku 4.5 je uvedena aktivita lipasy v přítomnosti jednotlivých rostlinných extraktů a kontrolního vzorku.

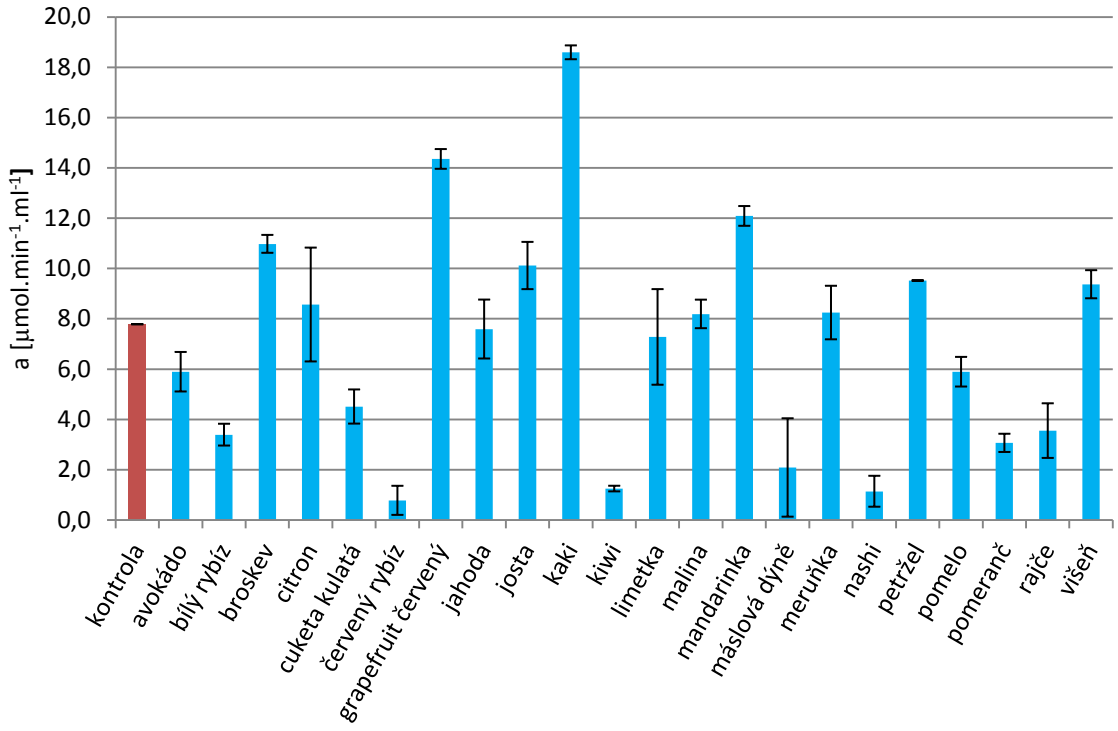


Obrázek 4.5: Vliv rostlinného extraktu na specifickou aktivitu lipasy. Kontrolní vzorek (kontrola) představuje reakční směs bez rostlinného extraktu.

Extrakty z limetky, višně a červeného rybízu měly největší tendenci inhibovat lipasu. Na druhé straně extrakty s největším potenciálem aktivace lipasy byly z cukety kulaté, pomela a broskve. Extrakty z avokáda, bílého rybízu a nashi neměly na aktivitu lipasy žádný vliv.

4.6 Vliv rostlinného extraktu na aktivitu α-amylasy

Byl sledován vliv rostlinného extraktu na aktivitu α-amylasy dle metody uvedené v odstavci 3.4.9 na straně 43. Na obrázku 4.6 je uvedena aktivita α-amylasy v přítomnosti jednotlivých rostlinných extraktů a kontrolního vzorku.



Obrázek 4.6: Vliv rostlinného extraktu na aktivitu α-amylasy. Kontrolní vzorek (kontrola) představuje reakční směs bez rostlinného extraktu.

