

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakognosie

Diplomová práce

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra Farmakognozie

Diplomová práce

Antioxidační aktivita extraktu *Epimedium sp.*

Vypracovala: Radka Brlicová

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Oponent:

Datum zadání diplomové práce: 10.12.2007

Termín odevzdání diplomové práce: 15.5.2009

Datum obhajoby diplomové práce: 2.6.2009

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a použila jsem přitom uvedené prameny a literatury.

Děkuji Doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc. za odborné vedení práce a mnoho cenných rad a podnětů. Dále děkuji PharmDr. Tomáši Siatkovi, CSc. za provedení lyofilizace. Ráda bych poděkovala svým rodičům a Martinovi za neustálou morální podporu, za jejich trpělivost a lásku.

V Hradci Králové dne

20. 4. 2009

OBSAH

1. Úvod.....	4
2. Cíl práce.....	5
3. Teoretická část	6
3.1. Volné radikály.....	6
3.1.1. Definice volných radikálů.....	6
3.1.2. Reaktivní formy kyslíku	8
3.1.3. Reaktivní formy dusíku	10
3.1.4. Vznik volných radikálů.....	12
3.1.5. Funkce volných radikálů ve zdravém organismu	12
3.1.6. Poškození biomolekul volnými radikály	13
3.1.7. Ochrana před volnými radikály, antioxidanty	14
3.1.8. Rovnováha mezi volnými radikály a antioxidanty	15
3.1.9. Příznivé účinky volných radikálů	16
3.2. Epimedium sp.	17
3.2.1. Systematické zařazení.....	17
3.2.2. Popis.....	17
3.2.3. Obsahové látky	18
3.2.4. Epimedium herba.....	22
3.2.5. Účinky a použití.....	23
4. Praktická část	27
4.1. Rostlinný materiál.....	27
4.2. Přístroje.....	27
4.3. Chemikálie	27
4.4. Důkaz flavonoidů – tenkovrstvá chromatografie (TLC)	28
4.5. Měření antiradikálové aktivity proti radikálu DPPH.....	28
4.5.1. Měření antiradikálové aktivity methanolového extraktu	29
4.5.2. Měření antiradikálové aktivity vodného extraktu.....	29
4.6. Metoda měření antioxidační aktivity vůči superoxidu	30
4.6.1. Antioxidační aktivita extraktu drogy	30
4.6.2. Antioxidační aktivita standardů – rutinu, troloxu a kyseliny askorbové.....	30

5.	Výsledky	32
5.1.	Tenkvrstvá chromatografie	32
5.2.	Tabulky a grafy	33
6.	Diskuse.....	49
7.	Závěr	51
8.	Použitá literatura	52
9.	Abstrakt.....	55
10.	Abstract.....	56

1. Úvod

Problematika vztahu volných radikálů a onemocnění i možnosti antioxidační terapie se stále častěji diskutují v odborné literatuře i na kongresech nejen biochemických, ale prakticky všech klinických oborů medicíny. (1)

Volné radikály byly dlouho považovány za fragmenty molekul existující téměř neměřitelnou dobu jako součást mechanismů chemických reakcí. Biologická vědecká obec včetně lékařů se o ně téměř nezajímala. Před 30 lety však byl objeven enzym, který v organismu katalyzuje přeměnu superoxidu. Následovala exploze pokusů, studií a publikací ukazujících volné radikály jako součást normálních životních dějů (přeměn energie, ochranných systémů a biologických informačních cest) a také jako součást patogenetických mechanismů. Je tedy logické, že se stále zvyšuje i snaha využít nové poznatky v klinické praxi.

Porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RON) se nazývá oxidační stres. Může být vyvolán nadměrnou produkcí RONS (reaktivní formy dusíku a kyslíku), nedostatečnou funkcí antioxidačního ochranného systému nebo kombinací obou těchto nedostatků. K nadměrné tvorbě ROS dochází při některých metabolických situacích, při reoxygenaci tkáně po ischemii, po příjmu oxidoredukčně aktivních xenobiotik nebo uvolněním železa, mědi či jiných tranzitních prvků do oxidoredukčně aktivních forem. (2)

2. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo prokázat a zhodnotit antioxidační aktivitu extraktu z nati druhu *Epimedium x rubrum*. a shromáždit poznatky o obsahových látkách a biologické aktivitě druhů rodu *Epimedium*.

3. Teoretická část

3.1. Volné radikály

3.1.1. *Definice volných radikálů*

V posledních letech bylo získáno mnoho dokladů o tom, že v organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) a reaktivních forem dusíku (reactive nitrogen species – RNS) a že tyto látky mají značný fyziologický a patologický význam. Staly se proto předmětem intenzivního lékařského výzkumu a vědomosti o nich se postupně uplatňují v lékařské praxi. Jde o látky, které pohotově reagují s různými biologickými strukturami – mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami a proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy (nukleovými kyselinami) i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však působí jako toxické látky a jako dezinformační agenti, schopní organismus poškodit a dokonce ho i usmrtit. Tabulka 1 představuje reaktivní formy kyslíku a dusíku (reactive oxygen and nitrogen species – RONS). (2)

Volné radikály jsou látky (atomy, molekuly, ionty) schopné samostatné existence, které mají ve svém elektronovém obalu nepárový elektron, event. více nepárových elektronů. Vznikají z normální částice ztrátou či přijetím elektronu. Další možnost, tj. homolytické štěpení na dvě částice, z nichž každá má jeden elektron, vyžaduje příliš energie, a proto v biologických systémech prakticky nepřichází v úvahu.

Protože stabilní konfigurace vyžaduje párové seskupení elektronů, snaží se volné radikály chybějící elektron doplnit. Z toho plyne malá stabilita a vysoká reaktivita většiny volných radikálů. Volný radikál získá chybějící elektron, setká-li se s jiným radikálem, častěji však vytržením elektronu ze „zdravé“ molekuly. Z té se pak stává radikál a může napadnout jinou sloučeninu, přeměnit ji na radikál atd. Nastartuje se tak řetězová reakce, vedoucí k poškození řady molekul. Řetězová reakce je ukončena, setkají-li se dva radikály, obvykle však tehdy, setká-li se radikál s látkou, jejíž radikál je stabilní a může delší dobu přetrvávat. Protože ztráta elektronu je z elektrochemického hlediska oxidace, mají volné radikály oxidační účinek. (1)

Tabulka 1: Reaktivní formy kyslíku a dusíku

REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU	
Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
superoxid, O_2^{\cdot}	peroxid vodíku, H_2O_2
hydroxylový radikál, HO^{\cdot}	kyselina chlorná, $HOCl$
peroxyl, ROO^{\cdot}	ozon, O_3
alkoxyl, RO^{\cdot}	singletový kyslík, 1O_2
hydroperoxyl, HO_2^{\cdot}	
REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU	
Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
oxid dusnatý, NO^{\cdot}	nitrosyl, NO^{\cdot}
oxid dusičitý, NO_2^{\cdot}	nitroxid, NO
	kyselina dusitá, HNO_2
	oxid dusitý, N_2O_3
	oxid dusičitý, N_2O_4
	nitronium, NO_2^+
	peroxynitrit, $ONOO$
	alkylperoxynitrit, $ROONO$

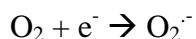
Chceme-li pochopit definici volných radikálů a RONS, musíme si nejdříve připomenout některé pojmy popisující strukturu hmoty. Jádro atomu složené z kladných protonů a neutrálních neutronů je obklopeno negativními elektrony. Elektrony zaujímají v atomech a molekulách definované prostory, tj. energetické hladiny, slupky, zvané orbitály. Každý může obsahovat maximálně dva elektrony a ty musí mít opačný spin (směr rotace). Pokud atom nebo molekula (ať už neutrální nebo ion) obsahuje alespoň jeden orbital s jedním, tedy nepárovým elektronem, částice se nazývá volný radikál.

Volný radikál z těchto „normálních“ molekul vzniká trojím způsobem: homolytickým štěpením kovalentní (dvouelektronové) chemické vazby, přičemž každý fragment získá jeden nepárový elektron, nebo přidáním jednoho elektronu k normální molekule – redukcí, nebo naopak ztrátou jednoho elektronu, což je oxidace. K homolytickému štěpení je třeba hodně energie, například vysoká teplota, ultrafialové nebo ionizační záření. V biologických systémech však volné radikály

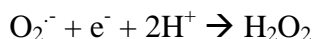
vznikají energeticky snadnějším způsobem – odejmutím nebo přijetím elektronu. Radikály mohou být neutrální částice nebo záporně nebo kladně nabitě ionty. Vzorce radikálů se označují tečkou, indikující nepárový elektron, a jsou-li popisované částice zároveň ionty, je vzorec doplněn podle počtu a typu náboje symboly plus (+) nebo minus (-). Vznik radikálu může být iniciací celého řetězce dalších reakcí. Obecně bývají radikály vysoce reaktivní částice, protože se snaží doplnit si párový elektron, a tak jsou schopné rychle se navázat na jinou strukturu nebo elektron předat jiné molekule nebo jí ho odejmout. Teprve reakcí dvou radikálů se nepárové elektrony spojí ve dvojici a vzniká „normální“ molekula. Radikálová reakce se tak ukončí – terminace. (2)

3.1.2. *Reaktivní formy kyslíku*

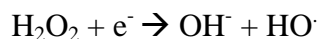
Přijetím jednoho elektronu se molekula kyslíku (biradikál) redukuje na monoradikál superoxid:



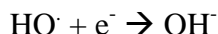
A další elektron redukuje superoxid na peroxid vodíku:



Je-li k dispozici další elektron, dvouatomová molekula peroxidu vodíku se rozpadne na vodu a hydroxylový radikál:



Poslední elektron redukuje hydroxylový radikál na další molekulu vody:



Popsaná čtyřelektronová redukce molekuly atmosférického (tripletového) kyslíku na dvě molekuly vody je nezbytnou reakcí pro aerobní způsob života. Probíhá v dýchacím řetězci mitochondrií, v aktivním centru enzymu cytochromoxidázy, a umožňuje známou transformaci energie chemických vazeb živin do adenosin trifosfátu (ATP), což je univerzální forma energie pro biochemické procesy organismu. Ani neaktivnější forma kyslíku (hydroxylový radikál) není ve vazbě s enzymem škodlivá. Volná částice je však nejjedovatější známou látkou, neboť ve tkáni se okamžitě slučuje s téměř jakoukoli sousední molekulou nebo z ní vytrhne elektron a aktivuje ji.

Z patobiochemického hlediska stojí za pozornost též reakce, kdy tripletový kyslík je vystaven záření nebo vychází z chemické reakce a získá přitom energii, která vyzdvihne nepárové elektrony do jiné orbitalové pozice, popřípadě změni jeho spin. Nic jiného než uspořádání elektronů se nezmění, takže fyzikové počítající multiplicitu stavu jej označují jako singletový kyslík. Chemici vědí, že je velice reaktivní. Ve chvílce, po kterou existuje, se slučuje například s nenasycenými mastnými kyselinami na lipidové peroxidy. V lidském těle singletový kyslík vzniká po absorpci světla některými pigmenty nebo při spontánní neenzymové dismutaci superoxidu.

- **Superoxid**

Superoxid má oxidační i redukční vlastnosti. Podléhá dismutaci, při které jedna jeho molekula poskytuje elektron druhé, takže superoxid se vlastně zároveň oxiduje i redukuje a produkty reakce jsou kyslík a peroxid vodíku:



Přestože ve vodném prostředí reakce probíhá velkou rychlostí, v biologických organismech je ještě urychlována enzymem superoxidodismutázou.

- **Peroxid vodíku**

Peroxid vodíku není radikálem, avšak do skupiny reaktivních forem kyslíku určitě patří, neboť se účastní vzniku radikálů. Reakce samotného peroxidu vodíku s biomolekulami jsou poměrně pomalé, avšak v přítomnosti tranzitních kovů se peroxid vodíku pohotově redukuje:



Touto Haberovou-Weissovou reakcí, známou spíše jako Fentonova reakce, vzniká vysoce toxický hydroxylový radikál HO^\cdot . Hydroxylový radikál v živé hmotě okamžitě reaguje s okolními biomolekulami. Jde o extrémně silné oxidační činidlo. Vytrhuje elektron z nenasycených mastných kyselin, atakuje a hydroxyluje aminokyseliny a báze nukleových kyselin.

Po Fentonově reakci pak další superoxid redukuje trojmocné železo zpět na dvojmocné, takže je regenerováno pro další katalýzu. Tranzitní kovy, neboli přechodné prvky či kovy, se významně účastní vzniku reaktivních forem kyslíku, jen pokud nejsou vázány v bezpečných depozitních formách, jako je železo ve feritinu či transferinu a měď v ceruloplazminu. Bezpečné uložení a tím “inaktivace” tranzitních

kovů jsou nezbytné k tomu, aby byl čas odstranit superoxid z tkáně zmíněnou superoxidodismutázou a peroxid vodíku katalázou. Oba enzymy jsou součástí antioxidačního ochranného systému organismu, který zahrnuje též enzym glutathionperoxidázu a řadu neenzymových “lapačů” volných radikálů (scavengers), například askorbát, tokoferol, urát, bilirubin, beta-karoten a jiné látky účastnící se zneškodnění reaktivních forem kyslíku.

- **Kyselina chlorná**

Kyselinu chlornou syntetizují neutrofilní granulocyty pomocí své myeloperoxidázy:



Kyselina chlorná je silný oxidant. Polymorfonukleáry ho používají spolu s dalšími reaktivními formami kyslíku a dusíku jako baktericidní prostředek. (2)

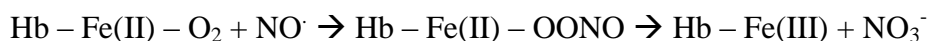
3.1.3. *Reaktivní formy dusíku*

- **Oxid dusnatý**

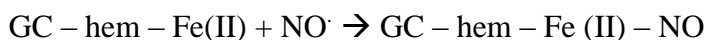
Přestože je oxid dusnatý velmi jednoduchá molekula, syntetizuje se v těle poměrně složitým enzymovým mechanismem. Oxid dusnatý a jeho metabolity jsou za určitých okolností prudce jedovatými látkami.

Protože součet elektronů dusíku a kyslíku je lichý a do orbitalů se vejdou dvojice, oxid dusnatý musí být radikál. Přesto NO^\cdot při svých koncentracích *in vivo* reaguje velmi pomalu s většinou biomolekul včetně kyslíku, neboť difúze oxidu dusnatého do krve a jeho inaktivace hemoglobinem je mnohem rychlejší než uvažované reakce. *In vivo* reaguje dostatečně rychle jen s tranzitními kovy a radikály. Metabolity NO^\cdot jsou však velmi reaktivní.

NO^\cdot má i v nízké koncentraci biologický poločas pouze několik sekund. Příčinou však není interakce s biomolekulami, nýbrž skutečnost, že je průběžně vychytáván v erytrocytech. Pohotově totiž reaguje se železem oxyhemoglobinu. Vzniká methemoglobin a nitrát:



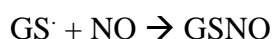
Oxid dusnatý se stejně rychle navazuje na hemové železo enzymu guanylátcyklázy, což je podstata stimulace syntézy cGMP, vedoucí k relaxaci hladkého svalstva cév, a mechanismu dalších regulací:



In vivo v přítomnosti akceptorů elektronů se oxid dusnatý snadno slučuje s fenoly (tyrozinem), thioly (cystein, GSH, albuminem) a se sekundárními aminy:



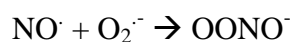
Glutathion (GSH) se metabolizuje na radikál GS \cdot a ten s NO \cdot dává nitrosothiol:



Reakcí se sulfhydrylovými skupinami (-SH) cysteinu, glutathionu, albuminu a dalších látek oxid dusnatý tvoří o něco stářejší nitrosothioly (neboli thionitry). Tyto látky s biologickým poločasem kolem 40 minut jsou pravděpodobně transportní formou NO \cdot . Mohou totiž předávat nitrosyl NO $^+$ jiným molekulám a tak sloužit jako přenašeče biologicky aktivního oxidu dusnatého.

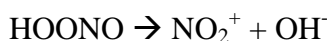
- **Peroxynitrit**

Patologicky nejvýznamnější reakce NO \cdot se superoxidem, kdy vzniká toxický peroxynitrit:



Fyziologické podmínky (pH 7,0) nejsou pro vznik peroxynitritu výhodné vzhledem k nízké koncentraci oxidu dusnatého a zejména superoxidu, avšak při intenzivní syntéze NO \cdot a O $_2^{\cdot -}$ může koncentrace peroxynitritu dosáhnout významné mikromolární hladiny. NO \cdot je jediná biologická molekula produkovaná v koncentraci postačující ke kompetici o superoxid se superoxidddismutázou. Peroxynitrit je oxidačním činidlem. Obecně se soudí, že za fyziologického pH se proponovaný peroxynitrit, jakožto kyselina peroxydusitá, rozkládá na hydroxylový radikál a oxid dusičitý.