Extrakty z limetky, višně a červeného rybízu měly největší tendenci inhibovat α-amylasu. Na druhé straně extrakty s největším potenciálem aktivace α-amylasy byly z cukety kulaté, pomela a broskve. Extrakty z avokáda, bílého rybízu a nashi neměly na aktivitu α-amylasy žádný vliv.

5 Diskuze

Rostliny obsahují velké množství látek, které nejsou syntetizovány v živočišných buňkách. Patří mezi ně isoprenoidy a látky syntetizované fenylpropanoidní dráhou. Některé látky patří mezi primární metabolity (karotenoidy), řada z nich mezi sekundární (flavonoidy), často však není jednoduché mezi těmito kategoriemi rozhodnout (lignoly, lignin).

Uvedené látky jsou přítomny i v rostlinách, které jsou součástí stravy člověka - léčivé rostliny, ovoce a zelenina [4].

U řady těchto látek byl zjištěn pozitivní vliv pro zachování zdraví a snížení rizika některých chorob včetně kardiovaskulárních, diabetu a rakoviny [4, 8, 9, 10]. Přesto není dosud znám přesný mechanismus účinku jednotlivých látek a to ani těch, které jsou komerčně dostupné ve formě doplňků stravy. Pravděpodobně nejdůležitější vlastností je jejich antioxidační kapacita.

V této práci byl stanoven celkový obsah fenolických látek a obsah flavonoidů a porovnán s antioxidační kapacitou v extraktech z 22 druhů převážně ovoce a v menší míře zeleniny. Druhy ovoce byly vybrány jak mezi sezónními druhy rostoucími u nás (broskev, jahoda, josta, malina, meruňka, rybíz), tak mezi tropickými druhy (avokádo, citron, grapefruit, kaki, kiwi, nashi, pomelo). Ve stanovených parametrech byly mezi jednotlivými druhy ovoce značné rozdíly.

Nejvyšší antioxidační kapacita byla zjištěna pro extrakt z jahody (obr. 4.3 a 4.4 na straně 49 a 50), který zároveň obsahoval nejvíce fenolických látek. Na druhé straně nejvyšší obsah flavonoidů byl stanoven v extraktu z limetky. Další druhy ovoce včetně jahody měly obsah flavonoidů srovnatelný (obr. 4.2 na straně 48). Další ovoce s významnými antioxidačními vlastnostmi byly kiwi a malina. Obsah fenolických látek, flavonoidů a antioxidační kapacita v ovoci byla podstatně nižší než v léčivých rostlinách ve formě výluhu horkou vodou nebo methanolem [55].

Čtyři druhy zeleniny (cuketa, dýně, petržel, rajče) doplnily předchozí práci zabývající se těmito parametry [55]. V kořenu petržele byl zjištěn výrazně nižší obsah fenolických látek i flavonoidů v porovnání s jinými zdroji (obr. 4.1 a 4.2 na straně 47 a 48) a rovněž antioxidační kapacita byla mimořádně nízká (obr. 4.3 a 4.4 na straně 49 a 50). V porovnání s jinými druhy zeleniny vykazuje petržel přibližně 20× menší obsah fenolických látek,

10× menší obsah flavonoidů a 10× menší antioxidační kapacitu než extrakt mrkve a celeru [55]. Extrakt z cibule vykazoval 40× větší obsah fenolických látek a 10× vyšší obsah flavonoidů, 100× vyšší antioxidační kapacitu dle metody ABTS (50× vyšší dle metody FRAP) než extrakt petržele.

Obsah flavonoidů byl stanoven na základě tvorby komplexu s hlinitými ionty. Přítomnost některých flavonoidů ve formě glykosidů může být problémem při kvantitativním stanovení. Sacharidové substituenty mohou být přímo navázány na jednom z komplexotvorných atomů kyslíku nebo stéricky bránit koordinaci hlinitého iontu. K přesnějšímu stanovení flavonoidů by tedy bylo vhodné provést nejdříve chemickou nebo enzymovou hydrolýzu všech glykosidů ve vzorku.

Antioxidační vlastnosti je třeba zjišťovat více metodami. Metody stanovení antioxidační kapacity zahrnují použití "stabilních" radikálů, odvozených od *N*,*N*-di(fenyl)pikrylhydrazinu (DPPH) nebo ABTS. Jako standard se obvykle používá trolox, což je syntetická varianta vitaminu E. Na druhé straně metoda FRAP je určená striktně pro kyselé vodné prostředí (pH okolo 3,6 pro udržení rozpustnosti) a využívá změny absorpčních vlastností při redukci komplexu železitého iontu s TPTZ. V souboru 32 druhů léčivých rostlin a zeleniny byla provedena korelace mezi obsahem fenolických látek a antioxidačními vlastnostmi stanovenými metodami ABTS a DPPH a FRAP [55]. Výsledky poskytnuté metodami ABTS a DPPH byly velmi podobné, proto v této práci byly použity pouze metody ABTS a FRAP.

Vysoký redoxní potenciál umožňuje polyfenolickým látkám, aby sloužily jako reduktanty ROS, které vznikají nejen jako vedlejší produkt aerobního metabolismu, ale také působením stresu [66, 67]. Proto mají polyfenoly v lidském organismu důležitou antioxidační úlohu. V této práci byla stanovena celková antioxidační kapacita, ke zjištění konkrétní látky vykazující nejvyšší antioxidační kapacitu by bylo zapotřebí zvolit další analytické metody jako HPLC. Některé látky však působí synergicky a účinek extraktu obsahujícího širokou škálu a unikatní kombinaci polyfenolických látek tedy nelze nahradit jedinou syntetickou látkou [68].

Fenolické látky přítomné v rostlinách mohou interagovat s proteiny a vytvářet s nimi komplexy. Pro tuto interakci jsou důležité vodíkové vazby tvořené hydroxylovými skupinami fenolických látek a postranními řetězci aminokyselin nebo částmi peptidové

vazby. Další interakce mají hydrofóbní charakter a dochází i k interakcím mezi aromatickými částmi molekuly a aminokyselinovými zbytky. Tyto interakce vedou ke změnám terciální a sekundární struktury, v případě enzymu i ke změnám enzymové aktivity [69]. Vliv fenolických látek na aktivitu enzymů byl sledován především u enzymů trávicího traktu: α-amylasy, α-glukosidasy, pankreatické lipasy, pepsinu a trypsinu. Inhibice lipasy a α-amylasy by mohla znamenat snížený příjem energeticky bohatých látek a prostředek k omezení obezity [69, 70, 71].

V této práci byl sledován vliv extraktů z ovoce a zeleniny na aktivitu lipasy a α-amylasy. Mezi jednotlivými rostlinnými druhy byly značné rozdíly. V případě α-amylasy byla zjištěna jak značná inhibice (červený rybíz, dýně, kiwi, nashi) přes mírnou inhibici až po zvýšení aktivity (grapefruit, kaki) (obr. 4.6 na straně 52). Inhibice α-amylasy byla zjištěna pro některé flavonoidy (kvercetin, isokvercetin a rutin) [51] a další látky obsažené v měsíčku lékařském [71].

V případě lipasy nebyly tak výrazné rozdíly mezi jednotlivými druhy ovoce a zeleniny jako v předchozím případě [obr. 4.5 na straně 51]. Působení fenolických látek na aktivitu lipasy může být složitější, pravděpodobně záleží na použitém substrátu a podmínkách reakce. Fenolické látky mohou působit proti emulgaci, a tím snižují rychlost štěpení, na druhou stranu mohou působit na změnu konformace, a tím naopak zvýšit aktivitu. Při hledání účinných inhibitorů pankreatické lipasy pro snížení energetického příjmu obézních lidí je tedy třeba podobných kinetických stanovení [70].