Peroxynitrit je in vivo odpovědný za nitraci a hydroxylaci aminokyseliny tyroxinu. Tranzitní kovy včetně kovů aktivních center superoxidddismutázy a myeloperoxidázy katalyzují jeho heterolytické štěpení na hydroxidový anion a nitroniový kation, kterému je tradičně připisována schopnost napadnout fenolové sloučeniny a in vivo v proteinech měnit například tyroxin na 3-nitrotyrozin:



(2)

3.1.4. Vznik volných radikálů

Volné radikály se dostávají do organismu zvenčí, velké množství však vzniká i v průběhu metabolismu. Podle toho rozdělujeme příčiny vzniku volných radikálů na exogenní a endogenní.

K exogenním příčinám patří: ionizující záření (gama-paprsky, X-paprsky); UV-světlo, modré světlo (léčba hyperbilirubinémie u novorozenců); vysoký obsah škodlivin ve vzduchu (tepelné elektrárny, průmysl, doprava); kouření (vykouření jedné cigarety představuje zatížení organismu 10^{17} volných radikálů); intoxikace (polychlorované bifenyly, tetrachlormethan, chloroform, parakvat, alkohol – volné radikály vznikají až při metabolismu těchto látek, na kterém se velmi často podílí enzym cytochrom P₄₅₀); potrava (volné radikály v ní vznikají při tepelné úpravě, drcení, vlivem světla atd.).

Mezi endogenní příčiny vzniku volných radikálů náleží zejména: vznik kyseliny močové (v reakci katalyzované xantinoxidázou – např. při úrazech, nekrotách, pooperačních stavech apod.); rozpad fagocytů a mikrofágů (záněty, popáleniny, septický stav); vznik methemoglobinu; syntéza prostaglandinů; zvýšený metabolismus estrogenů; autooxidace thiolů; hyperglykémie; reperfuze po předchozí ischemii včetně svalového výkonu „na kyslíkový dluh“. (1)

3.1.5. Funkce volných radikálů ve zdravém organismu

Reaktivní formy kyslíku se účastní uvolňování a přeměny energie nezbytné pro životní pochody, jsou součástí enzymových mechanismů a některé z nich jsou významnými signálními molekulami v buněčném informačním systému. Škodí pouze tehdy, vymknou-li se přísné kontrole, kterou každý aerobní organismus získal v průběhu vývoje biologického systému.

Bez radikálových reakcí by se dnešní formy života nevyvinuly, neboť tak velké množství energie, jaké je třeba k jejich výstavbě a funkcím, lze za daných podmínek uvolnit pouze přenosem elektronů ze živin na kyslík.

Neutrofilní leukocyty a mikrofágy používají reaktivní formy kyslíku k odstraňování zbytků mrtvých buněk a zabíjení bakterií.

V posledních letech se hromadí údaje o tom, že funkci buněčné informační sítě ovlivňuje oxidoredukční stav buňky a že reaktivní formy kyslíku bude třeba považovat za sekundární posly informace.

Je třeba odlišit indukci masivní produkce reaktivních forem kyslíku, které jsou nástrojem imunitní ochrany, a indukce změn nízkých koncentrací ROS, které jsou pravděpodobně regulačním mechanismem.

Oxidoredukce a reaktivní formy kyslíku zřejmě ovlivňují buněčnou signalizaci též prostřednictvím aktivačního proteinu AP-1, který řídí expresi genů regulujících buněčný cyklus a diferenciaci. AP-1 se skládá z produktů protonkogenů c-fos a c-jun. Jejich syntézu indukují různé cytokiny a jiné růstové faktory. Využívají k tomu signálních cest s fosforylací proteinů a aktivací fosfolipidů a zvyšování koncentrace cytosolového Ca^{2+} . Aktivátorem AP-1 je také proteinkináza-C.

Oxid dusnatý je neurotransmiterem zvláštní třídy periferních autonomních neuronů. NO[•] uvolněný z myenterického plexu vyvolá relaxaci střevní hladké svaloviny včetně sfinkterů. Stimulace pánevních nervů uvolní z neuronů NO[•], aktivuje guanylátcyklázu, tím zvýší hladinu cGMP a sníží fosforylaci lehkého řetězce myozinu. Výsledná vazodilatace je podstatou erekce penisu. S popsaným mechanismem souvisí i účinek sildenafilu (Viagra), léku mužské impotence. (2)

3.1.6. Poškození biomolekul volnými radikály

Volné radikály mohou napadnout prakticky kteroukoli molekulu organismu a způsobit tak její oxidační poškození. Nejzávažnější je poškození fosfolipidů buněčných membrán, vedoucí k poruše životně důležitých membránových dějů či dokonce k zániku buňky, dále poškození nukleových kyselin (mutageneze, karcinogeneze, zánik buňky) a bílkovin (inaktivace enzymů a jiných bílkovin s různým biologickým významem).

Snad nejvíce je prostudován proces poškození lipidů, resp. mastných kyselin volnými radikály, nazývaný obvykle lipoperoxidace. Postiženy jsou obvykle mastné kyseliny s větším počtem dvojných vazeb (polyenové mastné kyseliny, např. kyselina arachidonová).

Volné radikály mohou poškozovat i DNA. Projeví se to zlomy chromosomů, karcinogenním a mutagenním účinkem. Poškození ribózy vede k přerušení řetězce DNA, může se tvořit MDA (malondialdehyd). Oxidace postihuje rovněž dusíkaté báze, nejčastěji guanin: vzniká tak 8-hydroxyguanin. V moči pak můžeme stanovit nukleosidy s oxidovanou bází, mj. 8-hydroxyguanosin.

Primární oxidační modifikace proteinů působením volných radikálů zahrnuje podobné změny jako v případě lipidů: vznikají peroxylové radikály, hydroperoxydy, v konečné fázi se mohou tvořit reaktivní aldehydy i z bílkovin a uvolňovat další radikály. Hydroxylový radikál i radikál oxidu dusnatého vazbou na železo v aktivním centru enzymů Krebsova cyklu, katalázy aj. tyto enzymy inaktivují. Superoxidový radikál s radikálem oxidu dusnatého tvoří velmi reaktivní peroxyinitrit, který nitruje aromatické jádro tyrosinu. Bílkoviny však mohou být postiženy i sekundárně, a to vazbou aldehydů vznikajících při lipoperoxidaci. Tyto aldehydy se váží na volné aminokyseliny za vzniku Schiffovy báze; reakce připomíná vazbu glukózy v procesu glykace a vede k tvorbě příčných vazeb a změně vlastností proteinů, např. modifikace apolipoproteinu B v LDL, který pak není rozpoznáván příslušnými receptory. (1)

3.1.7. Ochrana před volnými radikály, antioxidanty

Proti toxickému vlivu volných radikálů se postupně vyvinuly účinné ochranné mechanismy. Podle jejich vztahu k tvorbě volných radikálů a jejich působení na organismus je můžeme rozdělit na tři skupiny.

1. Mechanismy zabraňující tvorbě volných radikálů:

- Vazba iontů přechodných kovů (Fe^{2+} , Cu^+ aj.), které mohou s peroxidem vodíku poskytovat nebezpečný hydroxylový radikál; působí tak transportní bílkoviny i bílkoviny pro uložení zásob těchto kovů (transferin, feritin, laktoferin), dále haptoglobin a hemopexin vazbou hemového železa, nebo ceruloplazmin oxidující Fe^{2+} na Fe^{3+} , které se při tvorbě volných radikálů Fentonovou reakcí neuplatňuje;
- Inhibice enzymů, katalyzujících tvorbou volných radikálů, např. allopurinol inhibicí xantinoxidázy brání vzniku superoxidu;

- Odstranění peroxidu vodíku katalázou či peroxidázami brání jeho možné další přeměně na hydroxylový radikál za katalytického působení přechodných kovů.

2. Mechanismy odstraňující již vzniklé volné radikály:

- Superoxiddismutáza, katalyzující přeměnu superoxidu na peroxid vodíku; ten však sám patří mezi ROS a může umožnit vznik dalších volných radikálů;
- Látky s redukčním účinkem, které poskytují radikálu elektron a samy se mění na radikál; ten je však mnohem stabilnější, a tedy méně nebezpečný. Sem patří např. vitamín C, E, ubichinol, glutathion aj.

3. Reparační systémy, které odstraňují molekuly poškozené volnými radikály:

- Poškozenou molekulu DNA opravují reparační endonukleázy;
- Oxidované proteiny snáze podléhají proteolytické degradaci, po níž následuje eliminace z organismu;
- Fosfolipázy odštěpují oxidované vyšší mastné kyseliny z molekuly fosfolipidů;
- Glutathionperoxidáza štěpí nejen peroxid vodíku, ale i lipidové hydroperoxydy, a brání tak vzniku reaktivních aldehydů poškození molekul vazbou těchto aldehydů.

Protože volné radikály odebírají molekulám elektron, a působí tedy oxidačně, všechny látky, které jejich působení brání, jsou označovány jako antioxidanty. V užším slova smyslu tyto látky likvidují již vzniklé volné radikály. Kromě enzymu superoxiddismutázy jde o látky s redukčním účinkem. (1)

3.1.8. Rovnováha mezi volnými radikály a antioxidanty

Za normálních okolností existuje mezi produkcí volných radikálů a antioxidanty rovnováha. Převaha jedné i druhé složky vede k poruchám, které mohou organismus vážně ohrozit. Častější je případ, kdy převládají volné radikály, ať je to dáno jejich zvýšenou tvorbou, snížením koncentrace antioxidantů, nebo kombinací obou stavů. Převaha volných radikálů se označuje termínem oxidační stres; může vést k rozvoji chorob známých pod pojmem nemoci z volných radikálů.

I převaha antioxidantů, je-li výrazná, může mít nepříznivé následky. Blokuje totiž ty účinky volných radikálů, které jsou příznivé a pro organismus nezbytné. Přebytek antioxidantů může paradoxně zvyšovat oxidační stres. (1)

3.1.9. Příznivé účinky volných radikálů

V membráně fagocytů se nachází enzym NADPH-oxidáza, která katalyzuje vznik superoxidového radikálu. Ten je pak přeměňován na účinnější ROS, největší význam z nich má kyselina chlorná, vznikající z chloridových anionů a superoxidu působením myeloperoxidázy z azurofilních granulí polymorfonukleárů. Kyselina chlorná se využívá k zabíjení fagocytovaných mikroorganismů. Aktivace leukocytů, na které se podílejí zejména prozánětlivé cytokiny, se nazývá respirační vzplanutí.

Volné radikály se tvoří i v dýchacím řetězci na úrovni cytochromoxidázy. Monooxygenázy využívají hydroxylový radikál k hydroxylačním reakcím, např. při biosyntéze cholesterolu a žlučových kyselin nebo při detoxikaci některých xenobiotik.

Peroxid vodíku je nezbytný pro oxidaci jodidu na elementární jód, který je štítnou žlázou využit k jodaci aromatických jader tyroxinu.

Spermie vyžaduje k úspěšnému oplodnění vajíčka superoxid a peroxid vodíku. Superoxid je třeba k narušení membrány vajíčka, peroxid je vytvářen vajíčkem po oplodnění a zajišťuje tvorbu křížových vazeb mezi molekulami tyrosinu v membráně vajíčka, což zabraňuje pronikání dalších spermií.

Příznivý účinek má i oxid dusnatý, který je rovněž radikálem. Vzniká z argininu působením syntázy oxidu dusnatého např. v endoteliálních buňkách a má výrazný vazodilatační efekt. Tato látka byla původně známa jako „endotelium-derived relaxing factor“. Popsaný efekt je řízen produkcí superoxidu, který reakcí s oxidem dusnatým jeho vazodilatační účinek ruší. Oxid dusnatý má význam v regulaci imunitních pochodů, při erekci i jako neurotransmitter.

Rovněž jiné volné radikály působí jako signální molekuly. Superoxid a jiné radikály, produkované v leukocytech v malých množstvích (na rozdíl od vysoké produkce při fagocytóze), mají význam regulační. Bylo zjištěno, že ovlivňují produkci transkripčních faktorů, např. transkripčního faktoru NF- κ B, kontrolujících imunitní odpověď, ale i proliferaci buněk. (1)

3.2. *Epimedium* sp.

3.2.1. *Systematické zařazení*

Třída: Magnoliopsida

Podtřída: Magnolideae

Řád: Berberidales

Čeleď: Berberidaceae

Podčeleď: Epimedioideae

Kmen: Epimedioideae

Podkmen: Epimediinae

Rod: *Epimedium*

(3)

3.2.2. *Popis*

Rod *Epimedium* L. – škornice zahrnuje vytrvalé byliny s hlízovitě ztlustlými oddenky. Listy dlouze řapíkaté, dvakrát až třikrát trojčetné. Pupeny a báze řapíků růžově naběhlé, řapíky zdřevnatělé. Lístky přízemních listů šikmo srdčitě vejčité, pichlavě špičaté, tenké kožovité, na líci lesklé, s okrajem měkce ostnitě zubatým. Listy i větve květenství s nitkovitými, žláznatými růžovými chlupy. Květonosné lodyhy, 20-30 cm vysoké, s jedním listenem, podobným přízemním listům, zakončené řídkým hroznem. Květy čtyřčetné, dlouze stopkaté. Kalich i koruna ve dvou kruzích. Vnější kališní lístky kopinaté nebo podlouhlé, růžově naběhlé, vnitřní kališní lístky vejčité. Vnitřní korunní lístky bílé, s ostruhou, obsahující nektarium, vnější korunní lístky kosníkovitě vejčité, červené. Čtyři epipetální tyčinky s krátkými tlustými nitkami. Semeník zdánlivě jednoploidní, s dlouhou kyjovitou čnělkou. Placentace nástěnná. Plod tobolka, úzce elipsoidní, pukající nepravidelnou štěrbinou.

(4)

U nás se pěstují různé zahradní kultivary, jako jsou *Epimedium* x *rubrum* (syn.: *E. alpinum* x *E. grandiflorum*), *Epimedium* x *perralchicum* (syn.: *E. perralderianum* x *E.*

pinnatum), *Epidium x versicolor* (syn.: *E. grandiflorum x E. pinnatum*), *Epimedium x warleyense* (syn.: *E. alpinum x E. pinnatum*), *Epimedium x youngianum* (syn.: *E. diphyllum x E. grandiflorum*), *Epimedium x cantabrigense* (syn.: *E. alpinum x E. pubigerum*). (5)

3.2.3. *Obsahové látky*

Mezi hlavní obsahové látky *Epimedii herba* patří flavonoidy, alkaloidy, lignany, terpenické sloučeniny a polysacharidy. (6)

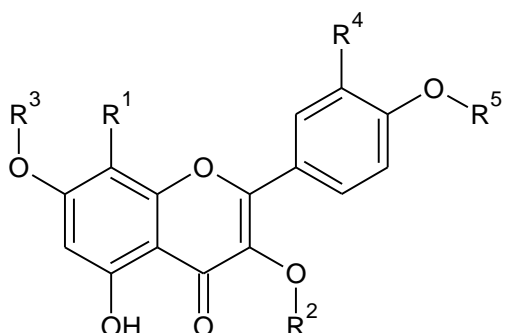
- **Flavonoidy**

Základem struktury flavonoidních glykosidů je 2-fenylbenzopyron, který se liší polohou a stupněm hydroxylace a glykosylace, stejně tak i typem a místem navázání cukru. (7)

Flavonoidy jsou uváděné jako hlavní účinné látky rodu *Epimedium* (*Berberidaceae*). Z různých druhů *Epimedium* bylo metodou HPLC (vysoce účinná chromatografie) stanoveno 15 flavonoidních glykosidů: ikariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, epimidosid C, kaempferol-3-O-rhamnosid, baohuosid I, baohuosid II, baohuosid VII, hexandrasid E, hexandrasid F, caohuosid C, sagittatosid A, sagittatosid B a 2^o-O-rhamnosyl ikarisid II. Výsledky ukázaly velké rozdíly mezi obsahem sledovaných flavonoidů. Čtyři flavonoidní glykosidy ikariin, epimedin A, epimedin B a epimedin C byly vybrány jako markery pro kontrolu kvality jednotlivých druhů škornice používaných v terapii. (8)

Přehled vzorců výše jmenovaných flavonoidů je na obr. 1.

Obrázek 1: Přehled flavonoidů z různých druhů *Epimedium*.