Každý druh ovoce a zeleniny představuje unikátní směs polyfenolických látek s určitou antioxidační kapacitou. Pro člověka je tedy zřejmě nejvýhodnější, aby se jeho strava skládala zčásti z pestré škály rostlinných zdrojů. Doplňky stravy obvykle kladou důraz pouze na některé sloučeniny, které se pak dostavájí do organismu ve vysokých koncentracích, což může mít za následek jejich prooxidační účinek [24].

6 Shrnutí

- Byla provedena rešerše o syntéze sekundárních metabolitů v rostlinách a metabolismu kvercetinu v živočišném organismu.

- Bylo připraveno 22 extraktů z různých druhů ovoce a zeleniny.

- V extraktech byl stanoven obsah fenolických látek a flavonoidů.

- V extraktech byla zjištěna antioxidační kapacita metodami ABTS a FRAP.

- Nejvyšší obsah fenolických látek byl zjištěn v extraktu z jahody, který vykazoval i nejvyšší antioxidační kapacitu v obou použitých metodách. Nejvyšší obsah flavonoidů byl zjištěn v extraktu z limetky.

- Byl zjištěn vliv extraktů na aktivitu lipasy a α-amylasy. Nejvyšší inhibiční účinek na aktivitu lipasy měl extrakt z limetky a na aktivitu α-amylasy extrakt z červeného rybízu.

Reference

[1] Korkina, L.G.: *Cell. Mol. Biol.,* **53**:15-25, (2007).

[2] Pichersky, E., Gang, D.R.: *Trends Plant Sci.,* **5**:439-445, (2000).

[3] Ferrari, S.: *Adv. Exp. Med. Biol.,* **698**:152-166, (2010).

[4] Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H.: *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*, Blackwell Publishing Ltd., Singapore, (2006).

[5] Heldt, H.-W., Piechulla, B., Heldt, F.: *Secondary metabolites fulfill specific ecological functions in plants*, v knize *Plant Biochemistry*, Academic Press, str. 399-449, (2011).

[6] Vodrážka, Z.: *Sekundární metabolity rostlin*, v knize *Biochemie (kniha třetí),* Academia, Praha, str. 67-79 (1999).

[7] DellaPenna D.: *Science,* **285**:375-379, (1999).

[8] Hussain, S., Fareed, S., Ansari S., Rahman, A., Ahmad, I.Z., Saeed M.: *J. Pharm. BioAllied Sci.,* **4**:10-20, (2012).

[9] Briskin, D., P.: *Plant Physiol.,* **124**:507-514, (2000).

[10] Lin J.-K, Weng M.-S.: *Flavonoids as nutraceuticals*, v knize The Science of Flavonoids, (Grotewold, E. ed), Springer, New York (2006).

[11] Vogt, T.: *Mol. Plant*, **3**:2-20, (2010).

[12] Harmatha, J.: *Chem. Listy*, **99**:622-632, (2005).

[13] Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D. J.: *J. Nutr. Biochem.*, **13**:572-584, (2002).

[14] Cook, N.C., Samman, S.: *J. Nutr. Biochem.,* **7**:66-76, (1996).

[15] Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F.: *Life Sci.,* **65**:337-353, (1999).

[16] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G.: *Free Radic. Biol. Med.,* **20**:933-956, (1996).

[17] Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., Trinajstić, N.: *Croat. Chem. Acta,* **76**:56-61, (2003).

[18] Symonowicz, M., Kolanek, M.: Biotechnol. *Food Sci.*, **76**:35-41, (2012).

[19] Velíšek J., Hajšlová J.: *Barviva*, v knize *Chemie potravin 2*, OSSIS, Tábor, str. 163-194, (2009).

[20] Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Santos-Buelga, C.: *J. Sci. Food Agric.,* **92**:1822-1825, (2012).

[21] Hollman, P., C., H.: *Pharm. Biol.*, **42**:74-83, (2004).

[22] Spencer, J., P., E.: *J. Nutr.,* **133**:3255-3261, (2003).

[23] Vargas, A.J., Burd, R.: *Nutr. Rev.,* **68**:418-428, (2010).

[24] Boots, A.W., Haenen G.R.M.M., Bast, A.: *Eur. J. Pharmacol.,* **585**:325-337, (2008).

[25] Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., Russo, G.L.: *Biochem. Pharmacol.,* **83**:6-15, (2012).

[26] Kasiotis, K., M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Haroutounian, S., A.: *Food Chem. Toxicol.,* **61**:112-120, (2013).

[27] Šmidrkal, J., Filip, V., Melzoch, K., Hanzlíková, I., Buckiová, D., Křísa, B.: *Chem. Listy*, **95**:602-609, (2001).

[28] Doré, S.: *Neurosignals*, **14**:61-70, (2005).

[29] Butelli, E., Titta, L., Giorgio, M., Mock, H.-P., Matros, A., Peterek, S., Schijlen, E.G.W.M., Hall, R.D., Bovy, A.G., Luo, J., Martin, C.: *Nat. Biotechnol.*, **26**:1301-1308, (2008).

[30] Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J.A., Bagchi, D.: *Mol. Nutr. Food Res.,* **51**:675-683, (2007).

[31] Oancea, S., Oprean, L.: *Acta Univ. Cibiniensis, Ser. E: Food Technol.*, **15**:3-16, (2011).

[32] Kumari, M., Jain, S.: *Res. J. Chem. Sci.,* **1**:70-73, (2012).

[33] Themodernembalmer.com. [online]. [cit. 2014-21-03]. URL: http://www.themodernembalmer.com/tannin.html

[34] Liu, Y., Wang, H., Ye, H-Ch., Li, G-F.: *J. Integr. Plant Biol.,* **47**:769-782, (2005).

[35] Kirby, J., Keasling, J., D.: *Annu. Rev. Plant Biol.,* **60**:335-355, (2009).

[36] Roberts, S.C.: *Nat. Chem. Biol.,* **3**:387-395, (2007).

[37] Bouvier, F., Rahier, A., Camara, B.: *Prog. Lipid Res.,* **44**:357-429, (2005).

[38] Ryšlavá, H., Doubnerová, V.: *NADP-dependent enzymes and abiotic stress*, v knize *Abiotic Stress: New Research*, (Haryana, N., Punj, S. eds.), Nova Science Publishers, New York, str. 57-97 (2012).

[39] Elson, Ch.E.: *J. Nutr.,* **125**:1666-1672, (1995).

[40] Hooff, G.P., Wood, W.G., Müller, W.E., Eckert, G.P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1801**:896-905, (2010).

[41] Young, S.I., Woodside, J.V.: *J. Clin. Pathol.,* **54**:176-186, (2001).

[42] Sen, S., Chakraborty, R.: *The Role of Antioxidants in Human Health*, v knize *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, (Andreescu, S., Hepel, M. eds.), American Chemical Society, str. 1-37, (2011).

[43] Matés, J.M., Pérez-Gómez, Ch., Núñez de Castro, I.: *Clin. Biochem.*, **32**:595-603, (1999).

[44] Birari R.B., Bhutani, K.K.: *Drug Discov. Today,* **12**:879-889, (2007).

[45] Zheng, Ch.D., Duan, Y.Q., Gao, J.M., Ruan, Z.G.: *J. Chin. Med. Assoc.*, **73**:319-324, (2010).

[46] Langin, D., Dicker, A., Tavernier, G., Hoffstedt, J., Mairal, A., Rydén, M., Arner, E., Sicard, A., Jenkins Ch.M., Viguerie, N., Harmelen, V., Gross, R.W., Holm, C., Arner, P.: *Diabetes*, **54**:3190-3197, (2005).