Glc = β -D-glukosa

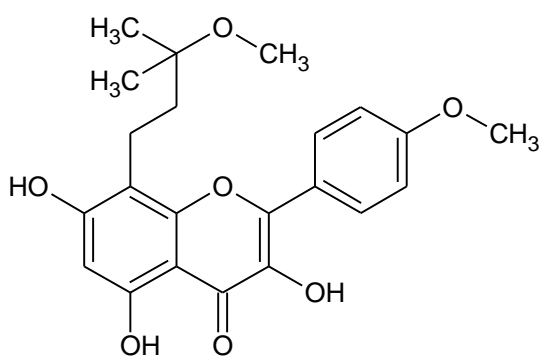
Rha = α -L-rhamnosa

Xyl = β -D-xylosa

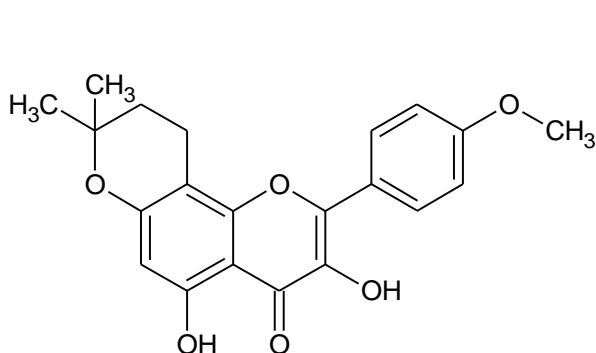
Látky	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
Hexandrasid E	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-glc	-glc	-H	-H
Kaempferol-3-O-rhamnosid	-H	-rha	-H	-H	-H
Hexandrasid F	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(3-1)glc	-glc	-H	-CH ₃
Epimedin A	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(2-1)glc	-glc	-H	-CH ₃
Epimedin B	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(2-1)xyl	-glc	-H	-CH ₃
Epimedin C	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(2-1)rha	-glc	-H	-CH ₃
Ikariin	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha	-glc	-H	-CH ₃
Epimedosid C	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-H	-glc	-H	-H
Baohuosid II	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha	-H	-H	-H
Caohuosid C	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha	-H	-OH	-CH ₃
Baohuosid VII	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(4-1)glc	-H	-H	-CH ₃
Sagittatosid A	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(2-1)glc	-H	-H	-CH ₃
Sagittatosid B	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(2-1)xyl	-H	-H	-CH ₃
2''-O-rhamnosyl ikarisid II	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(2-1)rha	-H	-H	-CH ₃
Baohuosid I	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha	-H	-H	-CH ₃

Brevikornin (obr. 2), nový flavonol, byl izolován z nadzemní části *Epimedium brevicornum*. Ze stejné rostliny byly také izolovány čtyři známé flavonoidy epimedin B, epimedin C, β -anhydroikaritin (obr. 3) a tricín (obr. 4). (9)

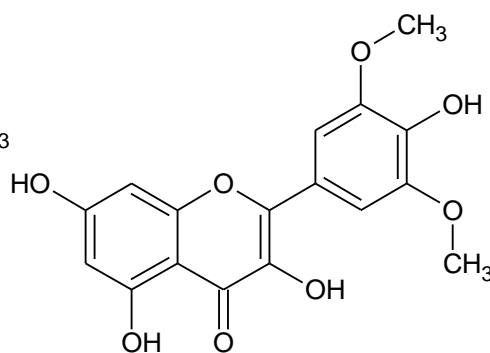
Obrázek 2: Brevikornin.



Obrázek 3: β -anhydroikaritin (flavonol).

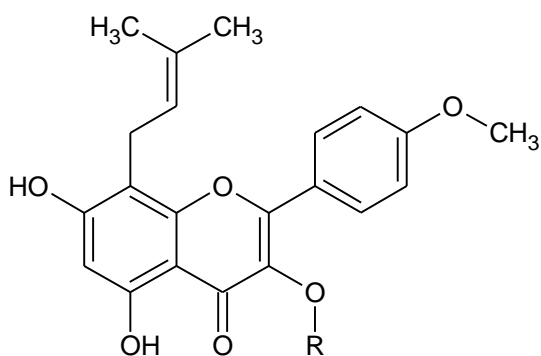


Obrázek 4: Tricin (flavon).



Ikarisid II (obr. 5) je metabolit ikariinu. Ikariin je metabolizován na ikarisid II a následně na ikaritin. Studie ukázaly, že ikariin je patrně metabolizován bakteriemi střevní mikroflóry na ikarisid II. (10)

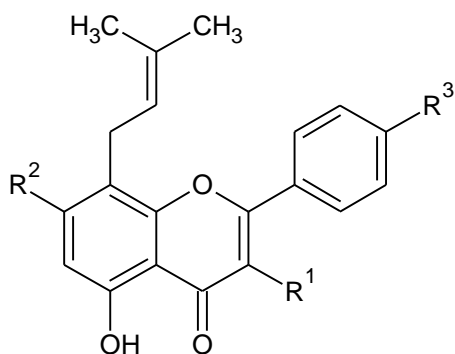
Obrázek 5: Ikarisid II.



R = α -L-rhamnosa

Ikaritin a desmethylikaritin (obr. 6) jsou aglykony ikariinu. Jsou obsaženy v listech a stoncích některých druhů rodu *Epimedium*. (6)

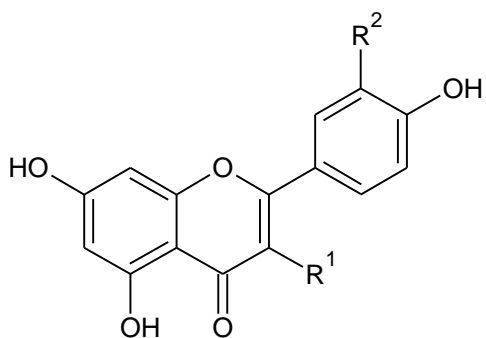
Obrázek 6: Ikariin, ikaritin a desmethylikaritin.



	R ¹	R ²	R ³
Ikariin	-O-rhamnosyl	-O-glukosyl	-OCH ₃
Ikaritin	-OH	-OH	-OCH ₃
Desmethylikaritin	-OH	-OH	-OH

K estrogenním účinkům extraktů z rodu *Epimedium* mohou přispět již známé aglykony flavonoidů, například apigenin, luteolin, kaempferol a quercetin (obr. 7). (11)

Obrázek 7: Apigenin, luteolin, kaempferol a quercetin.



	R ¹	R ²
Apigenin	-H	-H
Luteolin	-H	-OH
Kaempferol	-OH	-H
Quercetin	-OH	-OH

3.2.4. *Epimedii herba*

Epimedii herba je uvedena v čínském lékopise. Nať pochází z *Epimedium brevicornum* Maxim., *Epimedium sagittatum* Maxim., *Epimedium pubescens* Maxim., *Epimedium wushanense* T. S. Ying a *Epimedium koreanum* Nakai. Kromě nadzemních částí škornice jsou široce využívány v tradiční čínské medicíně i podzemní části, v terapii revmatické artritidy.

Epimedii herba (neboli Yinyanghuo, Horny Goat Weed) je jedna z nejznámějších a nejčastěji používaných rostlin v čínské medicíně pro její tonické, antirevmatické a afrodisiakální účinky. Okolo třiceti druhů škornice je široce rozšířeno v Číně, patnáct z nich je uváděno na trh léků používaných pod označením Yinyanghuo. (12)

Tradiční sběrači bylin (bylinkáři) nerozlišují mezi druhy *Epimedium*. Spíše používají směs druhů označených jako *Herba Epimedii*. Tyto druhy se výrazně liší koncentrací hlavních a vedlejších účinných látek. *Epimedium sp.*, stejně jako většina tradičních čínských bylin, není pěstována, ale je sbírána z volné přírody. Tím se zvyšuje riziko chybné identifikace druhu a případné rozdíly v hladině bioaktivních složek, které mohou být ovlivněny typem půdy a podnebí. (11)

Epimedii herba je v Číně běžně používaná v léčbě kardiovaskulárních chorob a dalších chronických onemocnění, a to více než 2000 let. V poslední době je *Epimedii herba* využívána v mnoha čínských preparátech proti osteoporóze. (13)

Druhy rodu *Epimedium* jsou široce používány v tradičních čínských léčích, jako je Yinyanghuo, Xianlinpi, Yangheye a Horny Goat Weed. V čínské medicíně je používáno mnoho druhů škornice. Mohou se navzájem lišit rozdílným obsahem flavonoidů a ikariinu. Proto kvalita léčivých přípravků není vždy jednoznačná. (14)

3.2.5. Účinky a použití

- **Flavonoidy z rodu *Epimedium***

Flavonoidy izolované z druhů rodu *Epimedium* jsou hlavními a farmakologicky aktivními obsahovými látkami. Dilatují koronární tepny, snižují krevní tlak a hladinu lipidů v krvi, inhibují agregaci krevních destiček, oddalují vznik trombů, zlepšují humorální a buněčnou imunitu a pozastavují stárnutí. (7)

- **Neurodegenerativní choroba**

Ikaritin má antioxidační aktivitu a estrogení účinek. Vzhledem k tradičnímu využití škornice ke zlepšení paměti se u ikaritinu předpokládá, že může působit na nervový systém, zejména u neurodegenerativního onemocnění jako je Alzheimerova nemoc. Byly provedeny pokusy na potkanech, aby se prozkoumalo, zda by mohl ikaritin chránit primární neuronové buňky před poškozením β -amyloidu. Protein β -amyloid je jeden z patogenních toxinů, které značně přispívají k rozvoji Alzheimerovy nemoci. Tato choroba je spojena s kaskádou procesů vedoucích k těžké ztrátě funkčních neuronů. Neuroprotektivní efekty ikaritinu jsou závislé také na receptorech estrogenu, které jsou formulovány v mozkových oblastech souvisejících s učením a pamětí (neokortex, hippocampus).

Estrogen, potenciálně přinesl užitek v prevenci degenerativních změn nervových buněk. O estrogenu je známo, že zvyšuje produkci acetylcholinu, snižuje produkci β -amyloidu, zlepšuje proudění krve do mozku a zachovává integritu hippocampu. Nicméně, estrogeny mají také negativní účinky. Fytoestrogeny z rodu *Epimedium* mají neuroprotektivní účinky s menšími vedlejšími účinky než estrogen. Z tohoto důvodu by mohly být využity k léčbě Alzheimerovy nemoci. (16)

Methanolické extrakty z *Epimedium koreanum* a dalších bylin (*Acorus calamus*, *Acorus gramineus*, *Bupleurm facaltum*, *Dioscorea batatas*, *Poria Cocos*, *Zizyphi jujuba*) byly používány v tradiční korejské medicíně pro zlepšení paměti a kognitivních schopností ve stáří. Při testování jejich inhibičních účinků na cholinesterázu byla pozorována významná inhibice enzymu při 200 $\mu\text{g/ml}$ extraktu z *Acorus calamus* a *Epimedium koreanum*.

Inhibitory acetylcholinesterázy (ACHE) jsou perspektivní k léčbě Alzheimerovy choroby. Alzheimerova nemoc je neurodegenerativní stav, který postihuje starší populaci a primárním znakem je ztráta paměti. (17)

- **Estrogenní účinnost**

Extrakty různých druhů rodu *Epimedium* mají silné a specifické estrogenní účinky. Tato účinnost není způsobena flavonoidními glykosidy, ale přítomností jejich aglykonů. Tyto aglykony patří do nedávno popsané třídy prenylovaných flavonoidů se silnými estrogenními vlastnostmi. Zvláště prenylované flavony vykazují na dávce závislé antiestrogenní vlastnosti v rakovinových buňkách prsu a mohou být považovány za specifické inhibitory ABCG2 (breast cancer resistant protein). Estrogenní vlastnosti spolu s antiproliferačními účinky na rakovinové buňky prsu naznačují možné využití v estrogenové substituční terapii v menopauze, ale bez negativních účinků. (11)

Studie ukázala, že hydroxylové substituenty v poloze 4' a 7 na jádře flavanu vždy nesou estrogenní aktivitu. V případě, že je v poloze 4' hydroxylová skupina nahrazena methoxylovou, je estrogenní aktivita snížena nebo eliminována. (6)

- **Ochrana před poškozením endoteliálních buněk**

U ikariinu byla potvrzena protektivní aktivita proti poškození endoteliální buněčné linie (ECV-304) lidské pupeční tepny způsobené H_2O_2 . Apoptóza endoteliálních buněk může kriticky porušit integritu endoteliální vrstvy a může tím přispět k vaskulárnímu poškození a početným patofyziologickým procesům jako je angiogeneze, ateroskleróza a trombóza.

Flavonoidy jsou přírodní antioxidanty, které vychytávají různé typy radikálů ve vodném nebo organickém prostředí. Byla prokázána jejich antioxidační aktivita oxidantem indukované endoteliální apoptózy prostřednictvím vlastní schopnosti poskytovat H^+ . (18)

U ikariinu bylo prokázáno, že by se mohl využít pro zlepšení kardiovaskulárních funkcí. Podporuje cévní funkce, stejně jako tlumí dysfunkci endotelových buněk. Zvyšuje produkci oxidu dusnatého (NO) prostřednictvím zvýšení exprese a činnosti endoteliální NO-syntázy. Tyto důkazy naznačují, že v důsledku zvýšené produkce NO ikariin působí zlepšení cévních funkcí, jako jsou cévní relaxace a ochrana. NO

produkovaný aktivací endoteliální NO-syntázy hraje důležitou roli v angiogenezi. Výsledky naznačují možnost terapeutického použití ikariinu při ischemické chorobě. (19)

- **Osteogenní účinnost**

Epimedium pubescens, uváděná v čínském lékopisu, byla používána k léčení kostních onemocnění již ve starověké Číně. Cílem jedné ze studií bylo prozkoumat osteogenní účinky ikariinu. Výsledkem studie bylo, že ikariin stimuluje proliferaci UMR-106 buněk a zvyšuje aktivitu alkalické fosfatázy v MC3T3-E1 buňkách. (20)

Za použití zvířecích modelů studie ukázaly, že po podání ikariinu byla *de novo* stimulována kostní formace a došlo k nárůstu kostní hmoty. Zvýšení kostní hmoty je spojeno s diferenciací buněk kostní dřve (stroma) a se zvýšenou expresí některých proteinů důležitých pro depozici kostní matrix. (13)

- **Antidepresivní účinnost**

Na myších samcích bylo zjištěno, že flavonoidy izolované z *Epimedium brevicornum* by mohly regulovat hladinu CRF (faktor uvolňující kortikotropin), inhibovat aktivitu monoaminoxidázy a regulovat tak hladinu monoaminových neurotransmiterů (serotonin, noradrenalin a adrenalin) při reakci na stres a depresi. Tyto výsledky naznačují, že ikariin může působit antidepresivně přes neurochemické a neuroendokrinní systémy. (21)

- **Imunita**

Polysacharid a flavon izolovaný z rodu *Epimedium* ovlivňují humorální a buněčnou imunitu kuřat a myší. Zjistilo se, že polysacharid významně podporuje proliferaci lymfocytů a zvýšení titru séra na protilátky proti virovému onemocnění kuřat (Newcastelská choroba). V posledních letech vzbudilo mnoho výzkumných zájmů využití těchto bylinných složek v rozvíjení nových pomocných látek pro lékařské a veterinární účely. (22)

- **Antikancerogenní účinky**

U ikariinu a ikaritinu, vyskytujících se v *Epimedium brevicornum* Maxim. (*Berberidaceae*), byly odhaleny jejich modulační účinky na receptor estrogenu.

Studie prokázaly vliv ikariinu a ikritinu na růst PC-3 buněk lidského karcinomu prostaty. Byla zjištěna protinádorová aktivita u ikariinu a selektivní modulační účinek na receptor estrogenu (SERM) u ikaritinu. (23)

Ikarisid inhibuje hypoxií/reoxygenací indukovanou aktivaci tyrosinkinázy a je schopen regulovat HIF-1 (hypoxia-induced factor 1). Transkripční faktor HIF-1 hraje důležitou roli v adaptačních procesech. Skládá se ze dvou podjednotek. Konstitutivní HIF-1b se váže s kyslíkem regulovanou podjednotkou HIF-1a nebo HIF-2a. Za normální koncentrace kyslíku jsou podjednotky HIF-1a a HIF-2a hydroxylovány. To umožňuje jejich průběžnou likvidaci proteazomem po vazbě na von Hippelův-Lindaův (VHL) tumor supresorový protein. Při hypoxii k hydroxylaci HIF-1a a HIF-2a nedochází. Obě podjednotky nejsou likvidovány, akumulují se a zvyšují expresi erythropoetinu.

Ikarisid II izolovaný z *Epimedium koreanum* (*Berberidaceae*) snižuje hladinu HIF-1 v HOS buňkách (buňky lidského osteosarkomu). To vede ke snížení hladiny vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), aldolasy A, enolasy 1, a glukózového transportéru 4 (Glut4). (24)

- **Použití**

Epimedium je známá tradiční léčivá bylinka používaná v Číně, Koreji a Japonsku k léčbě hepatitidy, leukopenie, neplodnosti, chronické nefritidy, osteoporózy, artritidy, bolesti v kříži, necitlivosti a slabosti končetin, astmatu, menstruační nepravidelnosti, ztrátě paměti a kardiovaskulárních problémů. (25)

Epimedium brevicornum Maxim. (*Berberidaceae*) se pěstuje jako okrasná bylinka v Asii a oblasti Středomoří a používá se v tradiční čínské medicíně pro různé léčebné účely. Použití této léčivé bylinky sahá nejméně do roku 400 našeho letopočtu. Byla používána jako tonikum pro reprodukční systém (posílení libida a léčba impotence) a na „podporu omlazování“. (26)

4. Praktická část

4.1. Rostlinný materiál

Rostlinný materiál pochází ze sběru rostlin pěstovaných v Neratově v Orlických horách. Jednalo se o listy s dlouhým stonkem zahradního hybridu *Epimedium x rubrum* (syn. *E. alpinum x E. grandiflorum*). Lístky jsem oddělila od stonku. Materiál jsem usušila volně na vzduchu a rozemlela na jemný prach.

4.2. Přístroje

Analytické váhy Kern; ultrazvuková lázeň Bendelin Sonorex; lyofilizátor MLW-LGA O5 Medizintechnik Leipzig, GDR; mikrodávkoč BIOHIT; dvoupraprskový spektrofotometr UV 1601 Shimadzu.

4.3. Chemikálie

DPPH - 1,1-difenyl-2-(2,4,6trinitrofenyl)hydrazyl, Sigma Aldrich: 0,05 g DPPH jsem rozpustila do 50,0 ml methanolu ($c=0,001\text{g/ml}$) za pomoci ultrazvukové lázně

NADH – nikotinamidnukleotid, Sigma Aldrich: 7,0 mg NADH jsem rozpustila v 10,0 ml fosforečnanového pufru.

NBT – nitrotetrazolinová modř, Sigma Aldrich: 3,30 mg NBT jsem rozpustila v 1,0 ml fosforečnanového pufru. Roztok jsem pořádně protřepala a doplnila fosforečnanovým pufrem do 50,0 ml.

PMS – 5-methylfenazanium-methyl-sulfát, Sigma Aldrich: 0,010 g PMS jsem smíchala s 1,0 ml fosforečnanového pufru. Odměřila jsem 100 μl roztoku a smíchala s dalším 1,0 ml fosforečnanového pufru. Odměřila jsem 0,250 ml roztoku a doplnila fosforečnanovým pufrem na 50,0 ml.

Roztoky DPPH, NADH, NBT a PMS jsem připravovala čerstvé v den měření. Obalením baněk alobalem jsem roztoky ochránila před světlem.

Rutin - 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4,5-dihydroxy-3-[3,4,5-trihydroxy-6-[(3,4,5-trihydroxy-6-methyl-oxan-2-yl)oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-chromen-7-on, Sigma Aldrich, c=0,5mg/ml: 0,001 g rutinu jsem rozpustila ve 2,0 ml pufru. Následně jsem udělala pět ředění zkoušeného roztoku rutinu.

Trolox - 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina, Sigma Aldrich, c=3mg/ml: 0,030 g troloxu jsem rozpustila v 10,0 ml pufru. Udělala jsem šest ředění zkoušeného roztoku troloxu.

Kyselina askorbová - 5-[-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxyfuran-2-on, Sigma Aldrich, c=1mg/ml: 0,010 g kyseliny askorbové jsem rozpustila v 10,0 ml pufru. Poté jsem udělala šest ředění zkoušeného roztoku kyseliny askorbové.

4.4. Důkaz flavonoidů – tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Příprava zkoušeného roztoku: 0,5g práškové drogy jsem extrahovala v 10,0 ml methanolu 30 minut v ultrazvukové lázni. Výluh jsem zfiltrovala, převedla do odměrné baňky a doplnila methanolem do 20,0 ml.

Na desku s vrstvou silikagelu (Silufol) jsem nanesla odděleně do pruhů po 10, 20 a 30 μ l výluhu. Silikagelovou desku jsem vložila do mobilní fáze, která se skládala z ethylacetátu, kyseliny octové, kyseliny mravenčí a vody v poměru 100:11:11:27, a nechala vyvíjet. Desku jsem usušila a postříkala roztokem bifenyloboryl-oxyethylaminu a pozorovala ji v ultrafialovém světle při vlnové délce 254 nm.

Obrázek chromatogramu je uveden v kapitole Výsledky.

4.5. Měření antiradikálové aktivity proti radikálu DPPH

Antiradikálovou aktivitu v procentech (AA) jsem vypočetla ze vztahu:

$$AA = (1 - A_{VZ}/A_{SI}) \times 100$$

AA ... antiradikálová aktivita vzorku (%)

A_{VZ} ... absorbance měřeného roztoku

A_{SI} ... absorbance kontrolního roztoku

4.5.1. Měření antiradikálové aktivity methanového extraktu

Příprava zkoušeného roztoku: 1,0 g drogy jsem smíchala s 50,0 ml methanolu a extrahovala 30 minut v ultrazvukové lázni. Poté zfiltrovala. Filtrát jsem převedla do 50,0 ml ($c=0,02\text{g/ml}$) odměrné baňky a doplnila methanolem po rysku. Pro analýzu jsem 1,0 ml tohoto výluhu převedla do odměrné baňky a doplnila methanolem do 25,0 ml ($c=0,01\text{g/ml}$).

Do odměrných baněk 5,0 ml jsem postupně odměřila 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 0,6 ml, 0,7 ml, 0,8 ml, 0,9 ml a 1,0 ml vzorku. Poté jsem do každé odměrné baňky přidala 2,0 ml roztoku DPPH a doplnila methanolem do 5,0 ml. Baňky jsem ihned umístila do temna a po 30 minutách jsem změřila absorbanci (A_{VZ}) proti methanolu. Absorbanci jsem měřila při maximální vlnové délce 517 nm.

V každém dni měření jsem provedla jednu slepou zkoušku – 0,2 ml roztoku DPPH jsem doplnila methanolem do 5,0 ml a po 30 minutách v temnu jsem změřila absorbanci (A_{SI}) tohoto kontrolního roztoku proti methanolu.

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 1 – 3 a grafech č. 1 – 4.

4.5.2. Měření antiradikálové aktivity vodného extraktu

Příprava extraktu drogy: 5,0 g drogy jsem zalila 500,0 ml vroucí vody a roztok nechala luhovat 30 minut. Výluh jsem zfiltrovala přes Büchnerovu nálevku a převedla do 500,0 ml odměrné baňky. 450,0 ml výluhu bylo vysušeno lyofilizací. 0,02 g suchého extraktu jsem rozpustila ve 25,0 ml methanolu ($c=0,008\text{g/ml}$). Do odměrných baněk 5,0 ml jsem postupně odměřila 0,1 ml, 0,15 ml, 0,2 ml, 0,25 ml, 0,3 ml, 0,35 ml, 0,4 ml a 0,45 ml vzorku. Poté jsem do každé baňky přidala 2,0 ml roztoku DPPH a doplnila methanolem do 5,0 ml. Baňky jsem pak umístila do temna a po 30 minutách jsem změřila absorbanci (A_{VZ}) proti methanolu. Absorbanci jsem měřila při maximální vlnové délce 517 nm. V každém dni měření jsem provedla jednu slepou zkoušku.

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 4 – 6 a grafech č. 5 – 8.

4.6. Metoda měření antioxidační aktivity vůči superoxidu

4.6.1. *Antioxidační aktivita extraktu drogy*

Příprava fosforečnanového pufru (KH_2PO_4 , pH 7,4): 2,6 g KH_2PO_4 jsem rozpustila ve vodě do 1000,0 ml. Pomocí pH metru jsem pH upravila na 7,4 přidáním 1,0 M roztoku hydroxidu draselného.

Příprava NADH: 7,0 mg NADH jsem rozpustila v 10,0 ml fosforečnanového pufru.

Příprava NBT: 3,300 mg NBT jsem rozpustila v 1,0 ml fosforečnanového pufru. Roztok jsem pořádně protřepala a doplnila fosforečnanovým pufrem do 50,0 ml

Příprava PMS: 0,010 g PMS jsem smíchala s 1,0 ml pufru. Odměřila jsem 100 μl roztoku a smíchala s dalším 1,0 ml fosforečnanovým pufrem. Odměřila jsem 0,250 ml roztoku a doplnila fosforečnanovým pufrem na 50,0 ml

Příprava kontrolního roztoku: Do kyvety jsem připravila slepý roztok smícháním 150 μl pufru, 150 μl NADH, 450 μl NBT a 150 μl pufru. Následně jsem v druhé kyvetě připravila kontrolní roztok smícháním 150 μl pufru, 150 μl NADH, 450 μl NBT a 150 μl PMS. Absorbanci kontrolního roztoku jsem měřila proti slepému roztoku při maximální vlnové délce 560 nm.

Příprava zkoušeného roztoku: 0,020 g suchého extraktu drogy jsem rozpustila do 4,0 ml pufru. Slepý vzorek jsem připravila smícháním 150 μl pufru, 150 μl NADH, 450 μl NBT a 150 μl pufru. Následně jsem připravila zkoušený roztok smícháním 150 μl vzorku, 150 μl NADH, 450 μl NBT a 150 μl PMS. Absorbanci zkoušeného roztoku jsem měřila při maximální vlnové délce 560 nm proti slepému roztoku.

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 7 – 9 a grafech č. 9 – 12.

4.6.2. *Antioxidační aktivita standardů – rutinu, troloxu a kyseliny askorbové*

Příprava kontrolního roztoku: Do kyvety jsem připravila slepý roztok smícháním 150 μl pufru, 150 μl NADH, 450 μl NBT a 150 μl pufru. Následně jsem v druhé kyvetě připravila kontrolní roztok smícháním 150 μl pufru, 150 μl NADH, 450 μl

NBT a 150 μ l PMS. Absorbanci kontrolního roztoku jsem měřila proti slepému roztoku při maximální vlnové délce 560 nm.

Příprava roztoku rutinu: 0,001 g rutinu jsem rozpustila ve 2,0 ml pufru. Následně jsem udělala pět ředění zkoušeného roztoku rutinu.

Příprava standardu – trolox: 0,030 g troloxu jsem rozpustila v 10,0 ml pufru. Udělala jsem šest ředění zkoušeného roztoku troloxu.

Příprava standardu – kyselina askorbová: 0,010 g kyseliny askorbové jsem rozpustila v 10,0 ml pufru. Poté jsem udělala šest ředění zkoušeného roztoku kyseliny askorbové.

Slepý vzorek jsem připravila odměřením 150 μ l pufru, 150 μ l NADH, 450 μ l NBT a 150 μ l pufru. Následně jsem připravila zkoušený roztok smícháním 150 μ l vzorku, 150 μ l NADH, 450 μ l NBT a 150 μ l PMS. Absorbanci zkoušeného roztoku jsem měřila při maximální vlnové délce 560 nm proti slepému roztoku.

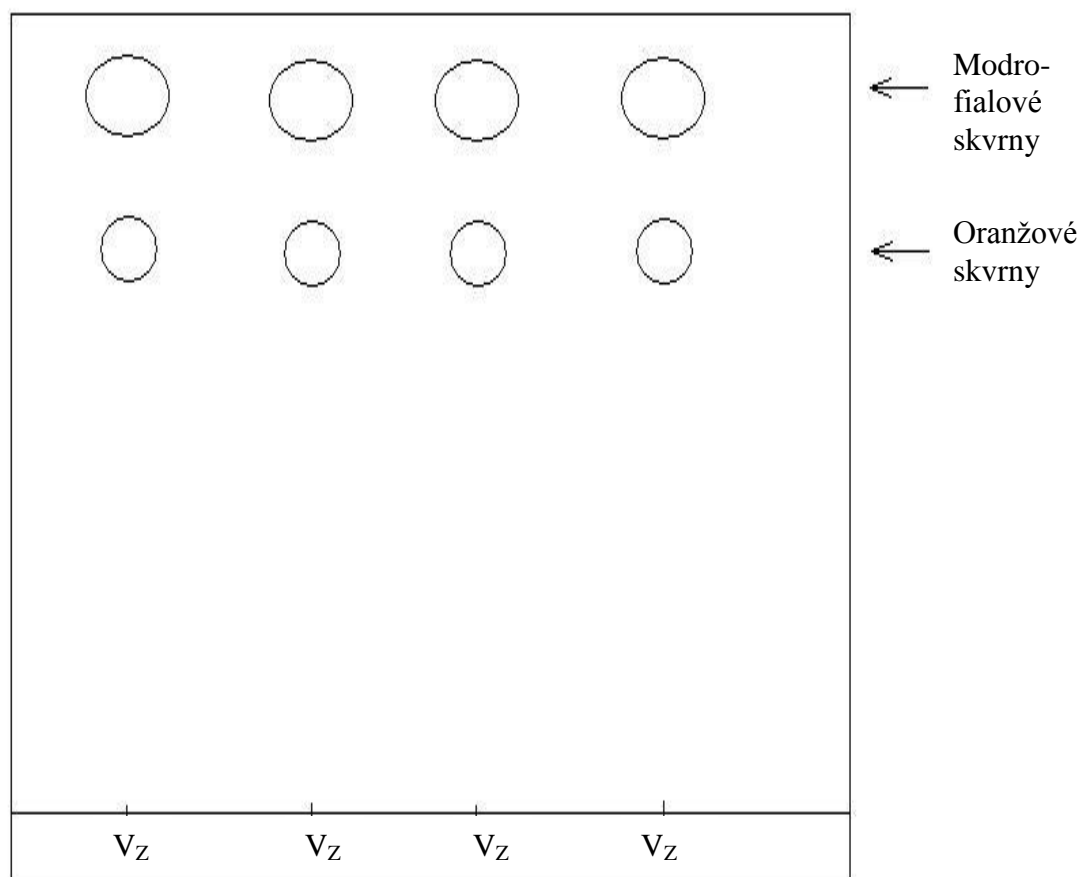
Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 10 – 12 a grafech č. 13 – 16.

5. Výsledky

5.1. Tenkovrstvá chromatografie

Na desce Silufol UV 254 jsem po detekci činidlem a pod ultrafialovým světlem pozorovala dvě skvrny. Oranžové skvrny – $R_F = 0,64$ a modrofialové skvrny – $R_F = 0,81$ (obr. 8). Látka $R_F = 0,64$ je flavonoid, k dispozici však nebyly příslušné standardy.

Obrázek 8: TLC chromatogram – oddělené modrofialové ($R_F = 0,81$) a oranžové skvrny ($R_F = 0,64$).



5.2. Tabulky a grafy

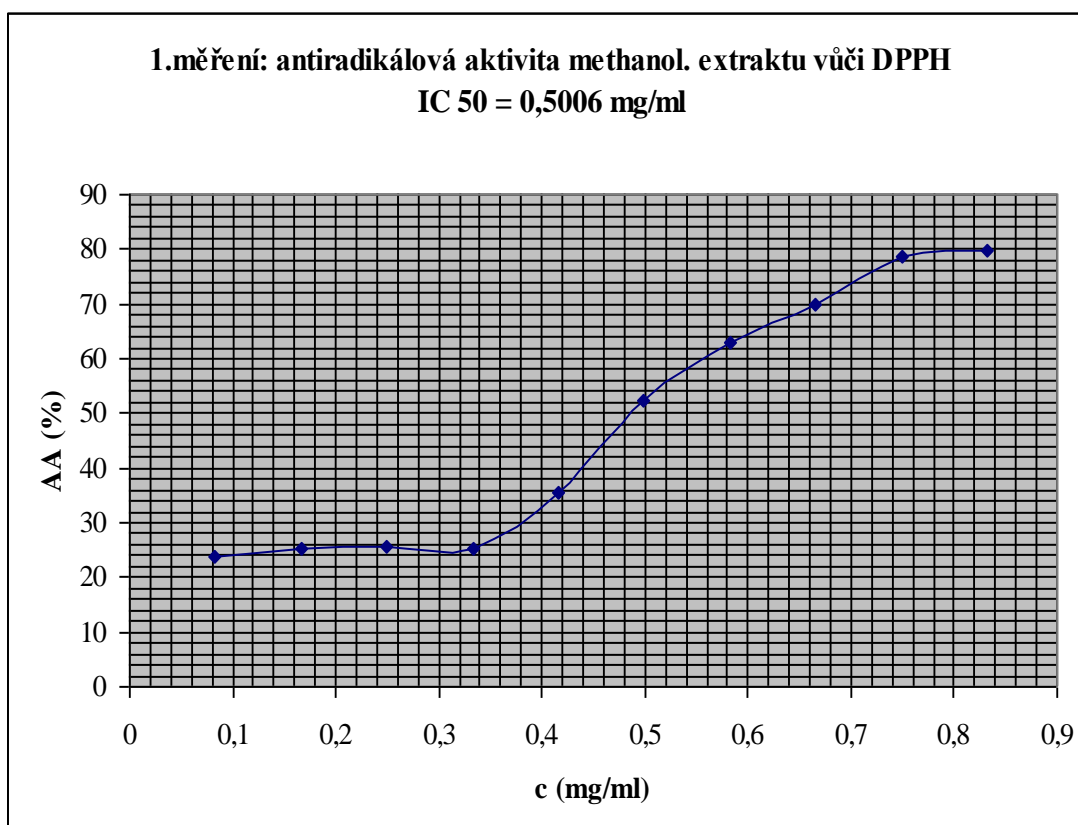
Tabulka č.1: Stanovení antiradikálové aktivity methanolového extraktu drogy proti radikálu DPPH.

1.měření: antirad. aktivita methanol. extraktu vůči DPPH			
roztok (ml)	A	c (mg/ml)	AA (%)
0,1	0,685	0,0832	23,8
0,2	0,671	0,1664	25,36
0,3	0,668	0,2496	25,7
0,4	0,669	0,3328	25,28
0,5	0,581	0,416	35,37
0,6	0,427	0,4992	52,5
0,7	0,333	0,5824	62,96
0,8	0,27	0,6656	69,97
0,9	0,192	0,7488	78,64
1	0,183	0,832	79,64

Absorbance kontrolního roztoku: $A_{sl}=1,067$

Navážka: 1,040g

Graf č.1: Závislost antiradikálové aktivity (%) na koncentraci methanolového extraktu drogy.



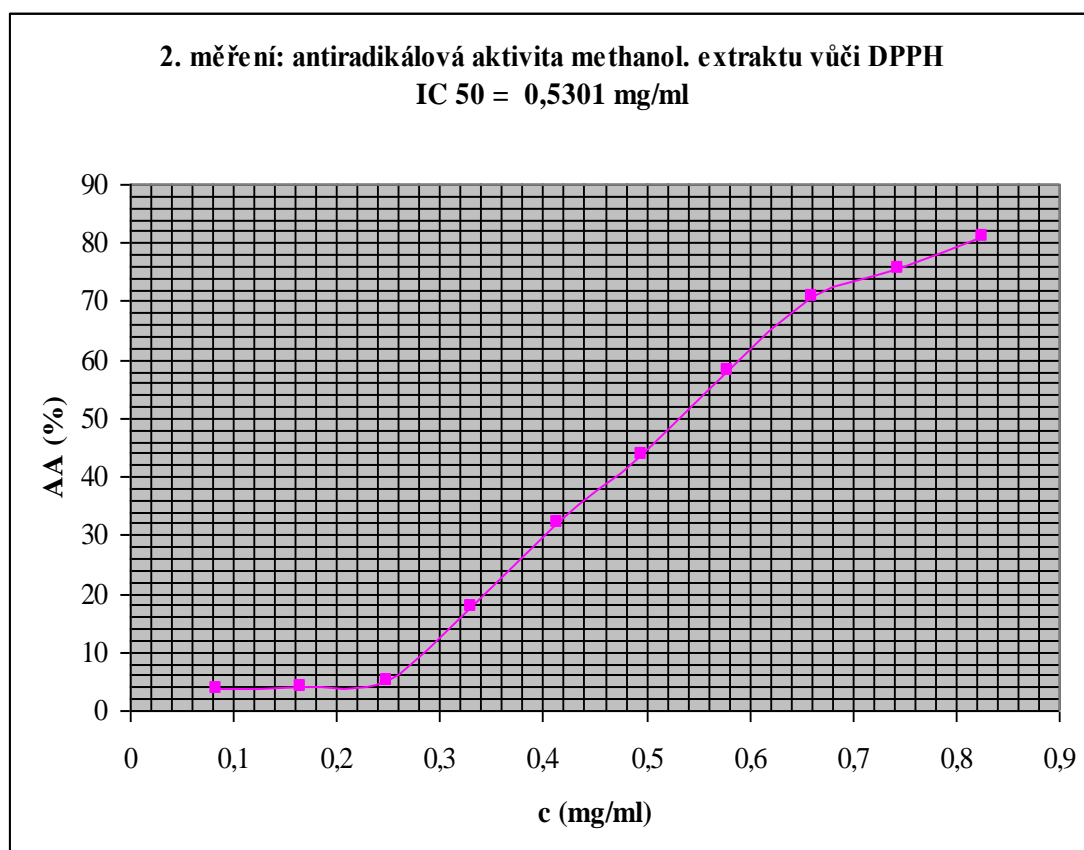
Tabulka č.2: Stanovení antiradikálové aktivity methanolového extraktu drogy proti radikálu DPPH.

2. měření: antiradik. aktivita methanolového extraktu vůči DPPH			
roztok (ml)	A	c (mg/ml)	AA (%)
0,1	0,701	0,0826	3,71
0,2	0,698	0,1652	4,12
0,3	0,69	0,2479	5,22
0,4	0,598	0,3305	17,86
0,5	0,495	0,4131	32,01
0,6	0,408	0,4957	43,96
0,7	0,304	0,5784	58,24
0,8	0,213	0,661	70,74
0,9	0,177	0,7436	75,69
1	0,138	0,8262	81,04

Absorbance kontrolního roztoku: $A_{sl}=0,728$

Navážka: 1,0328g

Graf č.2: Závislost antiradikálové aktivity (%) na koncentraci methanolového extraktu drogy.



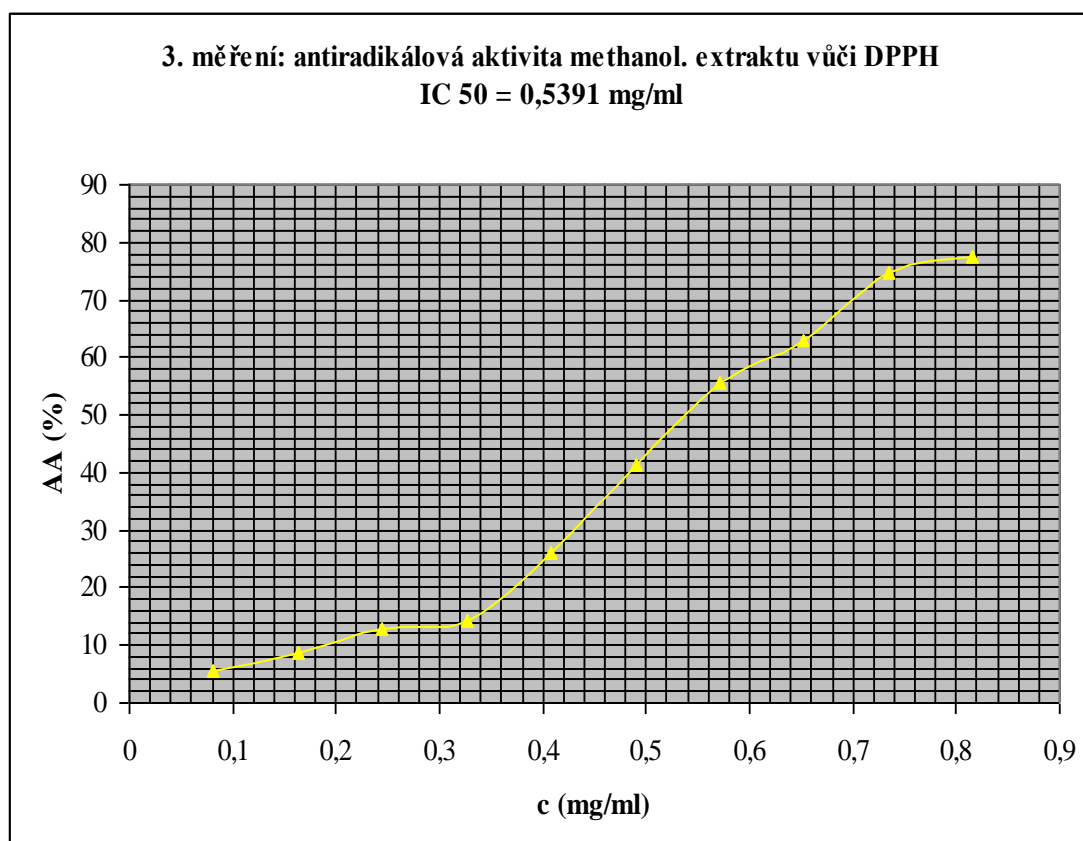
Tabulka č.3: Stanovení antiradikálové aktivity methanolvého extraktu drogy proti radikálu DPPH.

3. měření: antiradik. aktivita methanolvého extraktu vůči DPPH			
roztok (ml)	A	c (mg/ml)	AA (%)
0,1	0,624	0,0816	5,45
0,2	0,603	0,1632	8,64
0,3	0,574	0,2448	13,03
0,4	0,565	0,3264	14,39
0,5	0,487	0,408	26,21
0,6	0,388	0,4896	41,21
0,7	0,293	0,5711	55,61
0,8	0,246	0,6527	62,73
0,9	0,166	0,7343	74,85
1	0,149	0,8159	77,42

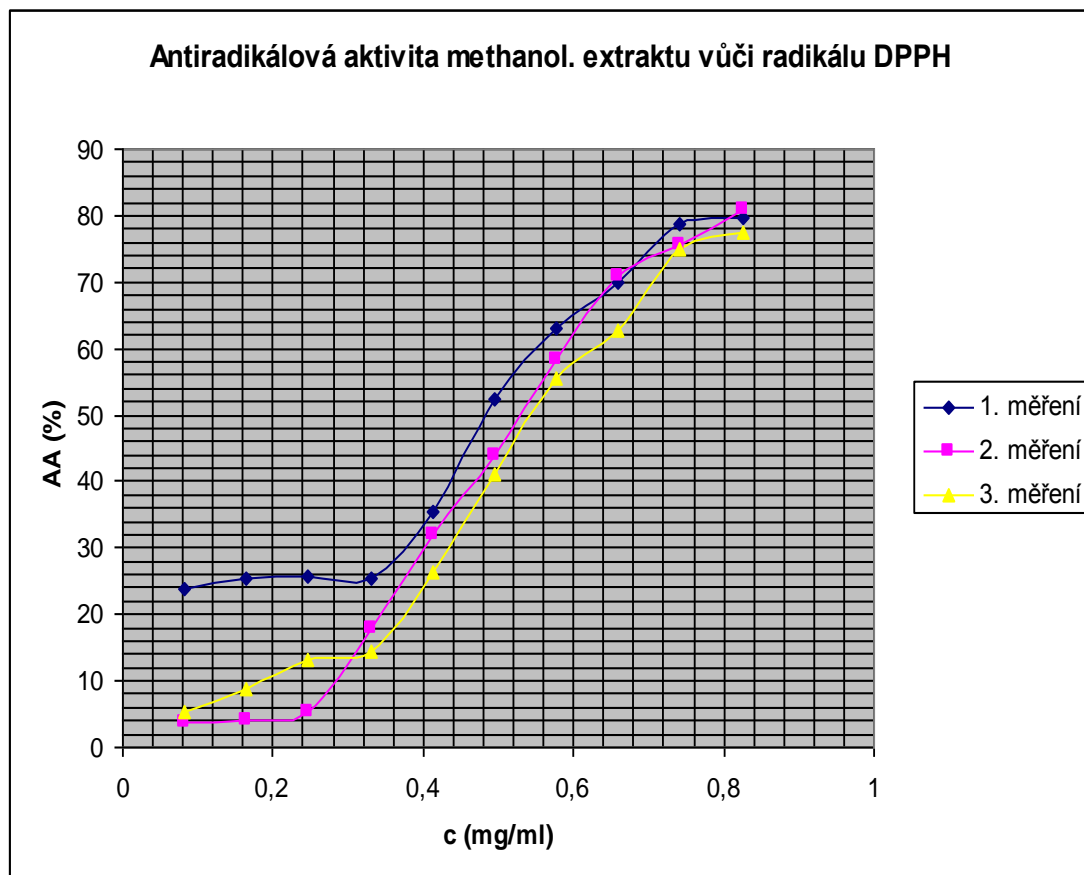
Absorbance kontrolního roztoku: $A_{sl}=0,660$

Navážka: 1,0199g

Graf č.3: Závislost antiradikálové aktivity (%) na koncentraci methanolvého extraktu drogy.



Graf č.4: Závislost antiradikálové aktivity (%) na koncentraci methanolového extraktu drogy jednotlivých měření.

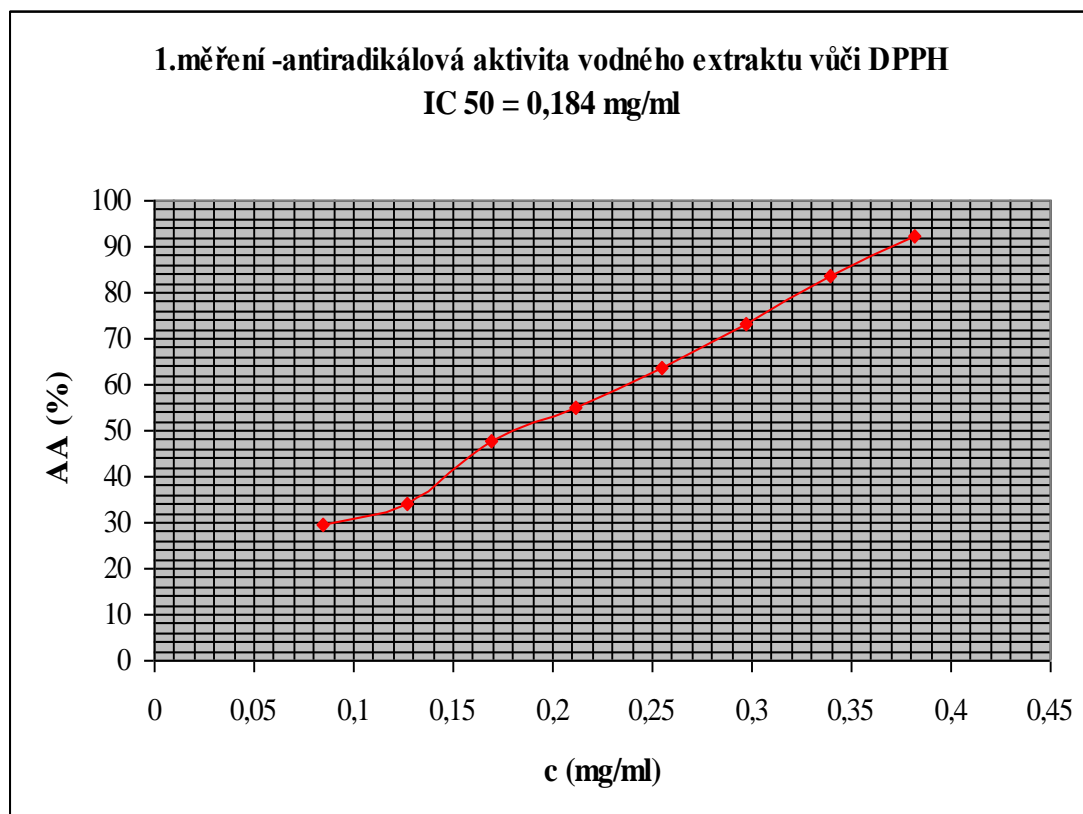


Tabulka č.4: Stanovení antiradikálové aktivity vodného extraktu drogy proti radikálu DPPH.

1. měření – antirad. aktvita vodného extraktu vůči DPPH			
roztok (ml)	A	c (mg/ml)	AA (%)
0,1	0,826	0,0848	29,46
0,15	0,771	0,1272	34,16
0,2	0,61	0,1696	47,91
0,25	0,528	0,212	54,91
0,3	0,424	0,2544	63,79
0,35	0,316	0,2968	73,01
0,4	0,189	0,3392	83,86
0,45	0,089	0,3816	92,4

Absorbance kontrolního roztoku: $A_{sl}=1,171$
 Navážka: 0,0212 g

Graf č.5: Závislost antiradikálové aktivity (%) na koncentraci vodného extraktu drogy.

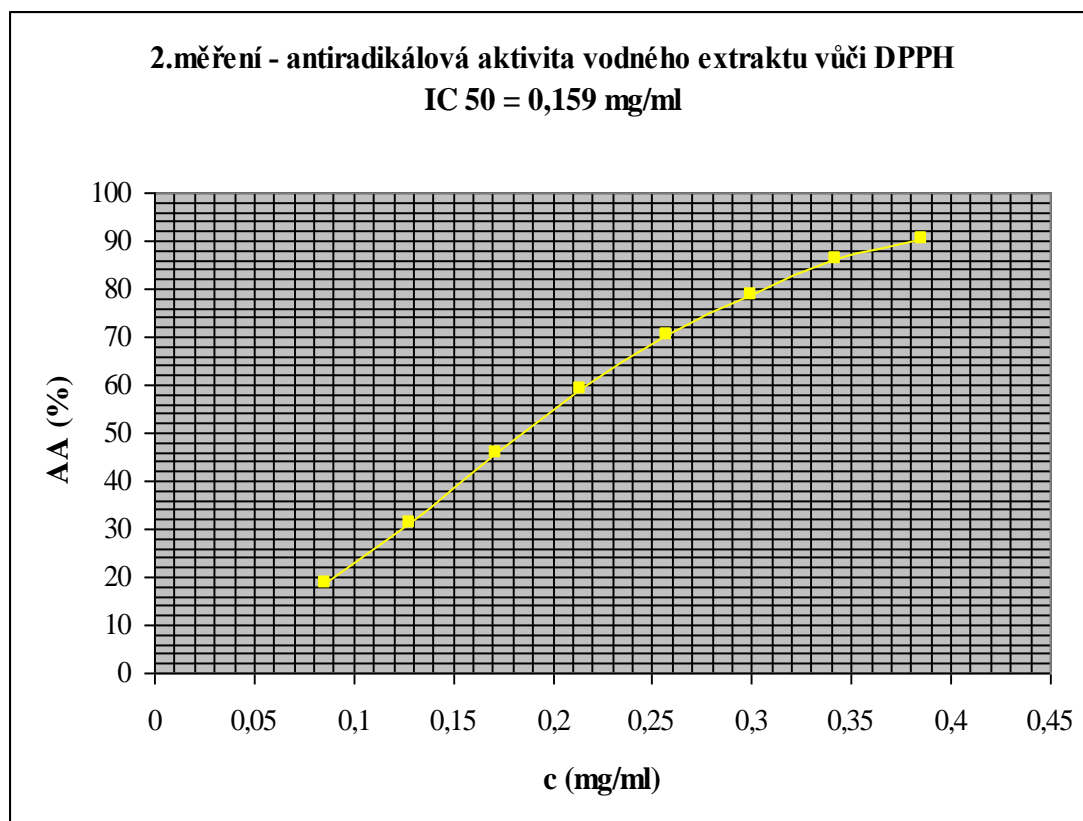


Tabulka č.5: Stanovení antiradikálové aktivity vodného extraktu drogy proti radikálu DPPH.

2. měření – antirad. aktivita vodného extraktu vůči DPPH			
roztok (ml)	A	c (mg/ml)	AA (%)
0,1	0,824	0,0856	18,9
0,15	0,7	0,1284	31,1
0,2	0,55	0,1712	45,87
0,25	0,416	0,214	59,06
0,3	0,302	0,2568	70,28
0,35	0,217	0,2996	78,64
0,4	0,14	0,3424	86,22
0,45	0,098	0,3852	90,35

Absorbance kontrolního roztoku: $A_{sl}=1,016$
 Navážka: 0,0214 g

Graf č.6: Závislost antiradikálové aktivity (%) na koncentraci vodného extraktu drogy.



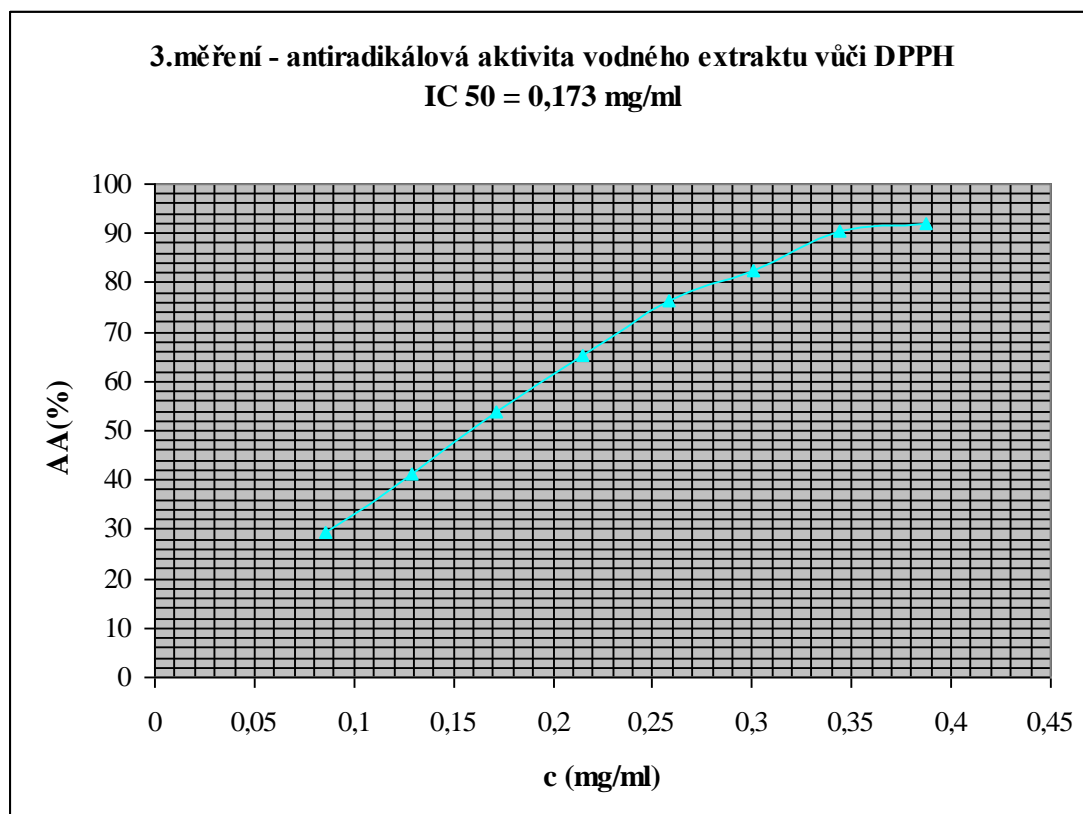
Tabulka č.6: Stanovení antiradikálové aktivity vodného extraktu drogy proti radikálu DPPH.

3.měření – antirad. aktivita vodného extraktu vůči DPPH			
roztok (ml)	A	c (mg/ml)	AA (%)
0,1	0,81	0,086	29,26
0,15	0,674	0,129	41,14
0,2	0,53	0,172	53,71
0,25	0,399	0,215	65,15
0,3	0,269	0,258	76,51
0,35	0,199	0,301	82,62
0,4	0,11	0,344	90,39
0,45	0,093	0,387	91,88

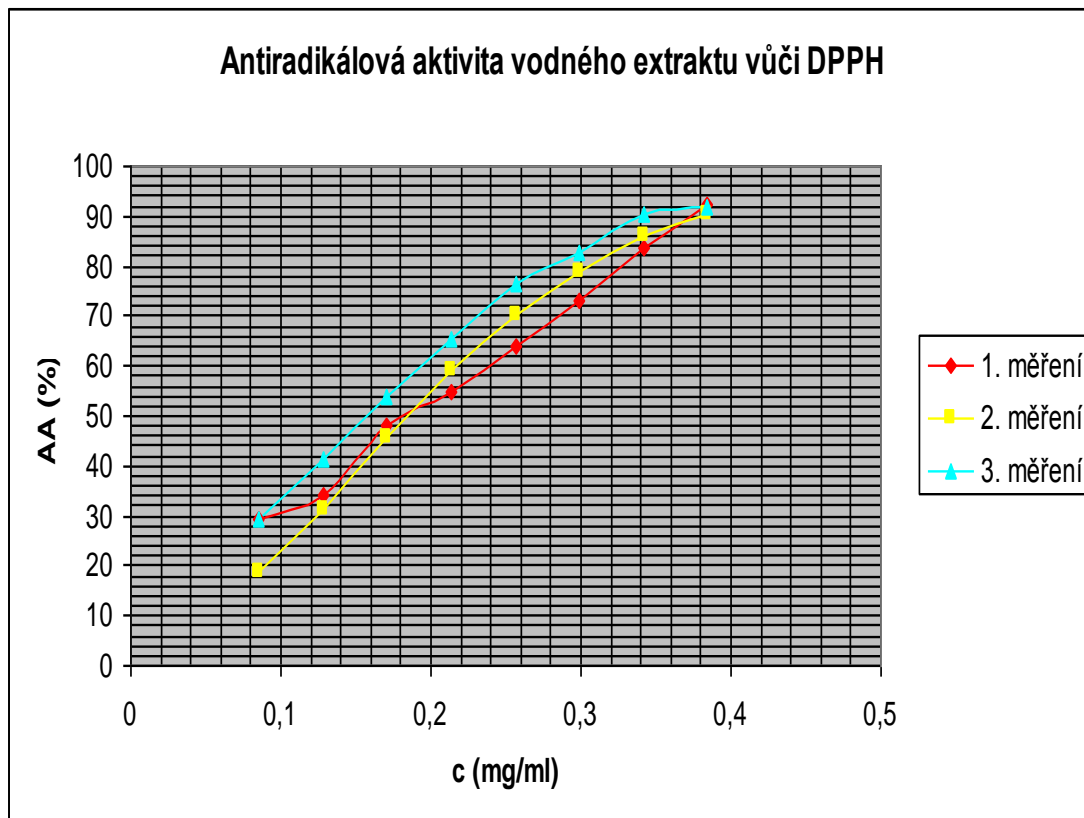
Absorbance kontrolního roztoku: $A_{sl}=1,145$

Navážka: 0,0215 g

Graf č.7: Závislost antiradikálové aktivity (%) na koncentraci vodného extraktu drogy.



Graf č.8: Závislost antiradikálové aktivity (%) na koncentraci vodného extraktu drogy jednotlivých měření.

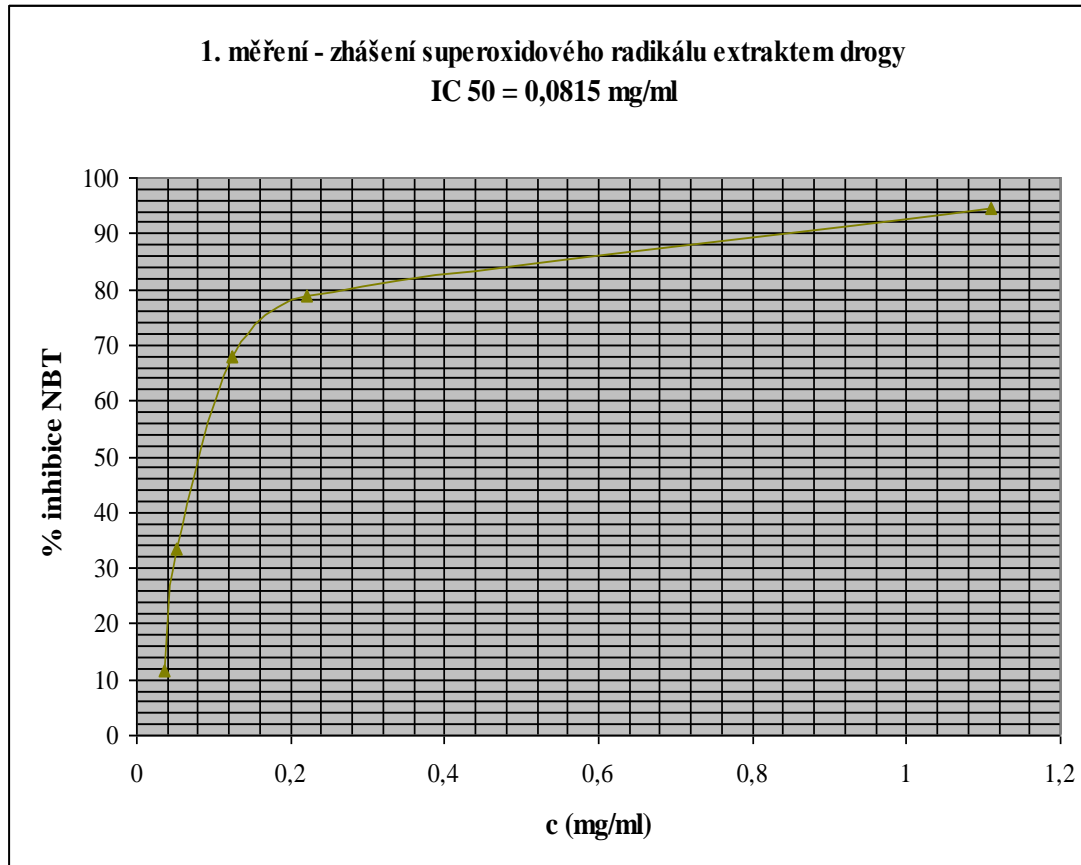


Tabulka č.7: Zhášení superoxidového radikálu extraktem drogy.

1. měření - zhášení superoxid. radikálu extraktem drogy						
c (mg/ml)	c' (μg/150μl)	A ₁	A ₂	A ₃	průměr A	% inhibice NBT
1,11	166,5	0,0074	0,0087	0,0089	0,0083	94,64
0,222	33,3	0,0288	0,0344	0,035	0,0327	78,93
0,1233	18,5	0,0507	0,0488	0,0501	0,0499	67,9
0,0528	7,9	0,1005	0,1073	0,1029	0,1036	33,33
0,0358	5,4	0,133	0,1468	0,1323	0,1374	11,55
Kontrola		0,1609	0,1546	0,1505	0,1553	

Navážka: 0,0222 g

Graf č.9: Závislost inhibice NBT (%) na koncentraci extraktu drogy.

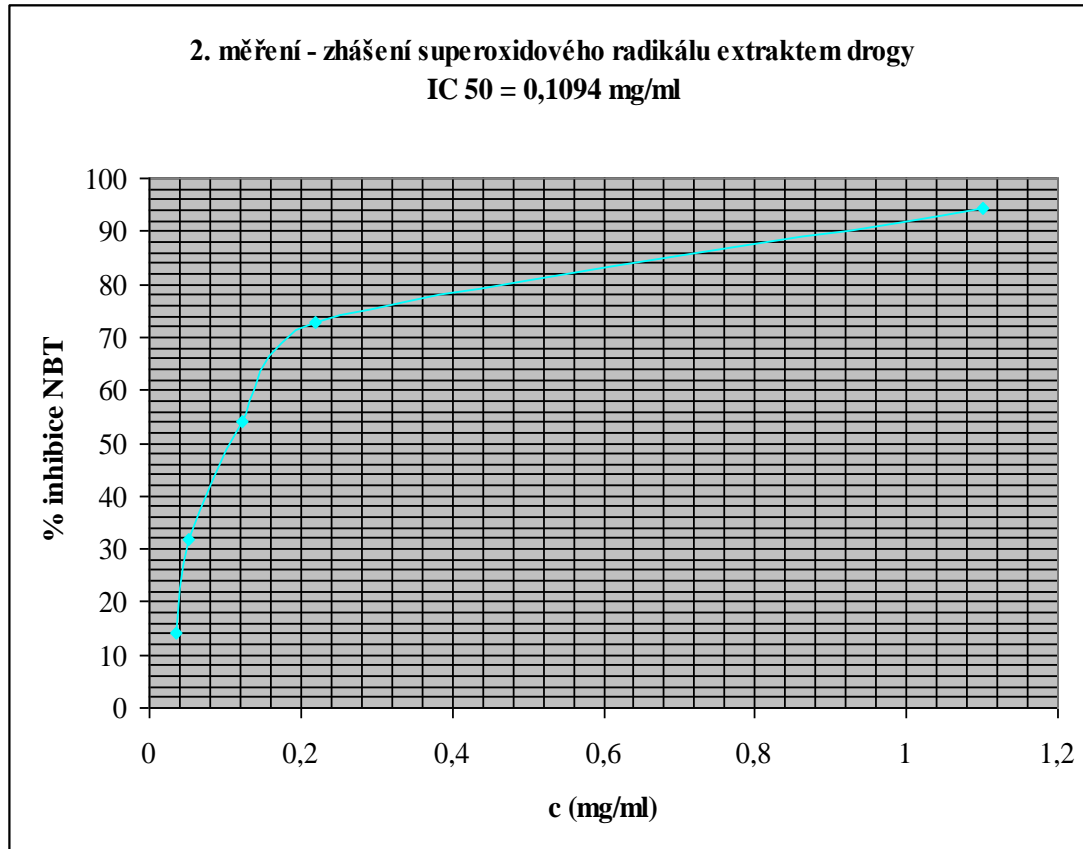


Tabulka č.8: Zhášení superoxidového radikálu extraktem drogy.

2. měření - zhášení superoxid. radikálu extraktem drogy						
c (mg/ml)	c' (μg/150μl)	A ₁	A ₂	A ₃	průměr A	% inhibice NBT
1,1	165	0,0105	0,0095	0,0103	0,0101	94,23
0,22	33	0,0486	0,0457	0,0484	0,0476	72,81
0,1222	18,3	0,0817	0,0797	0,0803	0,0806	53,94
0,0524	7,9	0,1175	0,1194	0,1205	0,1191	31,9
0,0355	5,3	0,1498	0,1567	0,1441	0,1502	14,14
Kontrola		0,1743	0,1738	0,1767	0,1749	

Navážka: 0,0220 g

Graf č.10: Závislost inhibice NBT (%) na koncentraci extraktu drogy.

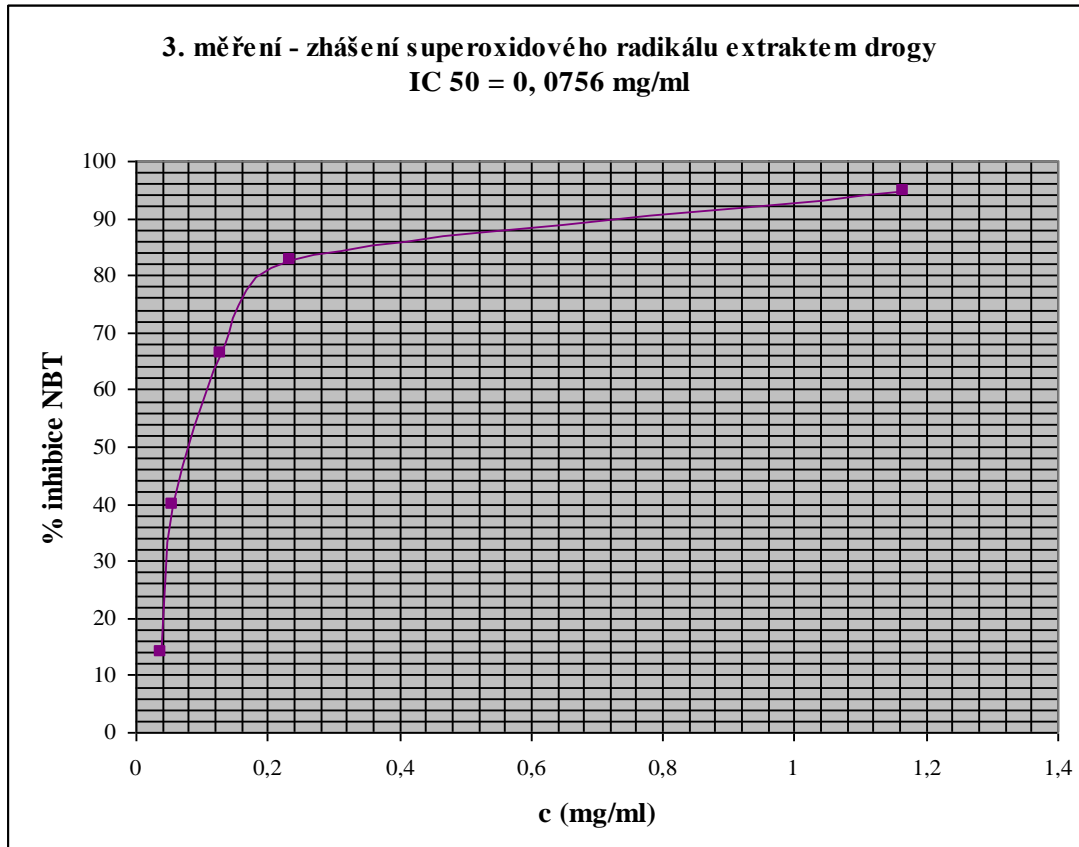


Tabulka č.9: Zhášení superoxidového radikálu extraktem drogy.

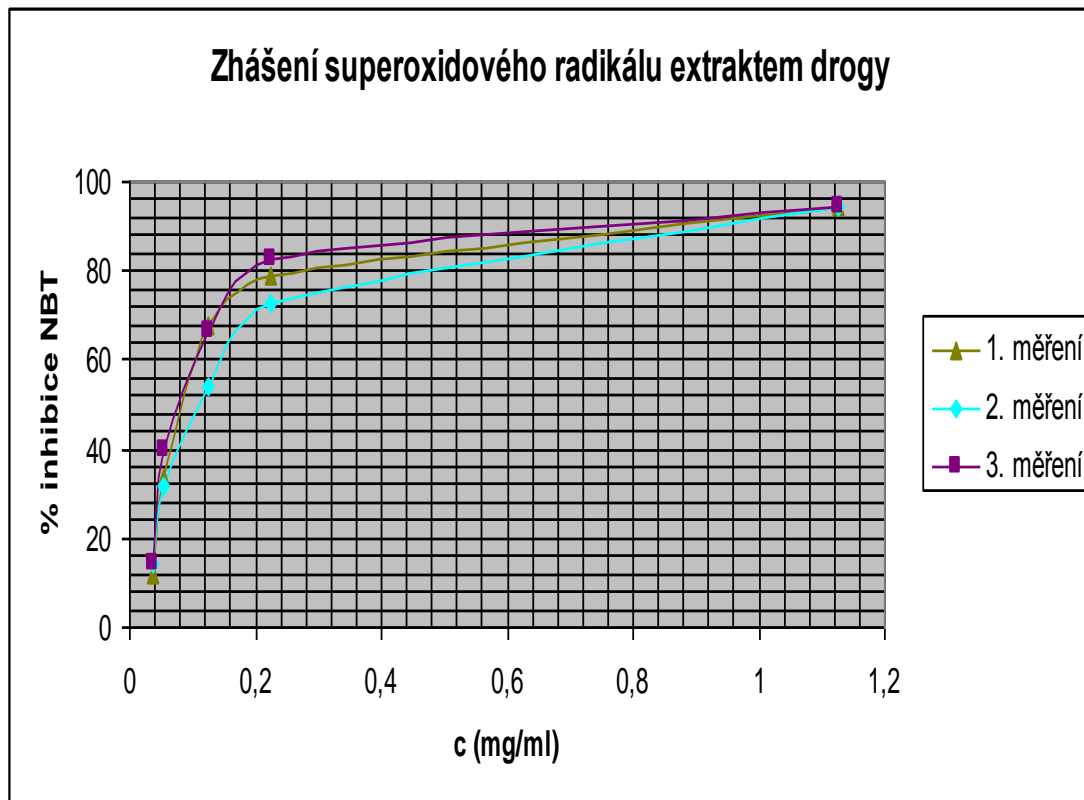
3. měření - zhášení superoxid. radikálu extraktem drogy						
c (mg/ml)	c' (μg/150μl)	A ₁	A ₂	A ₃	průměr A	% inhibice NBT
1,165	174,8	0,0075	0,0087	0,0076	0,0079	94,71
0,233	34,9	0,0275	0,028	0,0222	0,0259	82,73
0,1294	19,4	0,0501	0,0514	0,0503	0,0506	66,25
0,0555	8,3	0,1003	0,0867	0,0836	0,0902	39,84
0,0376	5,6	0,1303	0,1279	0,1283	0,1288	14,02
Kontrola		0,1473	0,1552	0,1473	0,1499	

Navážka: 0,0233 g

Graf č.11: Závislost inhibice NBT (%) na koncentraci extraktu drogy.



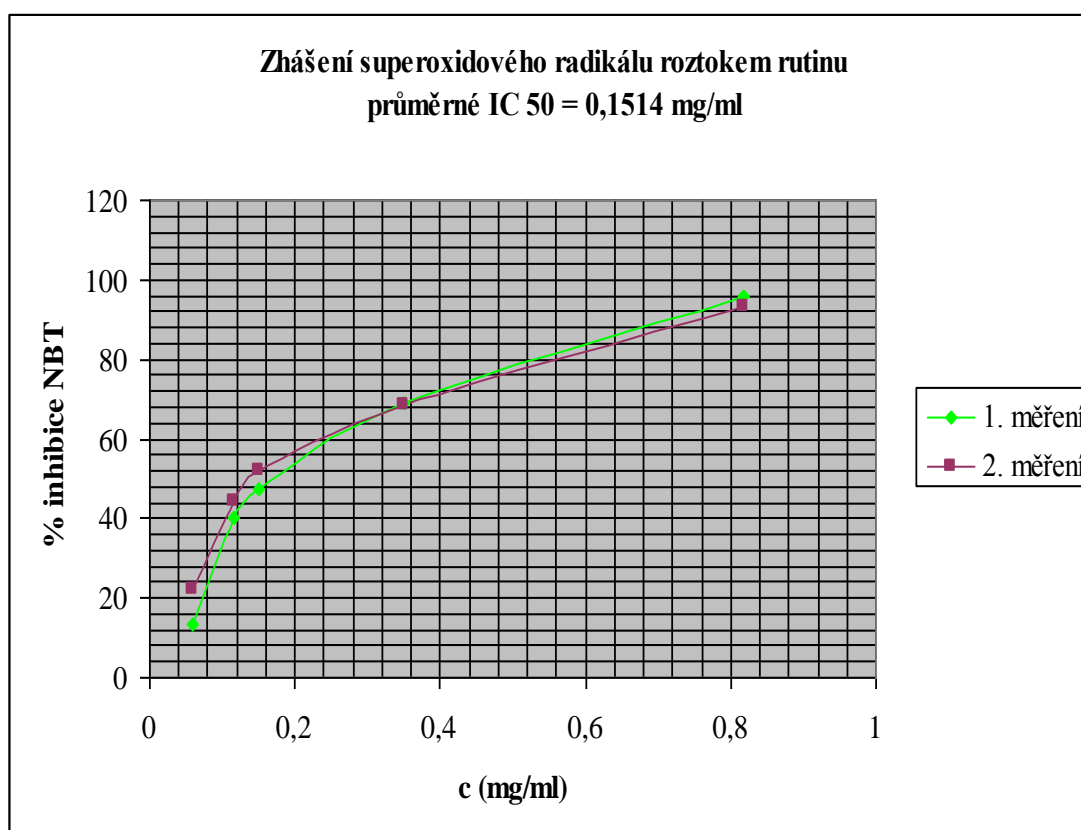
Graf č.12: Závislost inhibice NBT (%) na koncentraci extraktu drogy jednotlivých měření.



Tabulka č.10: Výsledky zhášení superoxidového radikálu – rutin.

Rutin		1. navážka: 0,0015 g		2. navážka: 0,0016 g	
c (mg/ml)	c' (µg/150µl)	A ₁	%NBT1	A ₂	%NBT2
0,8167	122,505	0,005	95,95	0,0097	93,01
0,35	52,5	0,0382	69,04	0,0437	68,49
0,15	22,5	0,0647	47,57	0,0662	52,27
0,1167	17,505	0,0736	40,36	0,0772	44,34
0,0583	8,745	0,1071	13,21	0,1078	22,28
Kontrola		A _{kontr.} =0,1234		A _{kontr.} =0,1387	

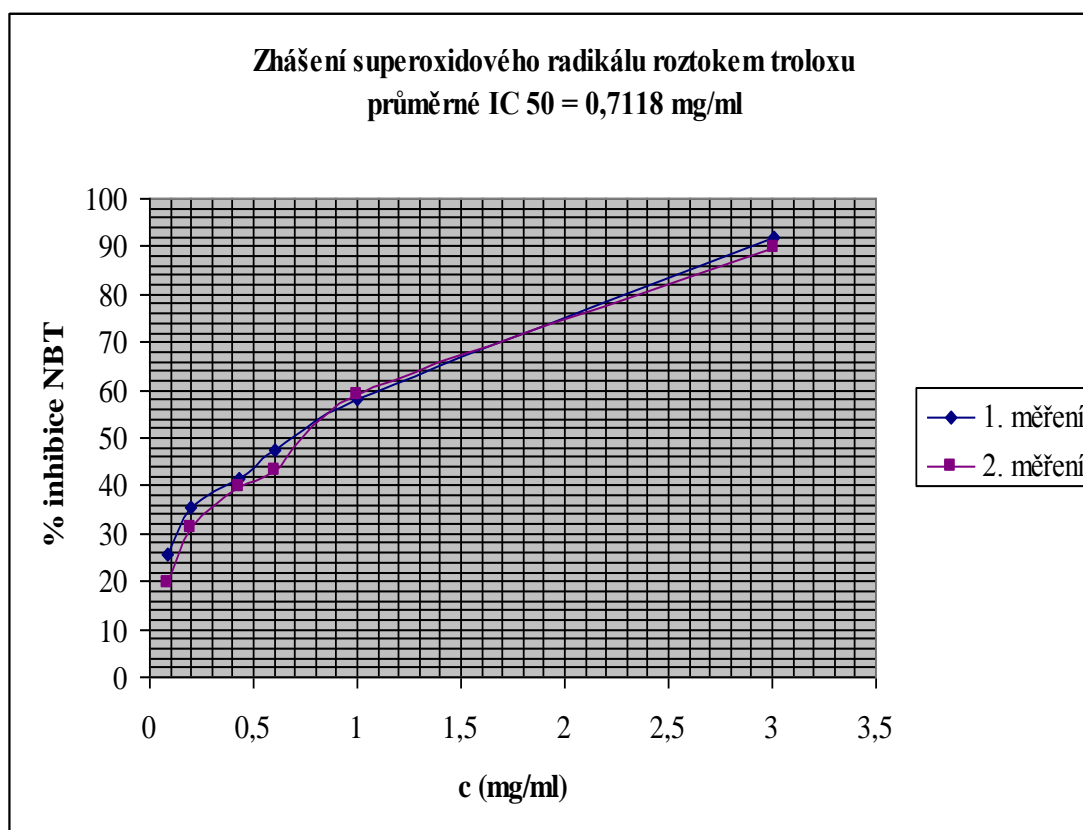
Graf č.13: Závislost inhibice NBT (%) na koncentraci roztoku rutinu.



Tabulka č.11: Zhášení superoxidového radikálu – trolox.

Trolox		1. navážka: 0,0301 g		2. navážka: 0,0301 g	
c (mg/ml)	c' (µg/150µl)	A ₁	%NBT1	A ₂	%NBT2
3,01	451,5	0,0062	91,84	0,0101	89,8
1,003	150,5	0,0319	58,03	0,0408	58,79
0,602	90,3	0,0401	47,24	0,0563	43,13
0,43	64,5	0,0446	41,32	0,0595	39,9
0,2006	30,09	0,0492	35,26	0,0681	31,21
0,086	12,9	0,0565	25,66	0,0797	19,49
Kontrola		A _{kontr.} =0,076		A _{kontr.} =0,099	

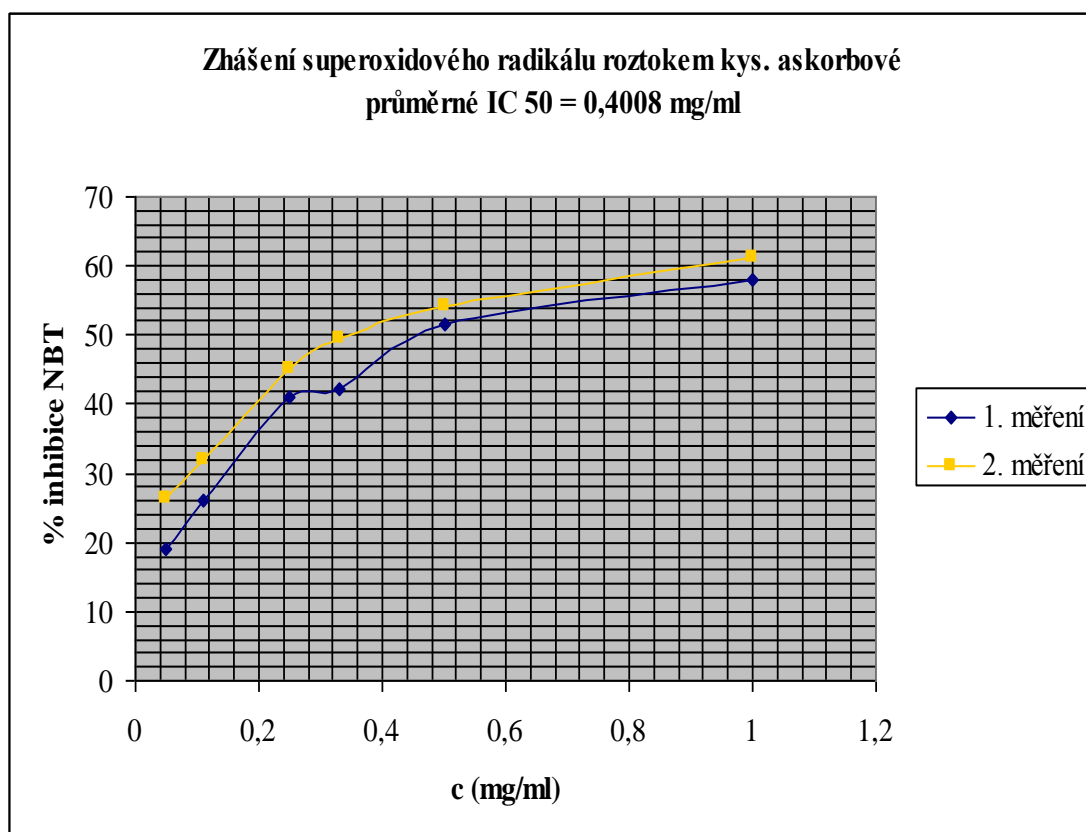
Graf č.14: Závislost inhibice NBT (%) na koncentraci roztoku troloxu.



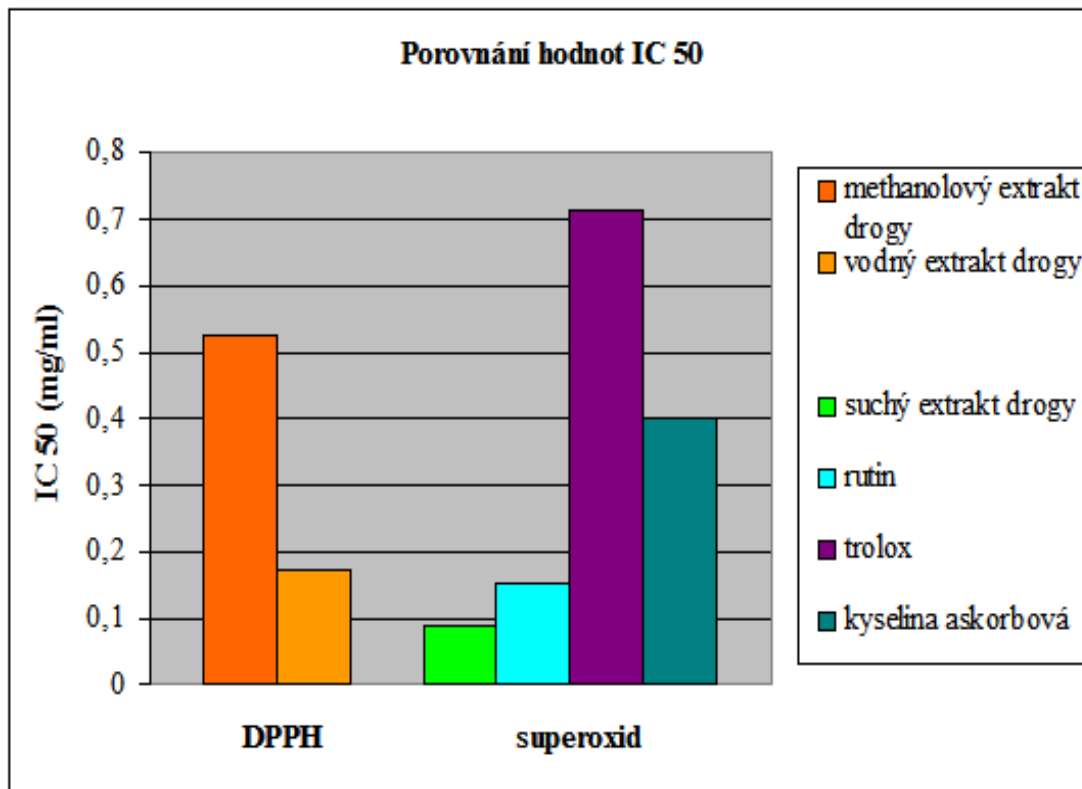
Tabulka č.12: Zhášení superoxidového radikálu – kyselina askorbová.

Kyselina askorbová		1. navážka: 0,0100 g		2. navážka: 0,0108 g	
c (mg/ml)	c' (μg/150μl)	A ₁	%NBT1	A ₂	%NBT2
1	150	0,0625	58	0,0489	61,31
0,5	75	0,0723	51,41	0,0579	54,19
0,33	50	0,0859	42,27	0,064	49,37
0,25	37,5	0,0879	40,93	0,0693	45,17
0,11	16,5	0,1099	26,14	0,086	31,96
0,05	7	0,1203	19,15	0,0932	26,27
Kontrola		A _{kontr.} =0,1488		A _{kontr.} =0,1264	

Graf č.15: Závislost inhibice NBT (%) na koncentraci roztoku kyseliny askorbové.



Graf č. 16: Porovnání hodnot IC 50 při měření antiradikálové aktivity vůči DPPH a superoxidu.



6. Diskuse

Rod *Epimedium* patří k významným taxonům tradiční čínské medicíny. *Herba Epimedii* se tradičně používala jako tonikum pro reprodukční systém (posílení libida, léčba impotence) a na „podporu omlazování“. Současný výzkum je zaměřen na účinky flavonoidů, zejména ikariinu a ikaritinu, a dalších obsahových látek, které potvrzují aktivitu při ochraně před poškozením endoteliálních buněk, neuroprotektivní efekt v léčbě Alzheimerovy choroby, osteogenní účinek v léčbě osteoporózy a protinádorovou aktivitu solidních nádorů.

Z druhů rodu *Epimedium* se u nás pěstuje několik zahradních kultivarů. Patří mezi ně *Epimedium x rubrum* (syn.: *E. alpinum x E. grandiflorum*), *Epimedium x perralchicum* (syn.: *E. perralderianum x E. pinnatum*), *Epidium x versicolor* (syn.: *E. grandiflorum x E. pinnatum*), *Epimedium x warleyense* (syn.: *E. alpinum x E. pinnatum*), *Epimedium x youngianum* (syn.: *E. diphyllum x E. grandiflorum*), *Epimedium x cantabrigense* (syn.: *E. alpinum x E. pubigerum*). V práci jsem se zaměřila na *Epimedium x rubrum*.

V methanolovém extraktu nati byla pomocí tenkovrstvé chromatografie dokázána přítomnost flavonoidů. Bližší identifikace zatím nebyla provedena. Hlavní pozornost jsem věnovala sledování antioxidační aktivity.

Měření antiradikálové aktivity proti radikálu DPPH je považováno za jednu ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsí v biologických vzorcích. Spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl). Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylopikrylhydrazin).

Reakci methanolového extraktu se stabilním radikálem DPPH jsem sledovala spektrofotometricky. Absorbanci jsem měřila po uplynutí konstantního času 30 minut. Závislost koncentrace a antiradikálové aktivity methanolového extraktu lze vypočítat z tabulek č. 1 - 3 a grafů č. 1 - 3. Hodnota IC 50 methanolového extraktu je 0,5233 mg/ml.

Antiradikálovou aktivitu vůči DPPH jsem měřila také u suchého vodného extraktu z nati. Závislost koncentrace antioxidační aktivity lze vypočítat z tabulek č. 4 - 6 a grafů č. 5 - 7. Hodnota IC 50 suchého vodného extraktu je 0,172 mg/ml.

Z hodnot IC 50 suchého vodného extraktu a methanolového extraktu vyplývá, že suchý vodný extrakt z nati má vyšší antiradikálovou aktivitu vůči DPPH než methanolový extrakt.

Další model, na kterém jsem sledovala antioxidační aktivitu, byla metoda zhášení superoxidu. Superoxidový radikál byl neenzymaticky generován systémem NADH/PMS (nikotinamidinnukleotid / 5-methylfenazanium-methylsulfát). PMS je redukováno molekulou NADH. Redukované PMS reaguje s kyslíkem a dochází k tvorbě superoxidu. Superoxidový radikál redukuje NBT (nitrotetrazolinová modř) na formazan, modrou sloučeninu, která vykazuje maximum při vlnové délce 560 nm. Reakce probíhá při pH 7,4, které zajišťuje fosforečnanový pufr. Molekula, která je schopna zhaset superoxidový radikál, způsobí snížení rychlosti redukce NBT. Průběh reakce jsem sledovala spektrofotometricky (pomocí funkce kinetické měření). Pokles absorbance jsem měřila ihned po smíchání extraktu s NADH, NBT a PMS při maximální vlnové délce 560 nm proti slepému vzorku.

Z tabulek č. 7 – 9 a grafů č. 9 – 11 vyplývá, že čím je extrakt koncentrovanější, tím je inhibice NBT vyšší a absorbance nižší. Hodnota IC 50 suchého extraktu z drogy je 0,0888 mg/ml.

Antioxidační aktivitu metodou zhášení superoxidu jsem měřila také u roztoků rutinu, troloxu a kyseliny askorbové. Hodnotu IC 50 rutinu jsem odečetla z grafu č. 13 a činí 0,1514 mg/ml. Hodnota IC 50 troloxu, odečtená z grafu č. 14, odpovídá 0,7118 mg/ml. Hodnotu IC 50 kyseliny askorbové jsem odečetla z grafu č. 15 a činí 0,4008 mg/ml.

Z hodnot IC 50 suchého extraktu drogy, roztoků rutinu, troloxu a kyseliny askorbové jsem vyzorovala, že suchý extrakt drogy má mnohem vyšší antiradikálovou aktivitu vůči superoxidu než roztoky rutinu, kyseliny askorbové a troloxu. Antiradikálová aktivita vůči superoxidu klesala v pořadí: extrakt *Epimedii herba* > rutin > kyselina askorbová > trolox.

7. Závěr

V této diplomové práci byla zkoumána antiradikálová aktivita extraktů *Epimedium x rubrum*. K prokázání antiradikálové aktivity byly použity dvě metody, metoda měřící antiradikálovou aktivitu proti stabilnímu radikálu DPPH a metoda měření antiradikálové aktivity vůči superoxidu. Methanolový extrakt z nati má antioxidační aktivitu vůči radikálu DPPH a jeho hodnota IC 50 je 0,5233 mg/ml. Vodný extrakt z nati má antioxidační aktivitu vůči radikálu DPPH, hodnota IC 50 činí 0,172mg/ml, a antioxidační aktivitu vůči superoxidu, hodnota IC 50 je 0,0888 mg/ml. Antiradikálová aktivita standardů: hodnoty IC 50 roztoku rutinu činí 0,1514 mg/ml, roztoku troloxu činí 0,7118 mg/ml a roztoku kyseliny askorbové činí 0,4008 mg/ml. Z hodnot IC 50 je patrné, že antioxidační aktivita standardů je ve srovnání s antioxidační aktivitou vodného extraktu drogy mnohem nižší.

8. Použitá literatura

- (1) Racek J.: Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění, Praha, Galén, 2003
- (2) Štípek S. a kol.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci, Praha, Grada, 2000
- (3) Terabayashi S.: Systematic consideration of the Berberidaceae, *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, 1982; 33, 355-370
- (4) Hejný S., Slavík B. (Eds): Květena České socialistické republiky, 1. Praha, Academia, 1988, s. 480-482
- (5) <http://botany.cz/cs/rubrika/herbar/e/page/3/>
- (6) Ye H.Y., Lou Y.J.: Estrogenic effects of two derivatives of icariin on human breast cancer MCF-7 cells, *Phytomedicine*, 2005; 12, 735-741
- (7) Liang H.-R., Sirén H., Riekkola M.-L., Vuorela P., Vuorela H., Hiltunen R.: Optimized separation of pharmacologically active flavonoids from *Epimedium* species by capillary electrophoresis, *J. of Chromatogr. A.*, 1996; 746, 123-129
- (8) Chen X.J., Ji H., Zhang Q.W., Tu P.F., Wang Y.T., Guo B.L., Li S.P.: A rapid method for simultaneous determination of 15 flavonoids in *Epimedium* using pressurized liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008; 46, 226-235
- (9) Guo B.-L., Li W.-K., Yu J.-G. A Xiao P.-G.: Brevicornin, a flavonol from *Epimedium brevicornum*, *Phytochemistry*, 1996; 41, 991-992
- (10) Xu W., Zhang Y., Yang M., Shen Z., Zhang X., Zhang W., Li H.: LC-MS/MS method for the simultaneous determination of icariin and its major metabolites in rat plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007; 45, 667-672
- (11) Shen P., Guo B.L., Gong Y., Deborah Y.Q. Hong, Hong Y., Yong E.L.: Taxonomic, genetic, chemical and estrogenic characteristics of *Epimedium* species, *Phytochemistry*, 2007; 68, 1448–1458
- (12) Zhao H.-Y., Sun J.-H., Fan M.-X., Fan L., Zhou L., Li Z., Han J., Wang B.-R., Guo D.-A.: Analysis of phenolic compounds in *Epimedium* plants using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry, *J. of Chromatogr. A*, 2008; 1190, 157-181

- (13) Huang J., Yuan L., Wang X., Zhang T.-L., Wang K.: Icaritin and its glycosides enhance osteoblastic, but suppress osteoclastic, differentiation and activity in vitro, *Life Sci.*, 2007; 81, 832-840
- (14) Wo Y., Zhu D., Yu Y.,Y. Lou: Involvement of NF-kappaB and AP-1 activation in icariin promoted cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells, *Eur. J. Pharmacol.*, 2008; 586, 59-66
- (15) Liu M., Liu H., Lu X., Li Ch., Xiong Z., Li F.: Simultaneous determination of icariin, icariside II and osthole in rat plasma after oral administration of the extract of *Gushudan* (a Chinese compound formulation) by LC-MS/MS, *J. of Chromatogr. B.*, 2007; 860, 113-120
- (16) Wang Z., Zhang X., Wang H., Qi L. a Lou Y.: Neuroprotective effects of icaritin against beta amyloid-induced neurotoxicity in primary cultured rat neuronal cells via estrogen-dependent pathway, *Neuroscience*, 2007; 145, 911-922
- (17) Oh M.H., Houghton P.J., Whang W.K. a Cho J.H.: Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity, *Phytomedicine*, 2004; 11, 544-548
- (18) Wang Y.-K., Huang Z.Q.: Protective effects of icariin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ in vitro, *Pharmacol. Res.*, 2005; 52, 174-182
- (19) Chung B.-H., Kim J.-D., Kim Ch.-K., Kim J.H., Won M.-H., Lee H.-S., Dong M.-S., Ha K.-S., Kwon Y.-G. a Kim Y.-M.: Icariin stimulates angiogenesis by activating the MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways in human endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 376, 404-408
- (20) Zhao J., Ohba S., Shinkai M., Chung U.-I. a Nagamune T.: Icariin induces osteogenic differentiation in vitro in a BMP- and Runx2-dependent manner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 369, 444-448
- (21) Pan Y., Kong L., Xia X., Zhang W., Xia Z. a Jiang F.: Antidepressant-like effect of icariin and its possible mechanism in mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2005; 82, 686-694
- (22) Yang L., Hu Y., Xue J., Wang F., Wang D., Kong X., Li P. a Xu W.: Compound Chinese herbal medicinal ingredients can enhance immune response and efficacy of RHD vaccine in rabbit, *Vaccine*, 2008; 26, 4451-4455

(23) Huang X., Zhu D., Lou Y.: A novel anticancer agent, icaritin, induced cell growth inhibition, G₁ arrest and mitochondrial transmembrane potential drop in human prostate carcinoma PC-3 cells, *Eur. J. Pharmacol.*, 2007; 564, 26-36

(24) Choi H.J., Eun J.-S., Kim D.K., Li R.H., Shin T.-Y., Park H., Cho N.-P. a Soh Y.: Icariside II from *Epimedium koreanum* inhibits hypoxia-inducible factor-1 in human osteosarcoma cells, *Eur. J. Pharmacol.*, 2008; 579, 58-65

(25) Lu Y., Wang D., Hu Y., Huang X. a Wang J.: Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV, *Carbohydr. Polymers*, 2008; 71, 180-186

(26) De Naeyer A., Pocock V., Milligan S. a De KeukeleireD.: Estrogenic activity of a polyphenolic extract of the leaves of *Epimedium brevicornum*, *Fytoterapia*, 2005; 76, 35-40

9. Abstrakt

Cílem diplomové práce bylo prokázat antioxidační aktivitu extraktu rodu *Epimedium* a shromáždit poznatky o hlavních obsahových látkách a biologické aktivitě druhů rodu *Epimedium*. *Epimedium herba* (neboli Yinyanghuo, Horny Goat Weed nebo Barrenwort) je jedna z nejznámějších a nejčastěji používaných rostlin v čínské medicíně pro její tonické, antirevmatické a afrodiziakální účinky. Hlavními obsahovými látkami jsou flavonoidy, alkaloidy, lignany a terpenické sloučeniny. Flavonoidy, ikariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C a ikaritin, mají rozmanité účinky, např. antioxidační, estrogení, osteogenní, antidepresivní, antianginální a antikancerogenní. K prokázání antioxidační aktivity methanolového extraktu a suchého vodného extraktu z nati *Epimedium x rubrum* jsem použila dvě metody, metodu měřící antioxidační aktivitu proti stabilnímu radikálu DPPH (difenylhydrazyl) a metodu měření antioxidační aktivity vůči superoxidu. Z měření jsem vypožadovala, že suchý vodný extrakt z nati má vyšší antioxidační aktivitu vůči DPPH než methanolový extrakt. Antioxidační aktivitu metodou zhasení superoxidu jsem měřila u suchého vodného extraktu drogy a roztoků rutinu, troloxu a kyseliny askorbové. Z měření jsem vypožadovala, že suchý vodný extrakt z drogy má mnohem vyšší antiradikálovou aktivitu vůči superoxidu než roztoky rutinu, troloxu a kyseliny askorbové. Antioxidační aktivita vůči superoxidu klesala v pořadí: extrakt *Epimedium herba*, rutin, kyselina askorbová a trolox. V methanolovém extraktu nati byla pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) dokázána přítomnost flavonoidů.

10. Abstract

The goal of thesis was to demonstrate the antioxidant activity of the genus *Epimedium* extract and collect information the main content substances and biological activity species of the genus *Epimedium* as well. *Epimedium herba* (Yinyanghuo, Horny Goat Weed or Barrenwort) is one of the best known and most frequently used plants in Chinese medicine for its tonic, anti-reumatic and aphrodisiacal effects. The main content substances are flavonoids, alkaloids, lignans and terpenic compounds. Flavonoids, ikariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C and ikaritin, have diverse effects such as antioxidant, estrogenic, osteogenic, antidepressant-like, antianginal and anticancerogenic. To demonstrate the antioxidant activities of methanolic extract and dry aqueous extract from herba *Epimedium x rubrum*, I used two methods, the method of measuring antioxidant activity against the stable radical DPPH (diphenylhydrazyl) and method of measuring antioxidant activity against superoxide. From measurement I observed that the dry aqueous extract from herba has a higher antioxidant activity against DPPH than the methanolic extract. I measured an antioxidant activity against superoxid radical of the dry aqueous extract of drug and solutions of routine, trolox and ascorbic acid. From measurements I observed that the dry aqueous extract of the drug has a much higher antioxidant activity against superoxide than solutions of routine, trolox and ascorbic acid. Antioxidant activity against superoxide decreased in the order: extract *Epimedium herba*, routines, ascorbic acid and trolox. In methanolic extract from herba was using thin-layer chromatography (TLC) proved the presence of flavonoids.