[47] Yun, J.W: *Phytochemistry,* **71**:1625-1641, (2010).

[48] Wang, S., Dong, S., Zhang, R., Haoying, S., Liu, Y.: *Process Biochem.,* **49**:237-243, (2014).

[49] Etxeberria, U., Garza, A.L., Campión, J., Martínez, J.A., Milagro, F.I.: *Expert Opin. Ther. Targets,* **16**:269-297, (2012).

[50] Nair, S.S., Kavrekar, V., Mishra, A.: *Eur. J. Exp. Biol.,* **3**:128-132, (2013).

[51] Li, Y., Gao, F., Gao, F., Shan, F., Bian, J., Zhao, C.: *J. Food Sci.,* **74**:199-203, (2009).

[52] MemoireOnline.com. [online]. [cit. 2014-15-05]. URL: http://www.memoireonline.com/08/13/7254/Evaluation-of-the-hypoglycemic-hypolipidemic-and-anti-alpha-amylase-effects-of-extracts-of-the-twig13.png.

[53] BioLib.cz [online]. [cit. 2013-09-11]. URL: http://www.biolib.cz/cz/main/.

[54] Pepato, M.T., Mori, D.M., Baviera, A.M., Harami, J.B., Vendramini, R.C., Brunetti, I.L.: *J. Ethnopharmacol.,* **96**:43-48, (2005).

[55] Tupec, M.: *Antioxidační vlastnosti léčivých rostlin*: Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 35-56, (2013).

[56] Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiére, P., Woillez, M., Mérillon, J.-M.: *J. Agric. Food Chem.,* **57**:1768-1774 (2009).

[57] Chang, Ch.-Ch., Yang, M.-H., Wen, H.-M., Chern, J.-Ch.: *J. Food Drug Anal.,* **10**:178-182, (2002).

[58] Alam, M.N., Roy, S., Anisuzzaman, S.M., Rafiquzzaman, M.: *Pharmacogn. Commun.,* **2**:67-71, (2012).

[59] Yao, Y., Sang, W., Zhou, M., Ren, G.: *J. Food Sci.,* **75**:9-13, (2010).

[60] Palacios, D., Busto, M.D., Ortega, N.: *LWT – Food Sci. Technol.,* **55**:536-542, (2014).

[61] Gupta, N., Rathi, P., Gupta, R.: *Anal. Biochem.,* **311**:98-99, (2002).

[62] Tamil I.G., Dineshkumar, B., Nandhakumar, B., Senthilkumar, M., Mitra, A.: *Indian J. Pharmacol.,* **42**:280-282, (2010).

[63] Doehlert, D.C., Duke, S.H.: *Plant Physiol.,* **71**:229-234, (1983).

[64] Bradford M.M.: *Anal. Biochem.,* **72**:248-254, (1976).

[65] Eckschlager, K., Horsák, I., Kodejš, Z.: *Vyhodnocování analytických výsledků a metod*, Praha, SNTL, (1980).

[66] Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E., Khanizadeh, S.: *J. Agric. Food Chem.,* **53**:4989-4995 (2005).

[67] Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K.: J. *Agric. Food Chem.,* **50**:3122-3128, (2002).

[68] Jacobo-Velázquez, D.A., Cisneros-Zevallos, L., *J. Food Sci.*, **74**:107-113, (2009).

[69] He, Q., Lv, Y., Yao, K.: *Food Chem.,* **101**:1178-1182, (2006).

[70] Wang, S., Dong, S., Zhang, R., Shao, H., Liu, Y.: *Process Biochem.,* **49**:237-243, (2014).

[71] Olennikov, D.N., Kashchenko, N.I.: *Sci. World J.*, DOI: 10.1155/2014/654193, (2014).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a přijmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka