

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOSIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Antiradikálová aktivita hydroxyem substituovaných flavonoidů

Vypracovala: Monika Dvořáková

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jiřina Spilková

Oponent:

Datum zadání: 30.11.2005

Termín odevzdání: 15.5.2007

Datum obhajoby: 5.6.2007

Tuto diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pod odborným vedením své školitelky a za použití uvedené literatury.

V Hradci Králové 15.5.2007

Děkuji Doc. RNDr. Jiřině Spilkové za odborné vedení a pomoc při řešení této diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Janu Martinovi za vypracování HPLC a paní laborantce Boženě Stružkové.

OBSAH

1	ÚVOD	1
1.1	OXIDAČNÍ STRES	1
1.2	ZDROJE A REAKCE ROS A RNS	2
1.2.1	Zdroje ROS.....	2
1.2.2	Chemie a biochemie ROS	3
1.2.3	Chemie a biochemie RNS	5
2	CÍL PRÁCE	6
3	TEORETICKÁ ČÁST	7
3.1	SUPEROXID	7
3.1.1	Definice, vznik	7
3.1.2	Význam v organismu	7
3.1.3	Význam superoxidu v tkáňovém poškození.....	8
3.1.4	Antioxidační obranné mechanismy	8
3.1.4.1	Enzymatické antioxidanty	9
3.1.4.2	Neenzymatické antioxidanty	10
3.2	METODY STANOVENÍ ZHÁŠENÍ SUPEROXIDU	11
3.2.1	Metoda, při níž je superoxid generován bez použití enzymů	11
3.2.2	Metoda, při níž je superoxid generován enzymaticky	11
3.2.3	Metoda, při níž je superoxid generován radiolýzou vody	12
3.2.4	Možnosti detekce superoxidového radikálu	12
3.3	FLAVONOIDY	12
3.3.1	Strukturální znaky a antioxidační aktivita.....	13
3.3.2	Betula sp.....	18
3.3.3	Crataegus sp.	20
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1	MATERIÁL A METODY	23
4.1.1	Rostlinný materiál	23
4.1.2	Použité chemikálie.....	23
4.1.3	Přístrojové vybavení	24
4.2	STANOVENÍ OBSAHU FLAVONOIDŮ DLE ČL 2005 (30)	25
4.2.1	Betulae folium.....	25

4.2.2	Crataegi folium cum flore	26
4.3	HPLC	27
4.4	ZHÁŠENÍ SUPEROXIDOVÉHO RADIKÁLU GENEROVANÉHO NEENZYMATICKY	28
4.4.1	Příprava výluhů z drogy	28
4.4.2	Příprava činidel pro stanovení antioxidační aktivity	28
4.4.3	Vlastní měření antioxidační aktivity	29
4.5	VÝSLEDKY	31
4.5.1	Stanovení obsahu flavonoidů v drogách	31
4.5.2	HPLC	32
4.5.2.1	HPLC profil látek ve vodném výluhu z drogy Betulae folium	32
4.5.2.2	HPLC profil látek ve vodném výluhu z drogy Crataegi folium cum flore	34
4.5.3	Zhášení superoxidového radikálu	36
4.5.3.1	Aktivita nálevu Betulae folium	36
4.5.3.2	Aktivita nálevu Crataegi folium cum flore	38
4.5.3.3	Aktivita Troloxu	40
4.5.3.4	Aktivita kyseliny askorbové	41
5	DISKUSE	42
6	ZÁVĚR	45
7	POUŽITÁ LITERATURA	46

1 Úvod

1.1 Oxidační stres

ROS (reaktivní formy kyslíku) a RNS (reaktivní formy dusíku) hrají v biologických systémech dvojí roli. Mají důležitou funkci v signálním systému buňky, brání organismus před infekčním agens a nutí buňku k mitogenní aktivitě. Na druhé straně však, jsou-li ve vysoké koncentraci, mají funkci mediátorů buněčného zániku. Ničí lipidy, membrány, proteiny a nukleové kyseliny. Tento stav je označován jako oxidační stres (1).

Tabulka 1 představuje nejdůležitější formy kyslíku a dusíku.

Tab. č.1: Nejdůležitější formy ROS a RNS

REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU	
Volné radikály	Látky, které nejsou volnými
Superoxid O_2^{\cdot}	Peroxid vodíku H_2O_2
Hydroxylový radikál HO^{\cdot}	Kyselina chlorná $HOCl$
Peroxyyl ROO^{\cdot}	Ozon O_3
Alkoxyyl RO^{\cdot}	
Hydroperoxyyl HO_2^{\cdot}	
REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU	
Volné radikály	Látky, které nejsou volnými
Oxid dusnatý NO^{\cdot}	Nitrosyl NO^+
Oxid dusičitý NO_2^{\cdot}	Nitroxid NO
	Kyselina dusitá HNO_2
	Oxid dusitý N_2O_3
	Oxid dusičitý N_2O_4
	Nitronium NO_2^+
	Peroxinitrit $ONOO$
	Alkylperoxinitrit $ROONO$

ROS a RNS jsou generovány během ozáření UV světlem, rentgenovými paprsky a gamma paprsky. Dále jsou produkovány při reakci katalyzovanou kovem, jsou produkovány neutrofily a makrofágy během zánětu a jsou výsledkem činnosti mitochondrií a dalších mechanismů (2).

Oxidační stres má za následek rozvoj věkem podmíněných nemocí, jako je rakovina, ateroskleróza, artritida, neurodegenerativní nemoci (Alzheimerova a Parkinsonova nemoc), ale i diabetes mellitus, popřípadě renální onemocnění. Také urychluje proces stárnutí (3,4).

1.2 Zdroje a reakce ROS a RNS

1.2.1 Zdroje ROS

Volné radikály mohou být definovány jako molekulární fragmenty obsahující jeden nebo více nepárových elektronů. Radikály 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. Pokud radikál reaguje s "normální" molekulou, nutně ji změní na radikál a radikálová reakce se tím propaguje do okolí (5, 6).

Nejvýkonnějším producentem reaktivních metabolitů kyslíku v buňkách jsou membránově vázané enzymy, zejména ty, jejichž koenzymy jsou schopné redukovat dioxygen pouze jediným elektronem za vzniku superoxidu. Jsou to hlavně koenzymy s chinoidní nebo flavinovou strukturou, hemové koenzymy a enzymy s mědí v aktivním centru (6).

ROS je produktem jak endogenních, tak exogenních zdrojů. Mezi endogenní zdroje patří mitochondrie, cytochrom P 450 nacházející se v endoplazmatickém retikulu, aktivace zánětlivých buněk, oxidázy (například xantinoxidáza), peroxisomy a další.

Mitochondrie jsou hlavním zdrojem volných radikálů (primárně se zde tvoří superoxidový radikál, sekundárně potom peroxid vodíku), ale zároveň produkují antioxidanty, například GSH (glutathion) a enzymy, jako jsou superoxid dismutasa (SOD, viz dále) a glutathion peroxidasa. Enzymy jsou přítomné na obou stranách mitochondriální membrány a zabraňují oxidačnímu stresu (5).

Vedle mitochondrií je dalším buněčným zdrojem superoxidového radikálu například xantinoxidáza (XO). Je to univerzální enzym, je přítomen ve všech organismech a obsažen v různých tkáních. Xantinoxidáza je důležitý zdroj kyslíkových volných radikálů. Patří do skupiny enzymů známých jako molybden železo - síra flavin hydroxyláza a katalyzuje hydroxylaci purinů, tedy přeměnu hypoxantinu na xantin a dále na kyselinu močovou (viz reakce). V obou krocích je molekulární kyslík redukován, v prvním kroku se tvoří superoxidový anion a ve druhém peroxid vodíku.

Dalším endogenním zdrojem reaktivního kyslíku jsou neutrofilní, eosinofilní a makrofágy. Aktivací makrofágů je spuštěno zpětné vychytávání kyslíku a vznik superoxidového radikálu, oxidu dusnatého a peroxidu vodíku.

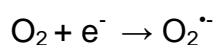
Také cytochrom P450 byl zařazen mezi zdroje peroxidového radikálu.

Mikrozomy a peroxizomy jsou dalším zdrojem ROS. Mikrozomy jsou zodpovědné za 80 % H_2O_2 produkované *in vivo*. Peroxizomy za fyziologických podmínek produkují H_2O_2 , ale ne superoxidový radikál (5).

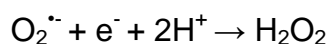
Reaktivní kyslíkový radikál může být produkován také exogenními procesy. Vlivy prostředí, jako například negenotoxické kancerogeny, xenobiotika, popřípadě sloučeniny chloru, kovové ionty, barbituráty a také záření podněcují vznik reaktivního kyslíku v buňce (7).

1.2.2 Chemie a biochemie ROS

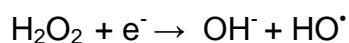
Přijetím jednoho elektronu se molekula kyslíku redukuje na monoradikál superoxid:



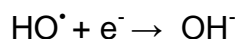
a další elektron redukuje superoxid na peroxid vodíku:



Je-li k dispozici další elektron, dvouatomová molekula peroxidu vodíku se rozpadne na vodu a hydroxylový radikál HO^{\cdot}



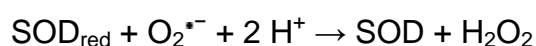
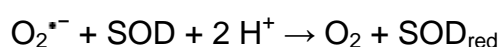
Poslední elektron redukuje hydroxylový radikál na další molekulu vody, resp. hydroxylový anion:



Superoxid

Superoxidový radikál, který vzniká ať už metabolickými pochody nebo jako následek kyslíkové aktivace fyzikálním zářením, je považován za primární ROS. Reaguje-li s dalšími molekulami, vytváří sekundární ROS.

Superoxidový radikál je spotřebován podle následujících reakcí:

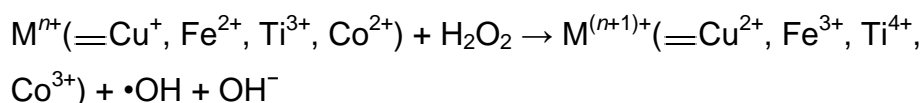
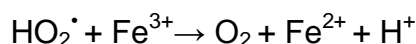


Peroxid vodíku

Peroxid vodíku není radikálem, avšak do skupiny ROS určitě patří, neboť se účastní vzniku radikálů.

Velké množství hydroxylového radikálu generovaného *in vivo* pochází z kovem katalyzovaného rozkladu peroxidu vodíku.

Prvním krokem však je redukce železa superoxidem (ve formě hydroperoxyly), teprve následně se redukuje peroxid vodíku.



Kde M^{n+} je atom železa, mědi, chromu, kobaltu a jiných dalších kovů (5). Druhá reakce se nazývá Fentonova. Železnatý ion v reakci s peroxidem vodíku generuje hydroxylový radikál, který následně oxiduje okolní biomolekuly. Fentonova reakce je důležitým generátorem ROS (3,5).

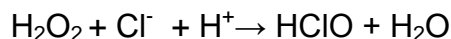
Hydroperoxyl

Typický radikál, který může vzniknout v živém systému je peroxidový radikál (RO_2^\bullet) (5). Nejjednodušším peroxidovým radikálem je dioxy (hydroperoxyl) radikál, který funguje jako kyselina, odevzdává vodík a stává se z něj superoxidový radikál

$O_2^{\bullet-}$. Chemie tohoto typu molekuly závisí na navázané skupině (R), místním prostředí a koncentraci kyslíku, popřípadě jiných reaktantů (7).

Kyselina chlorná

Kyselinu chlornou (HClO) syntetizují neutrofilní granulocyty pomocí své myeloperoxidázy:

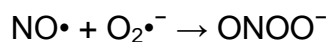


Kyselina chlorná je silný oxidant. Neutrofilní granulocyty ho používají spolu s dalšími ROS a RNS jako baktericidní prostředek (6).

1.2.3 Chemie a biochemie RNS

Radikál oxidu dusnatého (NO^{\bullet}) je důležitou signální molekulou ve velké řadě fyziologických procesů, včetně neurotransmise, regulace krevního tlaku, obranných mechanismech, relaxace hladkého svalstva a regulace imunitního systému (5). Tato malá molekula obsahuje jeden nespárovaný elektron. NO^{\bullet} je generován v biologických tkáních specifickou syntázou oxidu dusnatého (NOS), která metabolizuje arginin na citrulin a vzniká radikál NO^{\bullet} . Nadprodukce reaktivního dusíkatého radikálu se nazývá dusíkatý stres (8). Ten může vést k nitrosylačním reakcím, které mění struktury proteinů a inhibují jejich funkce. Oxid dusnatý a jeho metabolity jsou za určitých okolností prudce jedovatými látkami (6).

Zvlášť nebezpečný je NO^{\bullet} radikál během zánětlivé reakce, kdy buňky imunitního systému produkují jak NO^{\bullet} , tak superoxidový anion. Za těchto podmínek reagují tyto dva radikály spolu a vytváří se peroxynitrátový anion ($ONOO^-$), který má mnohem vyšší oxidační aktivitu. Ničí pak DNA a oxiduje okolní lipidy.



2 Cíl práce

Cílem mé práce bylo sledování schopnosti extraktů flavonoidních drog zhaset superoxidový radikál. Testovány byly drogy *Betulae folium* a *Crataegi folium cum flore*.

3 Teoretická část

3.1 Superoxid

3.1.1 Definice, vznik

Superoxidový radikál je považován za primární reaktivní formu kyslíku. Vzniká z molekuly kyslíku přijetím jednoho elektronu.

Zdrojem superoxidového radikálu v buňce je respirační řetězec mitochondrií, cytochrom P – 450 v endoplazmatickém retikulu a NADPH – oxidáza v leukocytech a makrofázích. Malé množství superoxidu se tvoří při náhodné oxidaci hemoglobinu na methemoglobin. V tomto případě molekula O_2 odebere z Fe^{2+} elektron, oxiduje ho na Fe^{3+} a kyslík se přitom redukuje na superoxid. Proto je velká část metabolického úsilí erytrocytu zaměřena na ochranu proti oxidaci vlastních struktur (5, 6).

3.1.2 Význam v organismu

Neutrofilní leukocyty a makrofágy používají reaktivní formy kyslíku k odstraňování zbytků mrtvých buněk a k zabíjení bakterií. Jejich plazmatická membrána je vybavena enzymovým komplexem NADPH – oxidázou. Tento komplex se po pohlcení cizí částice aktivuje a redukuje molekulu kyslíku na superoxid. Takto aktivované buňky zvýší spotřebu kyslíku (respirační vzplanutí), nikoliv však činností mitochondrií. Vznikající superoxid se okamžitě mění na peroxid vodíku, ten pak v kyselém prostředí a za přítomnosti železa podléhá Fentonově reakci za vzniku hydroxylového radikálu.

Účinkem cytokinů, mikrobů a mikrobiálních produktů je v makrofázích a neutrofilech stimulována syntéza oxidu dusnatého, která ve svém okolí mnohonásobně zvyšuje koncentraci $NO\bullet$. Ten pak nestačí být odstraněn difúzí do krve a navíc ve stejné lokalitě vzniká superoxid, takže s ním reaguje na peroxynitrit, který slouží k oxidaci a nitraci cizorodých struktur a za určitých podmínek i vlastních struktur. Zvláště citlivé jsou paraziti, viry, houby a některé nádorové buňky (6).

Byl zkoumán také účinek superoxidu jako signální molekuly. Faktor $TNF\alpha$ byl objeven jako molekula podílející se na destrukci nádorů a pak se ukázal jako

významný regulátor zánětu. Když se naváže na příslušný receptor, v buňce se spustí tvorba ROS. Potenciálním zdrojem ROS může být aktivace 5 - lipoxygenázy, tvorba lipidových hydroperoxidů, ale i tvorba superoxidu v mitochondriích. Reaktivní formy kyslíku pak aktivují některé proteinkinázy, které se účastní časných fází aktivace NF – κ B, ten řídí syntézu regulačních proteinů zánětu (6).

3.1.3 Význam superoxidu v tkáňovém poškození

Reaktivními formami kyslíku (superoxid) může být atakována většina biomolekul a enzymových komplexů.

Peroxidace lipidů:

Superoxid (ve formě hydroperoxylového radikálu) vytrhne atom vodíku z nenasycených mastných kyselin a vzniká alkylperoxylový radikál (LOO^\bullet). Ten poté vytrhne elektron z mastné kyseliny sousedního lipidu, která se stává novým radikálem a radikálová reakce v lipidech se tak propaguje. V přítomnosti trojmocného železa významně stimuluje peroxidaci lipidů, a proto je důležité, aby organismus separoval katalyticky aktivní železo a měď do forem (ferritin, transferin), ze kterých nemohou vstoupit do Fentonovy reakce (viz dříve).

Poškození proteinů:

Reaktivní kyslíkové formy mohou bezprostředně oxidovat aminokyselinové zbytky a proteiny tak ztrácí svou enzymovou, signální a transportní funkci.

Poškození DNA:

Reaktivní formy kyslíku atakují nukleové kyseliny a modifikují je na nepřírodní deriváty, například 5 – hydroxymethyluracil, 8 – hydroxyguanin a thyminglykol, ty pak zavedou chybu při replikaci DNA (mutace) nebo vznikají zlomy DNA (6).

3.1.4 Antioxidační obranné mechanismy

Buňky mají vlastní obranný mechanismus a tím jsou enzymy, například superoxid dismutasa (SOD), glutathion peroxidasa, glutathiontransferasa a kataláza (9).

K neenzymatickým obranným mechanismům patří nízkomolekulární tělu vlastní antioxidanty: thiolové antioxidanty (glutathion, lipoová kyselina), ubichinon / ubichinol (koenzym Q 10), melatonin, kyselina močová a bilirubin.

Dalšími antioxidanty jsou vitamín C (askorbát), vitamín E (alfa – tokoferol), karotenoidy, β – karoten, vitamín A, flavonoidy, a další (10, 6).

3.1.4.1 Enzymatické antioxidanty

Superoxidová dismutasa (SOD)

Superoxidová dismutasa je jedním z nejefektivnějších intracelulárních enzymatických antioxidantů. Existuje v několika isoformách, lišících se centrálním iontem, substituenty, počtem podjednotek, kofaktory a dalšími znaky. V lidském organismu se vyskytují 3 formy SOD: cytosolová Cu, Zn – SOD, mitochondriální Mn – SOD a extracelulární SOD (11).

Superoxidová dismutasa je enzym, který katalyzuje dismutaci $O_2^{\bullet-}$ (superoxidového radikálu) na O_2 a méně reaktivní H_2O_2 , viz reakce.

SOD ničí $O_2^{\bullet-}$ s vysokou účinností (9).

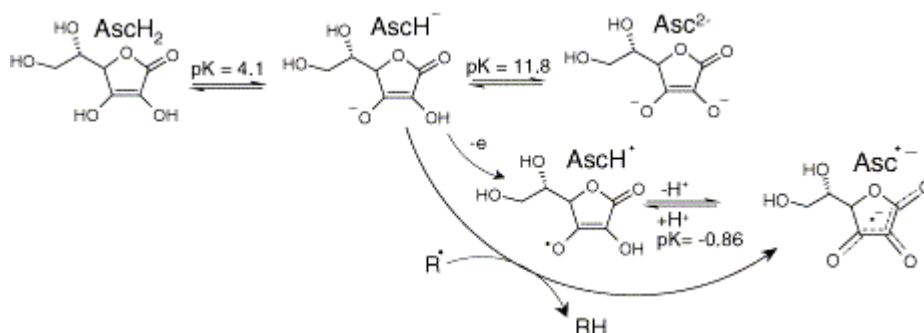
Cytosolová Cu, Zn – SOD je enzym s molekulovou hmotností okolo 32 kDa. Skládá se ze dvou identických podjednotek (homodimer), v každé podjednotce je jeden atom mědi a jeden atom zinku. Je to velmi stabilní enzym, který katalyzuje při pH v rozmezí 4,5 – 9,5. Vyskytuje se v cytosolu a v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Katalyzuje přeměnu superoxidového aniontu na kyslík a vodu. Přenos elektronu z jedné molekuly superoxidu na druhou obstarává atom mědi. Cu (II) se redukuje na Cu (I) a pak se znovu oxiduje. Atom Zn (II) má stabilizační funkci, katalýzy se neúčastní (9, 6).

Mitochondriální Mn – SOD je homotetramer, který obsahuje jeden manganový atom na jednu podjednotku. Centrální ion tohoto enzymu se redukuje z Mn (III) na Mn (II) a pak zpět na Mn (III) během dvou kroků přeměny superoxidu (9).

Extracelulární superoxidová dismutasa (EC – SOD) je tetramer, glykoprotein, který obsahuje atom mědi a atom zinku. Katalýzu zajišťuje atom mědi a atom zinku má stabilizační funkci. Má vysokou afinitu k glykosaminoglykanům, například k heparinu a heparinsulfátu (9, 6)

3.1.4.2 Neenzymatické antioxidanty

Vitamín C



Vitamín C (kyselina askorbová) je velmi důležitý a silný antioxidant, který se nachází ve vodném prostředí lidského těla. Je přítomen v plicích a v oční čočce. Vitamín C kooperuje s Vitamínem E na regeneraci α - tokoferolu z α - tokoferolového radikálu v membránách a lipoproteinech (5).

Kyselina askorbová má dvě ionizovatelné hydroxylové skupiny, je proto dikyselinou (AsCH₂). Za fyziologického pH je Vitamín C z 99,9 % přítomný jako AsCH⁻ a velmi malé množství je ve tvaru AsCH₂ (0.05%) a Asc²⁻ (0.004%). Antioxidantem je ve tvaru AsCH⁻. AsCH⁻ je donorem elektronu, popřípadě protonu a stává se z něj resonančně stabilní volný radikál (AscH• a Asc•⁻). Hladina tohoto radikálu je velmi dobře měřitelná a ukazuje na stupeň oxidačního stresu v biologických systémech.

Je známo, že Vitamín C brání biologické membrány proti oxidaci. Zatímco vysoká hladina Vitamínu C není na závadu, neboť tělo přebytek vyloučí močí, nízká koncentrace v séru, hlavně u predisponovaných osob, může zvýšit riziko gastrické metaplázie a chronické gastritidy. Pozitivní vliv Vitamínu C spočívá v snížení výskytu žaludečního tumoru. Toto se děje skrze přerušení reakce mezi nitrátovými a amino skupinami. Bylo dokázáno, že Vitamín C chrání i před plicním a kolorektálním tumorem (12).

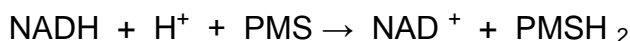
Vitamín E

Vitamín E je skupina osmi izomerů, z nichž nejvýznamnější je α – tokoferol. Je antioxidační látkou membrán, protože jeho izoprenová struktura je lipofilní. Při peroxidaci lipidů přeměňuje alkylperoxylové radikály LOO• na hydroperoxydy. Zneškodní tak peroxylové radikály mastných kyselin dříve, než mohou napadnout sousední lipidy. α – tokoferol se přitom mění na tokoferolový radikál (6).

3.2 Metody stanovení zhášení superoxidu

3.2.1 Metoda, při níž je superoxid generován bez použití enzymů

Superoxidový radikál je generován systémem NADH / PMS (nikotinamiddinukleotid a 5 – methylfenazanium – methyl – sulfát) podle reakce:



Po redukci PMS způsobené NADH, redukovaný PMS reaguje s kyslíkem a dochází k tvorbě superoxidu $\text{O}_2^{\bullet-}$.

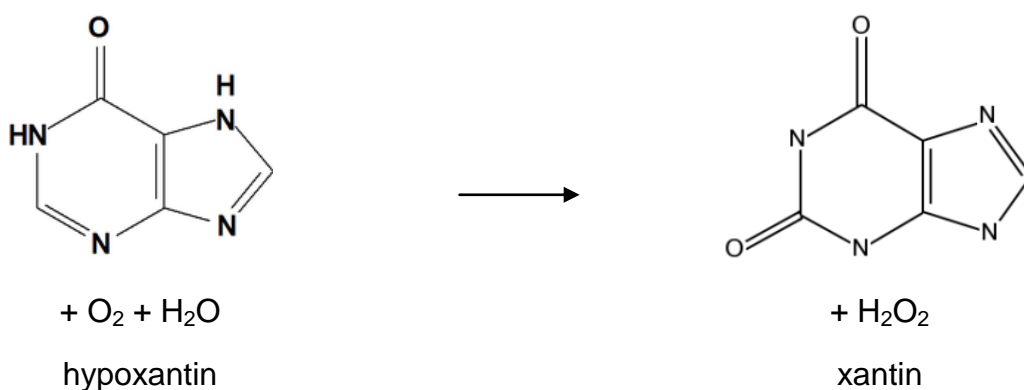
Superoxidový radikál redukuje NBT na formazan, modrou sloučeninu, která vykazuje maximum při vlnové délce 560 nm.

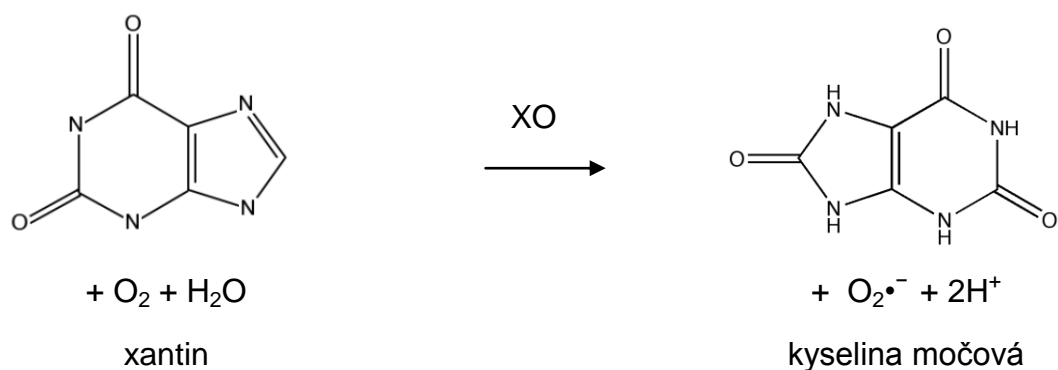
Reakce probíhá při pH 7,4 (fosfátový pufr).

Molekula, která je schopná zhášet superoxidový radikál způsobí snížení rychlosti redukce NBT.

3.2.2 Metoda, při níž je superoxid generován enzymaticky

Superoxidový radikál se tvoří při reakci xantinoxidázy (XO) s xantinem (nebo hypoxantinem). Xantinoxidáza katalyzuje oxidaci xantinu na kyselinu močovou, přičemž se tvoří superoxidový radikál. Ten následně redukuje NBT na formazan, vykazující maximum při vlnové délce 560 nm (3).





3.2.3 Metoda, při níž je superoxid generován radiolýzou vody

Roztok se velmi krátce vystaví ionizačnímu záření a změny zkoumané látky (štěpy a jejich reakce) se pozorují spektroskopicky, luminiscenčně, polarograficky nebo magnetickou rezonancí (6).

3.2.4 Možnosti detekce superoxidového radikálu

Superoxidový radikál lze detekovat těmito způsoby:

Reakcí s NBT

Reakcí s cytochromem c

Reakcí s DMPO (2,2 – dimetyl – 2H – pyrol – 1 – oxid)

Reakcí s BMPO (5 – terc – butoxykarbonyl – 5 – metyl – 1 – pyrrolin – N – oxid)

Reakcí s luminolem

Reakcí s adrenalinem

Reakcí s akonitázou

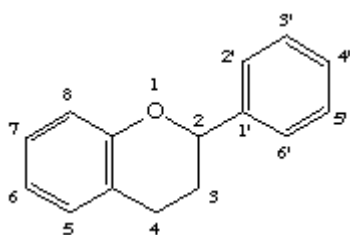
Reakcí s hydroethydinem

3.3 Flavonoidy

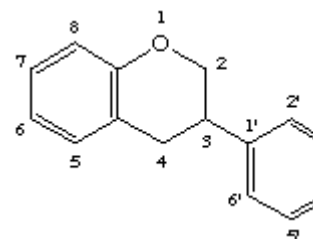
Flavonoidy jsou deriváty benzo – γ – pyranu. Jsou všudypřítomné ve fotosyntetizujících buňkách, vyskytují se jako aglykony i glykosidy. V závislosti na stupni oxidace pyranového kruhu se dělí do několika skupin flavonoidů a látek příbuzných: flavony, flavonoly, flavanony, isoflavony, flavany, flavanoly a anthokyany. Kruh může být otevřen, pak se nazývají chalkony, nebo se může zacyklit a vytvořit furanový kruh a nazývají se aurony. Hodně rozšířené jsou

polyfenolické bioflavonoidy, známé jako proanthocyanidiny. Skládají se z více než 17 flavanolových jednotek a jsou bezbarvé (13).

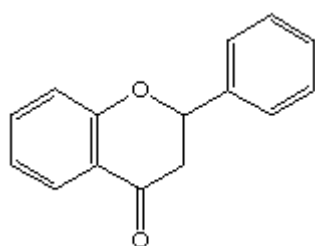
Základní struktury flavonoidů



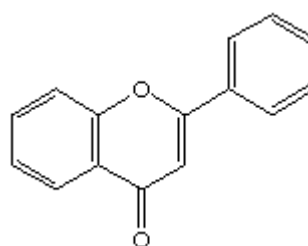
flavan



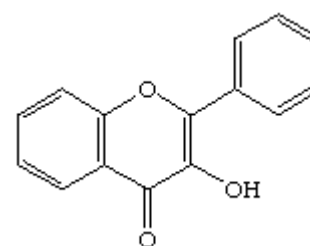
isoflavan



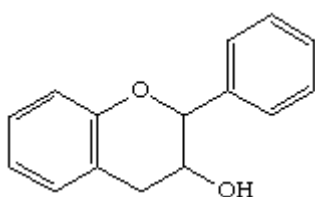
flavanone



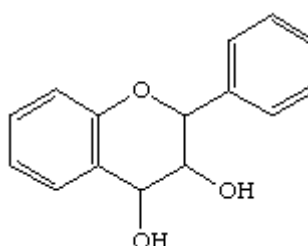
flavone



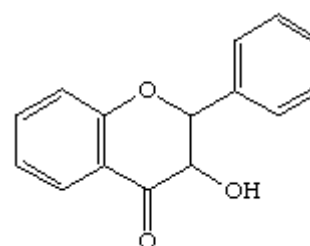
flavonol



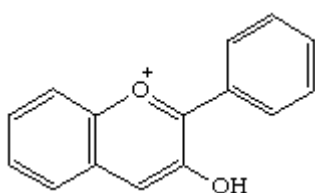
flavan-3-ol



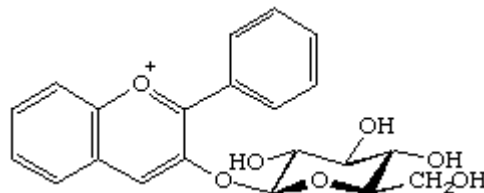
flavan-3,4-diol



dihydroflavonol



anthocyanidin



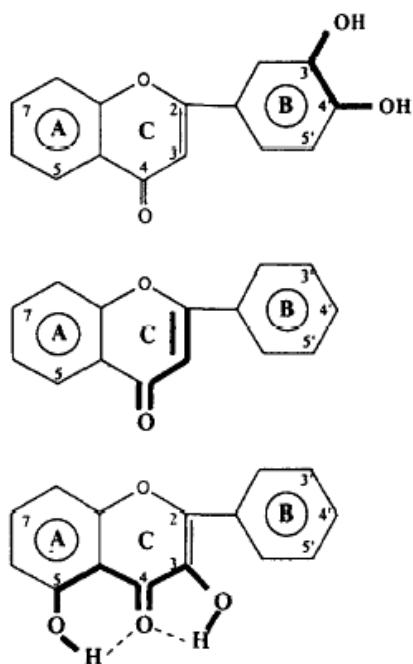
anthocyanin

3.3.1 Strukturální znaky a antioxidační aktivita

Flavonoidy jsou syntetizovány z tetrahydrochalkonů, které vzniknou ze 3 acetátových jednotek, a z hydroxyskořicové kyseliny.

Flavonoidy se liší zejména nasyceností nebo nenasyceností pyranového kruhu, počtem a pozicí hydroxylových skupin a stupněm metylace popřípadě glykosylace, která ovlivňuje některé vlastnosti flavonoidů, zejména jejich rozpustnost (14).

Strukturální uspořádání předurčuje antioxidační aktivitu 4 – oxo – flavonoidů:



1. o – dihydroxy substituce kruhu B, která je hlavním cílem oxidačního ataku, a která se účastní na delokalizaci elektronů
2. 2 – 3 dvojná vazba, konjugovaná s 4 – keto skupinou, je zodpovědná za delokalizaci elektronů a stabilizuje radikál
3. hydroxylové skupiny na uhlíku 3 a 5, které jsou zapojené do antiradikálové aktivity (5,14,15).

Tab.č.2 Významné flavonoidy s předpoklady pro antioxidační aktivitu
obsažené v drogách *Betulae folium* a *Crataegi folium cum flore*

	3	5	6	7	8	3'	4'	5'
kvercetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H
myricetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	OH
kempferol	OH	OH	H	OH	H	H	OH	H
kvercitrin	O - rha	H	OH	OH	H	OH	H	OH
rutin	O - rha - glc	OH	H	OH	H	OH	OH	H
hyperosid	O - gal	OH	H	OH	H	OH	OH	H
vitexin	H	OH	H	OH	glc	H	OH	H

Hydroxylové skupiny

Uspořádání a celkový počet hydroxylových skupin předurčuje antioxidační aktivitu. Volné radikály reagují s OH skupinami podle následujícího schématu:



OH skupiny na B kruhu jsou rozhodujícími činiteli ve vychytávání ROS a RNS. Jsou donory vodíku a elektronů, akceptory pak jsou hydroxylový, peroxidový a peroxyinitritový radikál. Přijetím vodíku se volné radikály stabilizují a vzniklý fenoxyllový radikál je též stabilní (5, 16).

Substituce 3'4'- dihydroxy výrazně snižuje peroxidaci lipidů. Toto uspořádání je charakteristické pro nejsilnější vychytávače peroxyly, superoxidu a peroxyinitritového radikálu. Například kvercetin (3,5,7,3',4'- OH) nebo hyperosid (3 – O – gal, 5,7,3',4'- OH) mají silnější antioxidační aktivitu než kempferol (3,5,7,4'- OH) popřípadě vitexin (5,7,4'- OH - 8 – glc), jež nemají OH skupinu na uhlíku 3'. Oxidací flavonoidů, kde je přítomno 3'4'katecholové uspořádání, vznikají stabilní o-semichinony. Flavonoidy, které nemají katecholové nebo o – trihydroxylové (pyrogallol) uspořádání tvoří relativně nestabilní radikály a jsou slabými vychytávači (16).

Heterocyklický kruh přispívá k antioxidační aktivitě dvěma mechanismy: přítomností volné 3-OH skupiny a konjugací mezi aromatickými jádry. Kvercetin je velmi účinným vychytávačem a to proto, že má nejen volné OH skupiny na B kruhu, ale i proto, že má volnou 3 – OH skupinu, díky čemuž je vysoce stabilní.

Jeho glykosidy například rutin (kvercetin 3 –O rhamnosylglukosid) nebo kvercitrin (kvercetin 3 – O rhamnosid) jsou mnohem méně stabilní a slabší vychytávače radikálů.

Molekuly flavonolu a flavan 3 –olu jsou planární, zatímco flavony a flavanony, jimž chybí tento znak, jsou zprohýbané. Planarita umožňuje konjugaci, elektronovou delokalizaci a zodpovídá za zvýšenou stabilitu flavonoidního fenoxylového radikálu (5,16,17).

2 - 3 dvojná vazba a 4 – keto funkce

Vedle 3', 4' - OH a 3-OH je pro antioxidační aktivitu důležitá také přítomnost či absence nenasycené dvojně vazby mezi uhlíky 2 a 3 a keto skupina umístěná na uhlíku 4. Flavonoidy s 2-3 dvojnou vazbou v konjugaci s 4- keto skupinou mají nižší IC₅₀ (čím nižší IC₅₀, tím silnější antioxidační aktivita) ve srovnání s heterocyklem s nasycenou vazbou. Konjugace mezi kruhy A a B umožňuje rezonanční efekt aromatického jádra a poskytuje stabilitu flavonoidnímu radikálu (16).

Glykosylace flavonoidů

Vazba mezi aglykonem a cukernou jednotkou je zpravidla realizována přes kyslík hydroxylové skupiny, často v pozicích 7 (flavony a flavanony), 3 (flavonoly) nebo někdy v pozici 4'. Méně často se vyskytuje C – glykosid, například vitexin a acetylvitexin u hlohu. Cukernými jednotkami bývá glukosa, rhamnosa nebo rutinosa (16).

Aglykony jsou silnější antioxidanty než odpovídající glykosidy (16). Například kvercetin je silnějším antioxidantem než rutin nebo kvercitrin.

Aglykony luteolin a kvercetin jednoznačně převyšují 3',4'a 7 – O - glykosidy ve schopnosti zpomalovat akumulaci hydroperoxidů v bilaterální membráně. C – glykosylací v A kruhu také klesá aktivita. Tak jako O – methylace, tak i 4' - glykosylace stericky blokuje katechol na B kruhu (16).

V potravě se často vyskytují flavonoidy, které mají cukernou složku v pozicích 3 nebo 7, avšak cukr na A kruhu (tedy v pozici 7) způsobuje větší pokles aktivity než glykosylace na C 3 v heterocyklu (16).

Stupeň polymerace

Dimerní a trimerní procyanidiny jsou proti superoxidovému radikálu aktivnější než monomery. Aktivita dimerů a trimetrů se liší jen málo. Tetramery vykazují vyšší aktivitu proti peroxyinitritovému a superoxidovému radikálu než trimery, zatímco hexamery a heptamery mají zřetelně vyšší aktivitu proti superoxidovému radikálu než trimetry a tetrametry (16).

Schopnost chelatovat kovy

Schopnost flavonoidů vázat kov přispívá ke zvýšení jejich antioxidační aktivity. Významná je redukce železem ve Fentonově reakci, kterou vznikají ROS, a která je silně inhibována flavonoidy 3',4'-OH, 4 – keto funkcí a 5 – OH volnou skupinou, které se účastní na chelátování železa. Polyhydroxylované flavonoidy mají značný význam v inhibici Fentonovy reakce *in vivo* (18).

Prooxidační aktivita flavonoidů

Zatímco antioxidační aktivita flavonoidů hraje pozitivní roli v prevenci nemocí, některé studie poukazují na to, že některé flavonoidy mají i opačný účinek, že působí *in vitro* prooxidačně. Prooxidační aktivita je určena počtem a rozmístěním hydroxylových skupin. Mono- a dihydroxyflavonoidy nevykazují žádnou zaznamenanou prooxidační aktivitu. Hydroxylové skupiny, zejména na B kruhu, jasně zvyšují produkci hydroxylového radikálu ve Fentonově reakci. Například myricetin (3,5,7,3',4',5' - OH), který má tři sousedící hydroxylové skupiny na B kruhu, podporuje produkci peroxidu vodíku, ze kterého pak při Fentonově reakci vznikne hydroxylový radikál.

Tomuto prooxidačnímu efektu může být přisuzována cytotoxicita a apoptóza pozorována u některých flavonoidů izolovaných z některých léčivých rostlin. V přítomnosti RNS flavonoidy s A – nebo B – trihydroxylovým uspořádáním způsobují jednovláknové poškození DNA. Je také zaznamenáno, že v přítomnosti kyslíku a za pomoci dvojmocné mědi nenasycená 2-3 vazba a 4 – keto skupina flavonů podporuje utváření ROS. Glykosylace a metylace OH skupin tlumí prooxidační chování flavonoidů (16). Aby se potvrdil toxický účinek flavonoidů používaných v potravních doplňcích jsou však nezbytné další studie.

3.3.2 *Betula* sp.

Systematické zařazení:

Říše: *Planta* (rostliny)

Podříše: *Tracheobionta* (cévnaté rostliny)

Oddělení: *Magnoliophyta* (krytosemenné rostliny)

Třída: *Magnoliopsida* (dvouděložné)

Podtřída: *Hamamelididae*

Řád: *Betulales* (břízotvaré)

Čeleď: *Betulaceae* (břízovité)

Druh: *Betula pendula* ROTH (Bříza bělokorá), *Betula pubescens* Ehrh. (Bříza pýřitá), které jsou podle lékopisu ČL 2005 také matečnými rostlinami drogy *Betulae folium*.

Popis:

Opadavý, jednodomý, široce kuželovitý strom, vysoký 25 až 30 metrů. Borka je za mlada hladká, šedavě bílá, loupavá, ve stáří v dolní části kmene rozpuškovatá. Listy jsou jednoduché, dlouhé 3 až 6 cm, široké 2,5 až 5 cm, celistvé, střídavé, koníkovité, okraj čepele dvakrát pilovitý. Mladé čepele vylučují z mladých žlázek lepkavý sekret. Samčí květy jsou v jehnědovitém květenství dlouhém od 3 do 7 cm, jehnědy jsou po 1 až 3 na konci větviček, jsou převislé. Květy jsou žluté. Samičí květy jsou ve válcovitém jehnědovitém květenství, jehnědy jsou zpočátku vzpřímené, po opylení převislé. Plody jsou jednosemenné, křídlaté nažky, dlouhé asi 2 cm (19).

Vyskytuje se po celé Evropě a v Asii.

Užívaná část:

Pro terapeutické využití se sbírají listy (*Betulae folium*), někdy pupeny (*Betulae gemmae*) a březová míza.

Sběr:

Listy se sbírají časně zjara, nejlépe dva měsíce po rozvití. Sbírají se mladé lepkavé listy s krátkou stopkou bez zdřevnatělých částí stromu. Suší se rozprostřené v tenké vrstvě na vzdušném místě. Jsou na povrchu kryté tenkou

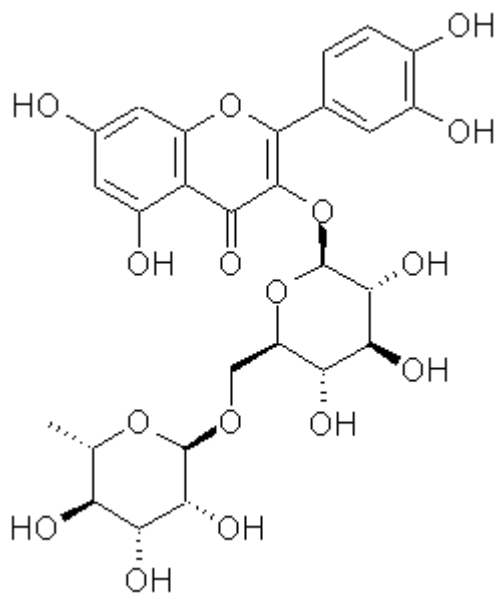
voskovou kutikulou, a proto prosýchají zvolna. Teplota sušení nesmí překročit 40 ° C. Droga má slabě aromatický pach a chuť slabě hořkou (19).

Obsahové látky:

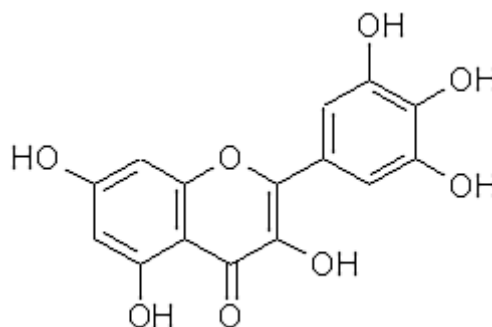
Účinnými látkami jsou flavonoidy (asi 2%), saponiny a silice, jejichž množství kolísá podle stáří listů od 0,05 – 0,5 %. Dále jsou přítomny pryskyřice, třísloviny, vitamín C, karoteny, minerální látky a fytoncidy (19).

Listy břízy obsahují následující flavonoidní glykosidy: kvercetin – 3 – rutinoid (rutin), kvercetin – 3-D – galaktosid (hyperin), kvercetin – 3 –glukuronid, kvercetin – 3 – arabinopyranosid, kvercetin – 3 – arabinofuranosid, kvercetin – 3 – rhamnosid (kvercitrin), myricetin – 3- D– galaktosid a kaempferol. Dále obsahují fenolové kyseliny a triterpenoidy (20).

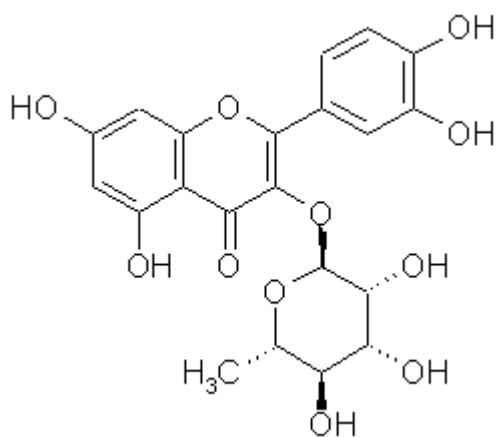
Borka obsahuje deriváty lupanového typu (lupeol a hydroxylované deriváty, například betulinol a kyselina betulinová). Borka dále obsahuje arylbutanoidy a glykosidické diarylheptanoidy (21).



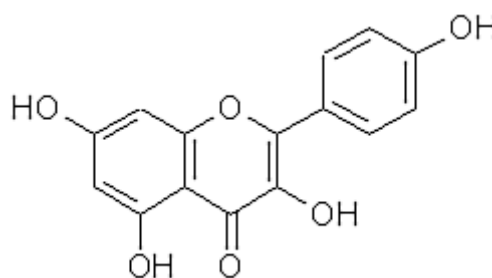
Rutin



Myricetin



Kvercitrin



Kempferol

Účinky a použití *Betulae folium*:

Nálev nebo čerstvá šťáva se používají jako močopudný prostředek k proplachové terapii u bakteriálních a zánětlivých onemocnění močových cest (pyelonefritis, uretritis, cystitis, uretrální syndrom), k prevenci vzniku ledvinového nebo močového písku a k adjuvantní léčbě revmatických obtíží. Příjem zvýšeného množství tekutin a proplachová terapie jsou kontraindikovány při nedostatečné činnosti srdce a ledvin provázené otoky. U alergiků se po kontaktu s drogou mohou vyskytnout reakce projevující se podrážděním nosní sliznice a rýmou nebo kontaktní dermatitidy (20). Kromě listů se používal dříve v kožním lékařství i březový dehet (*Pix betulae*), získaný suchou destilací dřeva. Březová míza, získávaná navrtáváním březového dřeva, se používá jako vlasové tonikum (tzv. březová voda) (19, 23).

3.3.3 *Crataegus* sp.

Systematické zařazení:

Říše: *Planta* (rostliny)

Podříše: *Tracheobionta* (cévnaté rostliny)

Oddělení: *Magnoliophyta* (krytosemenné rostliny)

Třída: *Magnoliopsida* (dvouděložné)

Podtřída: *Maloidae*

Řád: *Rosales* (růžotvaré)

Čeleď: *Malaceae* (jabloňovité)

Druh: Nejčastěji užívanými druhy jsou *Crataegus laevigata* (Poiret) DC. (hloh hladký) a *Crataegus monogyna* Jacq. (hloh jednosemenný), které jsou matečnými rostlinami drogy *Crataegi folium cum flore* a *Crataegi fructus*.

Popis:

Crataegus laevigata je trnitý keř nebo strom s kulovitou korunou rostoucí v Evropě a v Severní Americe. Listy jsou střídavé, řapíkaté, s obvejčitou až koníkovitou čepelí, po stranách s 3 až 7 úkrojky, hrubě zubatými jen v horní části. Květenství tvoří přímé, 5 – 10 květů vrcholíky. Květy jsou obojaké, paprscité, na lysých stopkách. Korunní lístky jsou bílé, prašníky jsou červené. Plodem jsou červené malvice s tvrdými peckami (23).

Užívaná část:

Z drogy se používají list s květem (*Crataegi folium cum flore*), květy (*Crataegi flos*), plody (*Crataegi fructus*) a listy (*Crataegi folium*)(19,24,25).

Sběr:

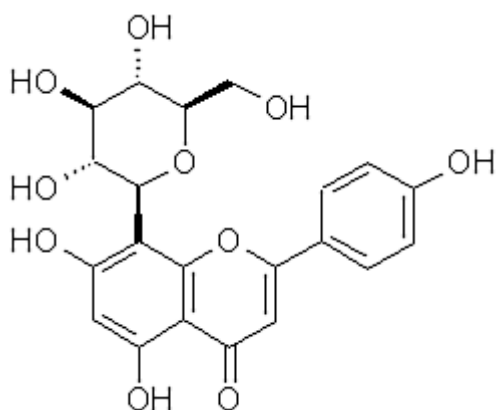
Květ a list se sbírá krátce před rozvitím (květen, červen), plod na podzim. Suší se ve stínu. Při umělé teplotě maximálně do 45 ° C. Nesprávným sušením květy, zejména starší, hnědnou. Plody se suší při umělém teple do 70 ° C.

Květy nepříjemně páchnou (po trimethylaminu), droga chutná hořce (19)

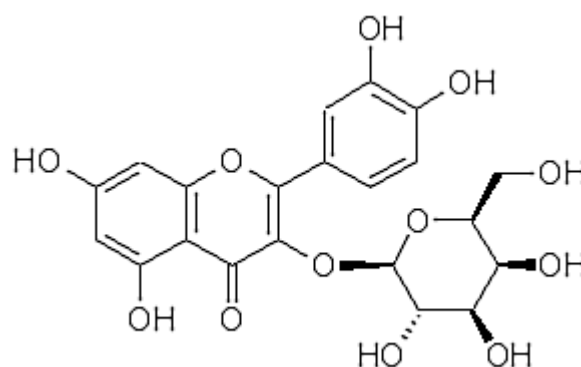
Obsahové látky:

Droga obsahuje nejméně 1,5% flavonoidů počítáno jako hyperosid a nejméně 0,6% flavonu C – glykosidu, počítáno jako vitexin.

Hlavními obsahovými látkami listů jsou flavonoidy – rutin, hyperosid, kvercitrin, kvercetin -3- rhamnogalaktosid, hyperin (kvercetin – 3 – galaktosid) (flavonoly), isokvercitrin, vitexin, vitexin – 2'' - O – rhamnosid, acetylvitexin – 2 – rhamnosid (flavony), spirein, C – glykosidy apigeninu (vicenin), proanthocyanidiny a (-)- epi – katechin. Byla zaznamenána také přítomnost jednoduchých fenolických kyselin – chlorogenová a kávová kyselina. Dále se mezi charakteristické sloučeniny obsažené v hlohu řadí pentacyklické triterpeny (kyselina ursoová a oleanová) a 2 – hydroxyl deriváty oleanové kyseliny, známé jako kyselina crataegová (13,25,26,27)



Vitexin



Hyperosid

Účinky a použití *Folium crataegi cum flore*:

Droga *Crataegi folium cum flore* se tradičně používá ve formě nálevu nebo extraktu jako kardiotonikum a antihypertenzivum (působí pokles jak systolického, tak diastolického krevního tlaku), při lehčích formách koronární a svalové srdeční insuficience (byl schválen komisí E pro použití v New York Heart Association (NYHA), třída I a II) (24, 26, 27), kdy ještě není třeba aplikovat srdeční glykosidy, a při lehčích formách bradykardie. Je nezbytně nutné konzultovat použití s lékařem (13,20, 21, 24, 25, 26, 28). V běžném dávkování není droga toxická a je dobře snášena. Užívá se v nálevu samotná, v čajových směsích, jako tinktura v lihovém výtažku a jako součást mnoha hromadně vyráběných léčivých přípravků (23).

Experimentálními studiiemi *in vitro* i *in vivo* byl prokázán pozitivní inotropní efekt. Na účinku se podílejí biogenní aminy, crataegolová kyselina, epi-katechin, hyperosid, luteolin 7 – glykosid, rutin a vitexin, které mají pozitivní inotropní účinek, prodlužují refrakterní fázi v srdečních myocytech, zvyšují kontraktilitu srdečních buněk (23, 24, 29).

Po intravenózním podání vodného, popřípadě ethanolového (95%) extraktu květů se zvyšuje průtok krve srdcem a srdeční výdej a snižuje periferní rezistenci (23,24, 29).

Další použití je jako doplněk při léčbě chorobného kornatění tepen, po mrtvicích a léčení jejich následků a při poškození srdečního svalu po infekčních onemocněních (například po přečazených chřipkách) (23, 24, 29). Extrakt také snižuje oxidaci LDL (low density lipoprotein) (27).

4 Experimentální část

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Rostlinný materiál

Betulae folium a *Crataegi folium cum flore* byly zakoupeny v prodejně léčivých rostlin Pharmacentrum, Hradec Králové.

4.1.2 Použité chemikálie

Chemikálie použity pro stanovení superoxidu:

Hydrogenfosforečnan draselný

Hydroxid draselný

5 – methylfenazinium – methyl – sulfát Sigma (St. Luis, MO, USA)

β – nikotinamid adenin dinukleotid Sigma (St. Luis, MO, USA)

Nitrotetrazolinová modř Sigma (St. Luis, MO, USA)

Chemikálie použity pro stanovení flavonoidů:

Aceton p.a.

Ethyl acetát p.a.

Chlorid hlinitý p.a.

Kyselina boritá p.a.

Kyselina chlorovodíková p.a.

Kyselina mravenčí bezvodá p.a.

Kyselina octová bezvodá p.a.

Kyselina ledová octová p.a

Kyselina šťavelová p.a.

Lih R 60%

Methanol p.a.

Methenamin p.a.

Síran sodný bezvodý p.a.

Kyselina chlorovodíková RS :

70 g kyseliny chlorovodíkové R zředěno vodou R na 100,0 ml.

Chlorid hlinitý RS1:

2,0 g chloridu hlinitého R se rozpustí ve 100 ml roztoku kyseliny octové ledové R 5% (V/V) v metanolu R.

Standardy:

Trolox (6 – hydroxyl – 2,5,7,8 – tetramethylchroman – 2 karboxylová kyselina)

Sigma – Aldrich laborchemikallen GmbH

L (+) – Ascorbic acid puriss. Sigma – Aldrich laborchemikallen GmbH

Chrysin ROTH Karlsruhe

Kvercetin ROTH Karlsruhe

Apigenin ROTH Karlsruhe

Rutin ROTH Karlsruhe

Vitexin Fluka (Švýcarsko)

Vitexin – 2 –O rhamnosid Fluka (Švýcarsko)

Hypericin ROTH Karlsruhe

Kumarin ROTH Karlsruhe

Kyselina chlorogenová ROTH Karlsruhe

Kyselina kávová ROTH Karlsruhe

Hyperosid ROTH Karlsruhe

Kvercitrin ROTH Karlsruhe

4.1.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy KERN

Ultrazvuková lázeň Bendelin Sonorex

Mikrodávkoč BIOHIT

Dvoupaprskový spektrofotometr Shimadzu

Lyofilizátor MLW – LGA 05, Medizintechnik Leipzig, GDR

Chromatografická sestava Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055)

Kolona LiChrospher RP-18 250x4 (5mm) s ochranou předklonkou
Vakuová odparka Laborta

4.2 Stanovení obsahu flavonoidů dle ČL 2005 (30)

4.2.1 Betulae folium

Příprava výluhu z drogy (základního roztoku):

Navážila jsem 0,200 g práškové drogy (250) a ve 100 ml baňce jsem ji smíchala s 1,0 ml roztoku methenaminu (5g/l), 20,0 ml acetonu a 2,0 ml kyseliny chlorovodíkové a vařila jsem 30 minut pod zpětným chladičem.

Zfiltrovala jsem přes chomáček vaty do 100 ml odměrné baňky. Opět jsem vložila drogu a chomáček vaty do varné baňky a vařila jsem dvakrát 10 minut pod zpětným chladičem s 20,0 ml acetonu .

Po ochlazení jsem zfiltrovala přes filtrační papír do téže odměrné baňky.

Roztok jsem zředila acetonem předem použitým k promytí baňky a filtru na 100,0 ml.

20,0 ml tohoto roztoku jsem převedla do dělicí nálevky, přidala jsem 20 ml vody a protřepávala jsem nejprve s 15,0 ml a pak třikrát s 10,0 ml ethyl acetátu. Spojené horní vrstvy jsem protřepávala dvakrát 50,0 ml vody, vodnou vrstvu jsem odpustila.

Acetátový podíl jsem zfiltrovala přes 10 g síranu sodného bezvodého do 50,0 ml baňky.

Roztok v baňce jsem zředila ethyl acetátem na 50,0 ml.

Zkoušený roztok:

10,0 ml základního roztoku jsem smíchala s 1,0 ml roztoku chloridu hlinitého a zředila jsem ho roztokem kyseliny octové ledové 5 % (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

Kontrolní roztok:

10,0 ml základního roztoku jsem zředila roztokem kyseliny octové ledové 5% (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

Po 30 minutách jsem změřila absorbanici zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů vztaženo na hyperosid jsem vypočítala ze vztahu:

$$\% = \frac{A \times 1,25}{m}$$

kde: A ...absorbance zkoušeného roztoku v maximu při 425 nm
m ... hmotnost drogy v g

Výsledky uvádí tabulka č.3.

4.2.2 Crataegi folium cum flore

Základní roztok:

0,400 g práškové drogy (250) jsem smíchala v 200 ml baňce se 40,0 ml lihu 60% (V/V).

Zahřívala jsem 10 minut na vodní lázni při 60 °C za občasného protřepávání.

Po ochlazení jsem zfiltrovala přes chomáček vaty do 100 ml odměrné baňky. Chomáček vaty jsem vložila ke zbytku drogy ve 200 ml baňce, přidala jsem 40,0 ml lihu 60 % (V/V) a za častého protřepávání zahřívala 10 minut na vodní lázni při 60% . Po ochlazení jsem zfiltrovala do téže odměrné baňky.200 ml baňku i filtr jsem promyla lihem 60% (V/V) a promývací tekutinu jsem přidala do odměrné baňky.

Spojené části jsem zředila lihem 60% (V/V) na 100 ml a roztok jsem zfiltrovala.

Zkoušený roztok:

5,0 ml základního roztoku jsem odpařila v baňce s kulatým dnem na vakuové odparce za sníženého tlaku do sucha. Zbytek jsem rozpustila v 8 ml směsi objemových dílů methanolu a kyseliny octové ledové (10+100) a převedla jsem do 25 ml odměrné baňky. Baňku s kulatým dnem jsem promyla 3 ml směsi objemových dílů methanolu a kyseliny ledové octové (10+100) a promývací tekutinu jsem převedla do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku jsem přidala 10,0 ml roztoku, který obsahuje kyselinu boritou (25,0 g/l) a kyselinu šťavelovou (2,0 g/l) v kyselině mravenčí bezvodé a zředila jsem kyselinou octovou bezvodou na 25,0 ml.

Kontrolní roztok:

5,0 ml základního roztoku jsem odpařila v baňce s kulatým dnem na vakuové odparce za sníženého tlaku do sucha. Zbytek jsem rozpustila v 8 ml směsi objemových dílů methanolu a kyseliny octové ledové (10+100) a převedla jsem do 25 ml odměrné baňky. Baňku s kulatým dnem jsem promyla 3 ml směsi objemových dílů methanolu a kyseliny ledové octové (10+100) a promývací tekutinu jsem převedla do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku jsem přidala 10,0 ml kyseliny mravenčí bezvodé a zředila jsem kyselinou octovou bezvodou na 25,0 ml.

Po 30 minutách jsem měřila absorbanci zkoušeného roztoku proti kontrolnímu roztoku při 410 nm.

Obsah flavonoidů vyjádřeno jako hyperosid jsem vypočítala ze vztahu:

$$\% = \frac{A \times 1,235}{m}$$

kde: A ...absorbance zkoušeného roztoku v maximu při 410 nm

m ...hmotnost drogy v g

Výsledky uvádí tabulka č.4.

4.3 HPLC

HPLC analýza byla prováděna na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), vybavené předkolonovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5mm) s ochranou předkolonkou.

Eluce mobilní fáze probíhala nejdříve isokraticky: od 0 do 8 min., průtok 1 ml/min, 3% acetonitrilu ve vodě (pufr: kys. o-fosforečná, 0,15%).

Od 8 do 40 minuty gradientově: za výše zmíněných podmínek do: průtok 1,4 ml/min, 75% acetonitrilu ve vodě (pufr: kys. o-fosforečná, 0,15%).

Detekce byla provedena pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 200 - 650 nm.

4.4 Zhášení superoxidového radikálu generovaného neenzymaticky

Superoxidový radikál byl generován reakcí 5 – methylfenazinium – methyl – sulfátu (PMS) a nikotinamidudinukleotidu (NADH) postupem popsáním v práci Vrchovská a kol. (3).

4.4.1 Příprava výluhů z drogy

Betulae folium

5,03 g drogy *Betulae folium* jsem rozdrobila (250) a v baňce přelila 500 ml vroucí vody. Přikryla jsem hodinovým sklíčkem a nechala jsem 30 minut vyluhovat. Po 30 minutách jsem výluh zfiltrovala přes Büchnerovu nálevku. Z 5,03 g drogy a 500 ml vody jsem připravila 480 ml výluhu. Výluh jsem v petriho miskách nechala zmrznout a poté byl lyofilizován.

Získáno bylo 1,18 g lyofilizátu, uchováván byl v uzavřené nádobě v exikátoru.

Crataegi folium cum flore

5,0 g drogy *Crataegi folium cum flore* jsem rozdrobila (250) a v baňce přelila 500 ml vroucí vody. Přikryla jsem hodinovým sklíčkem a nechala jsem 30 minut vyluhovat. Po 30 minutách jsem výluh zfiltrovala přes Büchnerovu nálevku. Z 5,0 g drogy a 500 ml vody jsem připravila 330 ml výluhu. Výluh jsem v petriho miskách nechala zmrznout a poté byl lyofilizován.

Získáno bylo 1,0 g lyofilizátu, uchováván byl v uzavřené nádobě v exikátoru.

4.4.2 Příprava činidel pro stanovení antioxidační aktivity

Veškerá činidla byla připravována a používána v den měření.

Pufr - KH_2PO_4 19 mM, pH 7,4:

2,6 g KH_2PO_4 jsem rozpustila ve vodě a doplnila na 1000,0 ml a upravila jsem pH na 7,4 na pH – metru přidáním 0,1 mM roztoku hydroxidu draselného.

NADH 166 μM :

35 mg NADH do 50,0 ml pufru, k rozpuštění jsem využila ultrazvuk.

NBT 43 μM (Nitrotetrazolinová modř):

3,3 mg NBT jsem rozpustila v 50,0 ml pufru.

PMS 2,7 μ M (N – methylphenazonium methylsulfát):

Navážila jsem si asi 0,01g přesně a rozpustila v 1 ml pufru. Vypočetla jsem, v jakém množství tohoto roztoku bude obsažen 1 mg PMS a odpovídající objem roztoku jsem odebrala a doplnila do 1,0 ml pufrů. Z tohoto roztoku jsem odměřila 250 μ l a doplnila do 50,0 ml pufrů.

Vzorek hodnocené drogy:

Navážila jsem si asi 0,6 mg lyofylizované drogy a rozpustila v 1,2 ml pufru.

Roztoky standardů:

Trolox

0,0301 g jsem rozpustila v 10,0 ml pufru.

Kyselina askorbová

0,01 g jsem rozpustila v 10,0 ml pufru.

4.4.3 Vlastní měření antioxidační aktivity

Nejprve jsem zjišťovala aktivitu kontrolního roztoku.

Do kyvety jsem postupně přidávala v níže uvedeném pořadí:

Kontrolní vzorek:

1. 150 μ l roztoku pufru KH_2PO_4 19 mM, pH 7,4
2. 150 μ l roztoku NADH 166 μ M
3. 450 μ l roztoku NBT 43 μ M
4. 150 μ l roztoku PMS 2,7 μ M

Slepý kontrolní vzorek:

1. 150 μ l roztoku pufru KH_2PO_4 19 mM, pH 7,4
2. 150 μ l roztoku NADH 166 μ M
3. 450 μ l roztoku NBT 43 μ M
4. 150 μ l roztoku pufru KH_2PO_4 19 mM, pH 7,4

Následně byla měřena aktivita vzorků:

Vzorek:

1. 150 μ l roztoku vzorku

2. 150 µl roztoku NADH 166 µM
3. 450 µl roztoku NBT 43 µM
4. 150 µl roztoku PMS 2,7 µM

Slepý vzorek:

1. 150 µl roztoku vzorku
2. 150 µl roztoku NADH 166 µM
3. 450 µl roztoku NBT 43 µM
4. 150 µl roztoku pufru KH_2PO_4 19 mM, pH 7,4

Absorbanci jsem měřila ihned po přidání PMS (u vzorku a kontrolního vzorku) resp. pufru (u slepého vzorku a slepého kontrolního vzorku).

Měření jsem prováděla třikrát pro kontrolní vzorek ve dvoupráskovém spektrofotometru nastaveném na kinetickou funkci, při vlnové délce 560 nm, po dobu 2 minut, při pokojové teplotě.

Za stejných podmínek jsem provedla měření pro vzorek, třikrát pro každou koncentraci.

Aktivitu standardů jsem měřila stejně jako vzorek a slepý vzorek.

Výsledek jsem vyjádřila v procentech inhibice redukce NBT v porovnání s kontrolním vzorkem.

Inhibici redukce NBT jsem vypočítala podle vzorce:

$$\% \text{ inhibice redukce NBT} = (1 - A_v / A_k) \times 100$$

kde: A_v nárůst absorbance testovaného vzorku v čase $t = 2 \text{ min}$

A_k nárůst absorbance kontrolního vzorku v čase $t = 2 \text{ min}$

Výsledky měření aktivity pro drogu *Betulae folium* jsou uvedeny v tabulkách 7 - 10 a obr. 5- 6.

Výsledky měření aktivity pro drogu *Crataegus laevigata* jsou uvedeny v tabulkách 11 - 15 a obr. 7 - 8.

Jako porovnávací látky byly použity Trolox a kyselina askorbová. Výsledky uvádí tabulka 16 a 17 obr. číslo 9 a 10.

4.5 Výsledky

4.5.1 Stanovení obsahu flavonoidů v drogách

Tab. č.3 Obsahu flavonoidů v droze *Betulae folium*

vzorek č.	Navážka (g)	A	obsah flavonoidů %	průměrný obsah %	s
1	0,2217	0,305	1,72	1,7567	0,0591
2	0,2044	0,279	1,71		
3	0,2068	0,305	1,84		

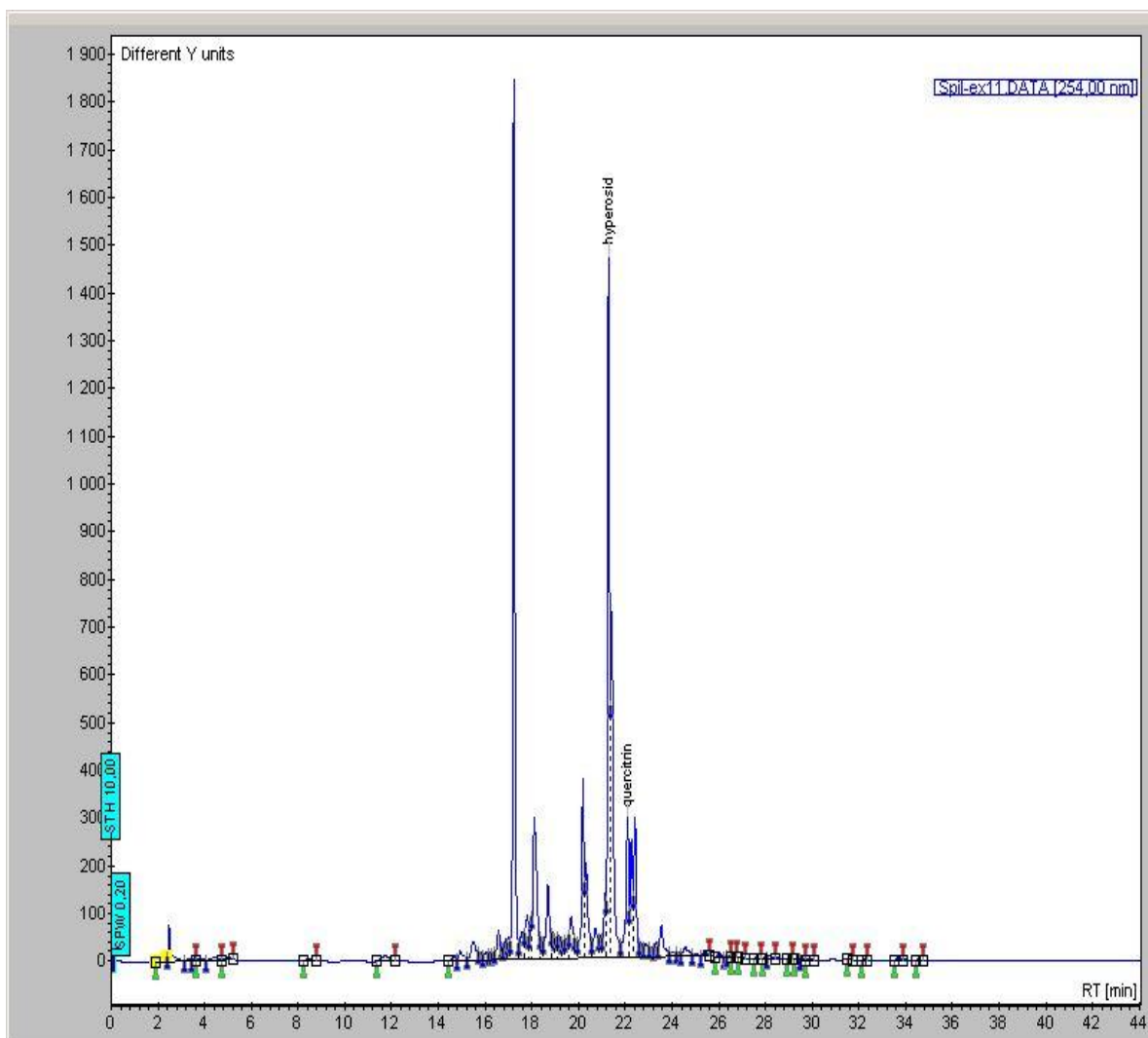
Tab. č. 4 Obsahu flavonoidů v droze *Crataegi folium cum flore*

vzorek č.	Navážka (g)	A	obsah flavonoidů %	průměrný obsah %	s
1	0,4161	0,565	1,68	1,5533	0,1212
2	0,4028	0,453	1,39		
3	0,4026	0,519	1,59		

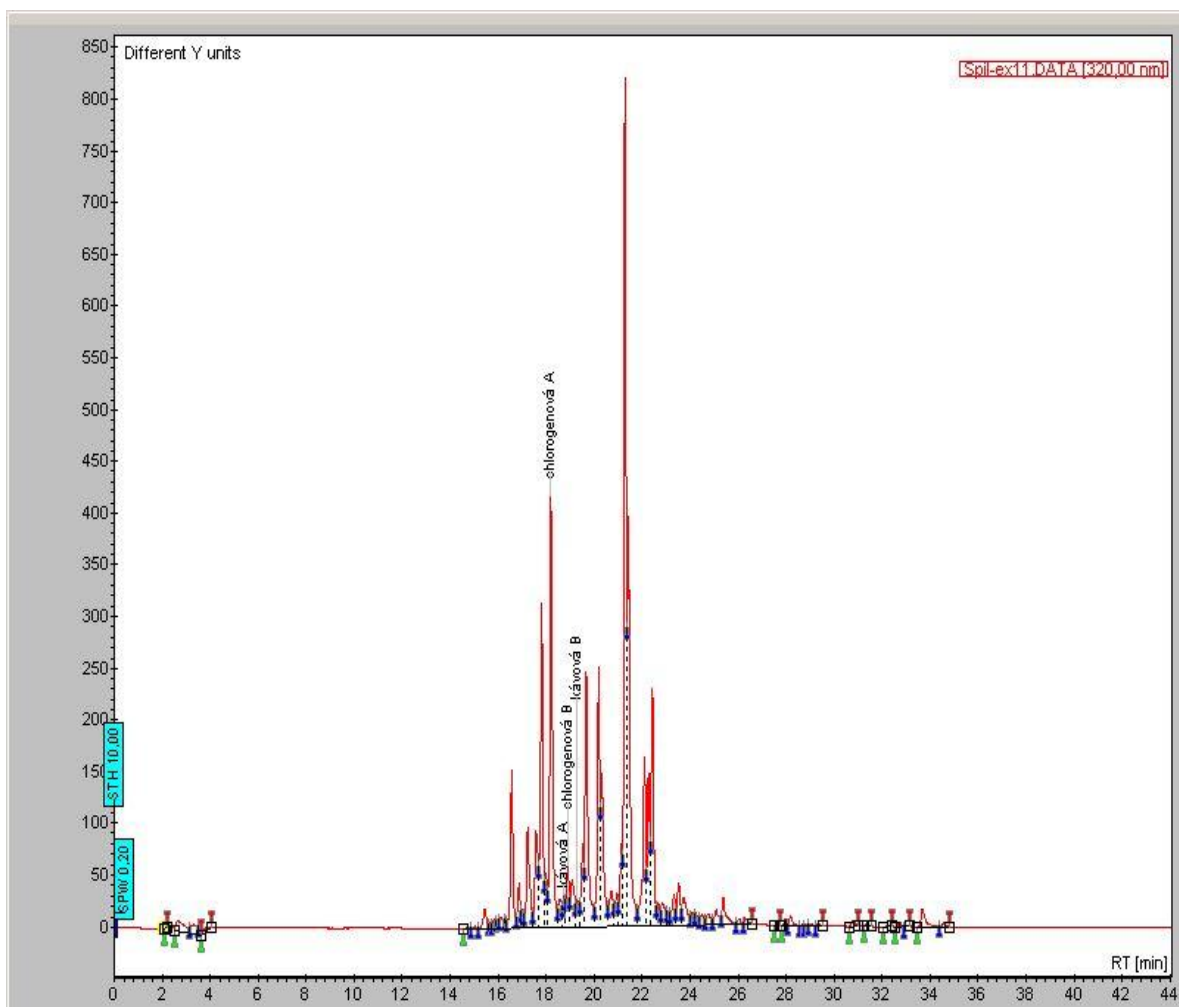
4.5.2 HPLC

4.5.2.1 HPLC profil látek ve vodném výluhu z drogy *Betulae folium*

Obr. č.1:HPLC profil flavonoidů obsažených v droze *Betulae folium*. Detekce při 254 nm. Vyznačeny píky hyperosidu a kvercitrinu.



Obr. č.2:HPLC profil hydroxyskořicových kyselin v droze *Betulae folium*.
 Detekce při 320 nm. Vyznačeny píky: kyselina chlorogenová A, kyselina
 chlorogenová B, kyselina kávová A a kyselina kávová B.

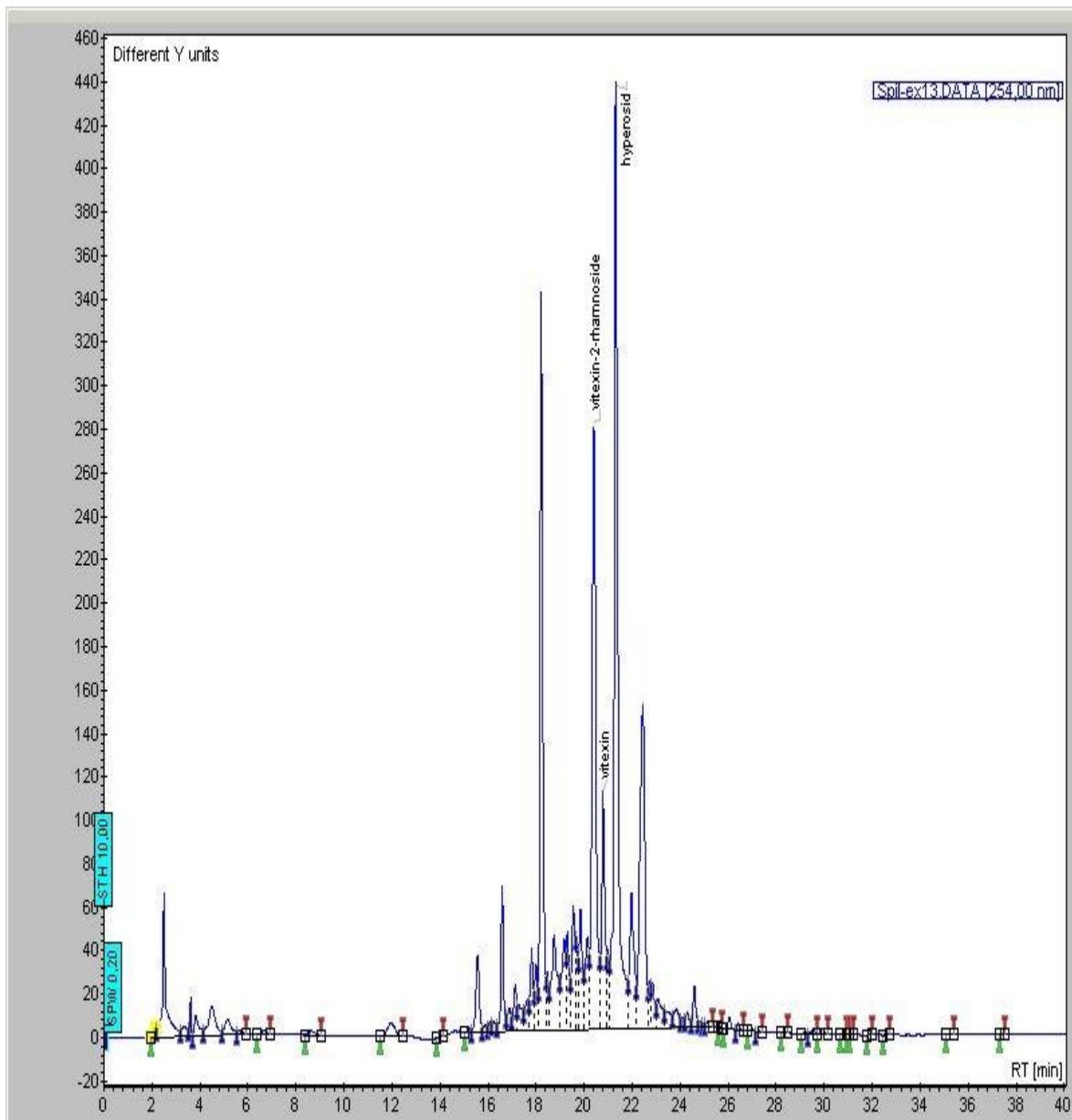


Tab. č.5 Obsah fenolických látek dokázaných ve vodném výluhu z drogy
Betulae folium

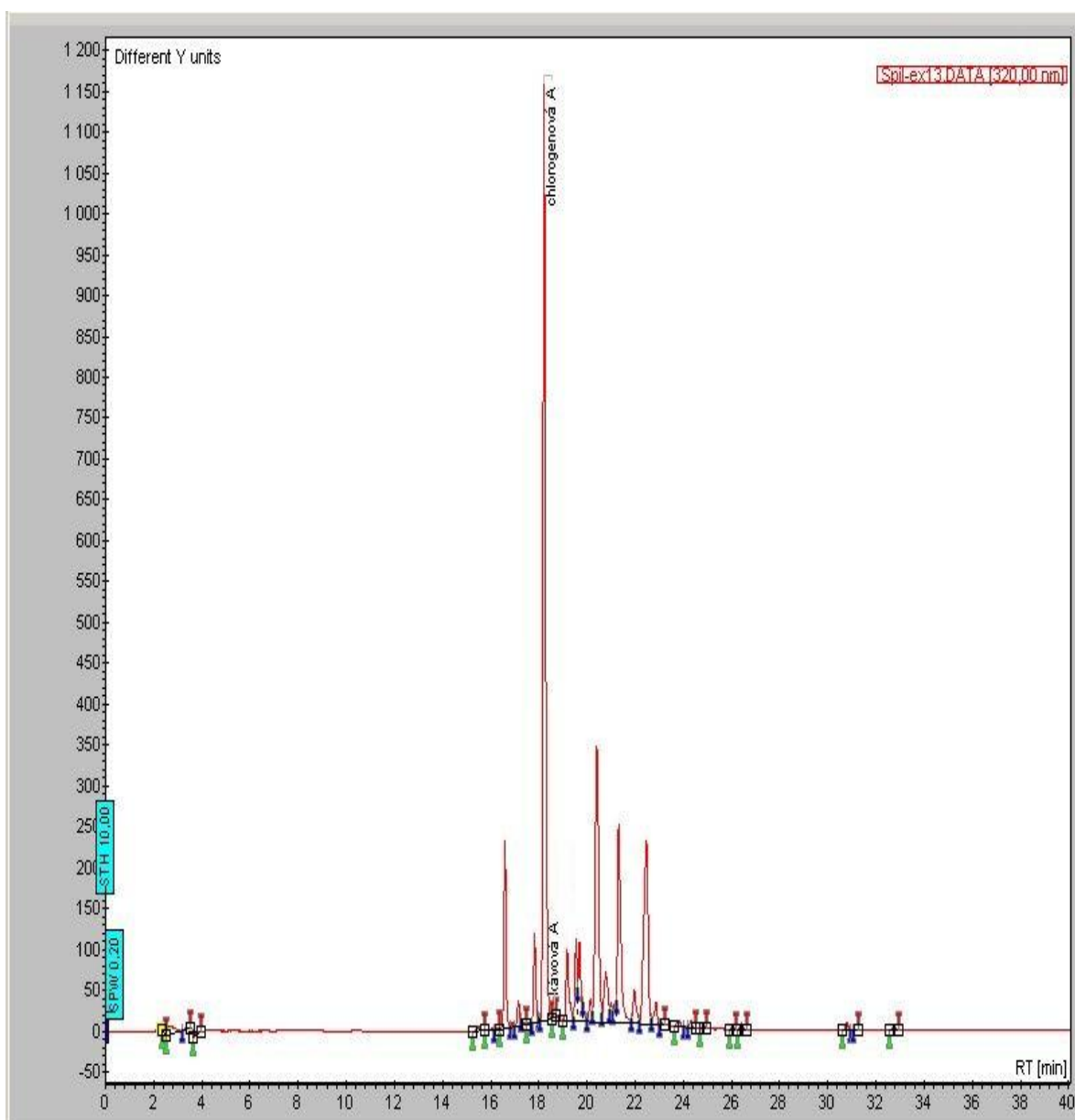
látka	obsah (%)
hyperosid	0,80
kvercitrin	0,13
kyselina chlorogenová	0,07

4.5.2.2 HPLC profil látek ve vodném výluhu z drogy *Crataegi folium cum flore*

Obr. č.3: HPLC profil flavonoidů obsažených v droze *Crataegi folium cum flore*. Detekce při 254 nm. Vyznačeny jsou píky: hyperosid, vitexin – 2 – rhamnosid a vitexin.



Obr. č.4: HPLC profil organických kyselin obsažených v droze *Crataegi folium cum flore*. Detekce při 320 nm. Vyznačeny píky: kyselina chlorogenová A a kyselina kávová A.



Tab.č.6 Obsah fenolických látek dokázaných ve vodném výluhu z drogy *Crataegi folium cum flore*

látka	obsah (%)
hyperosid	0,30
kyselina chlorogenová	0,30
vitexin – 2''-O - rhamnosid	0,20
vitexin	0,07

4.5.3 Zhášení superoxidového radikálu

4.5.3.1 Aktivita nálevu *Betulae folium*

Tab.č.7 Vzorek č.1

koncentrace $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$	2,9500	6,5625	18,7500	37,5000	75,0000	kontrola
1. měření	0,1167	0,0711	0,0298	0,0159	0,0096	0,0805
2. měření	0	0,0740	0,0341	0,0141	0,0097	0,0737
3. měření	0	0,0755	0,0314	0,0174	0,0088	0
průměrná absorbance	0,1167	0,0735	0,0318	0,0158	0,0094	0,0771
inhibice redukce NBT %	-51,3619	4,6260	58,7981	79,5071	87,8513	

Tab. č.8 Vzorek č.2

koncentrace $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$	2,9500	6,5625	18,7500	37,5000	75,0000	kontrola
1. měření	0,0820	0,0616	0,0248	0,0141	0,0079	0,0844
2. měření	0,0728	0,0637	0,0310	0,0140	0,0089	0,0907
3. měření	0,0666	0,0625	0,0254	0,0141	0,0079	0
průměrná absorbance	0,0738	0,0626	0,0271	0,01401	0,0082	0,0876
inhibice redukce NBT %	15,7053	28,4980	69,0843	83,9330	90,5958	

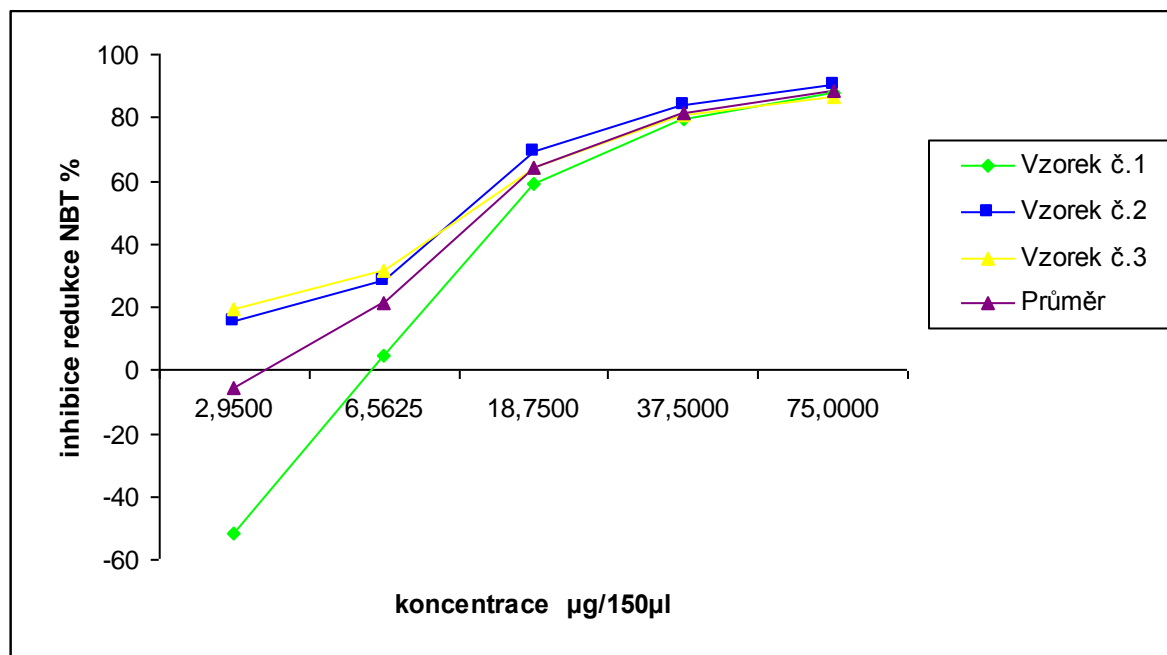
Tab.č.9 Vzorek č.3

koncentrace $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$	2,9500	6,5625	18,7500	37,5000	75,0000	kontrola
1. měření	0,0531	0,0459	0,0245	0,0130	0,0080	0,0652
2. měření	0,0548	0,046	0,0256	0,0136	0,0115	0,0731
3. měření	0,0588	0,0500	0,0241	0,0130	0,0082	0
průměrná absorbance	0,0556	0,0473	0,0247	0,0132	0,0092	0,0692
inhibice redukce NBT %	19,6433	31,5980	64,2323	80,9111	86,6474	

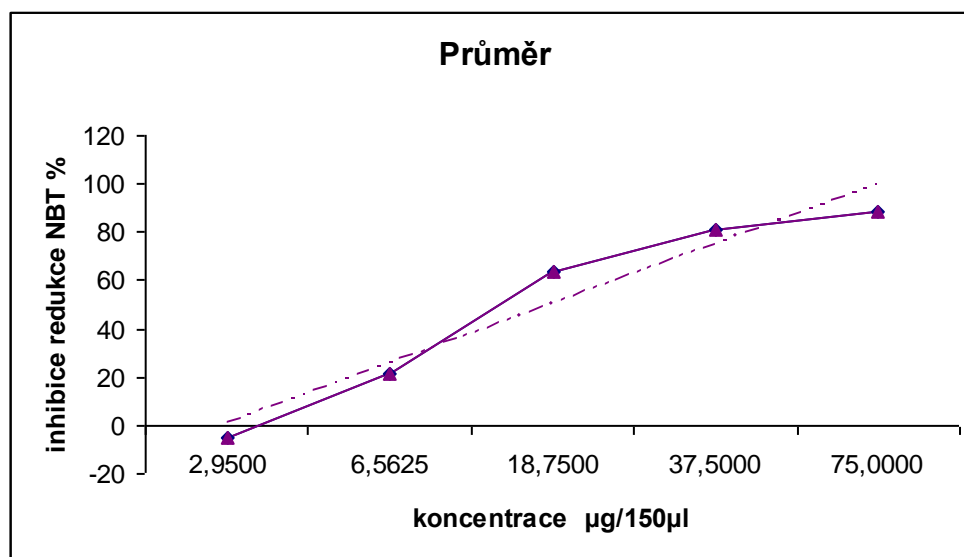
Tab.č.10 Průměrné hodnoty inhibice redukce NBT

koncentrace $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$	2,9500	6,5625	18,7500	37,5000	75,0000	
inhibice redukce NBT %	-5,3378	21,5740	64,0383	81,4504	88,3649	
s	32,5837	12,0507	4,2016	1,8467	1,6523	

Obr. č.5 Závislosti inhibice NBT na koncentraci lyofilizátu vodného výluhu drogy *Betulae folium*



Obr. č.6 Účinek nálevu *Betulae folium* na redukci NBT. Uvedené hodnoty jsou průměrem tří měření provedených třikrát.



4.5.3.2 Aktivita nálevu *Crataegi folium cum flore*

Tab.č 11 Vzorek č.1

koncentrace µg/150 µl	2,9500	6,5625	18,7500	37,5000	75,0000	kontrola
1. měření	0,0870	0,0686	0,0407	0,0264	0,0077	0,0918
2. měření	0,0804	0,064	0,0386	0,0268	0	0,0916
3. měření	0,0802	0,0679	0,0365	0,0271	0	0
průměrná absorbance	0,0825	0,0668	0,0386	0,0268	0,0077	0,0917
inhibice redukce NBT %	9,9964	27,1174	57,9062	70,8106	91,6031	

Tab.č.12 Vzorek č.2

koncentrace µg/150 µl	2,9500	6,5625	18,7500	37,5000	75,0000	kontrola
1. měření	0,0708	0,0520	0,0292	0,0208	0,0174	0,0895
2. měření	0,0811	0,0517	0,0293	0,0202	0,0168	0,0804
3. měření	0,0821	0,0516	0,0268	0,0216	0,0142	0
průměrná absorbance	0,0780	0,0518	0,0284	0,0209	0,0161	0,0849
inhibice redukce NBT %	8,1813	39,0622	66,5293	75,4365	81,0084	

Tab.č.13 Vzorek č.3

koncentrace µg/150 µl	2,9500	6,5625	18,7500	37,5000	75,0000	kontr. 1	kontr. 2
1. měření	0,1411	0,0590	0,0379	0,0234	0,0169	0,0817	0,1493
2. měření	0,1549	0,0540	0,0389	0,0248	0,0169	0,0818	0,1562
3. měření	0,1499	0,0540	0,0386	0,0249	0,0165	0	0
průměrná absorbance	0,1486	0,0557	0,0385	0,0244	0,0168	0,0818	0,1528
inhibice redukce NBT %	2,6950	31,9062	52,946	70,1937	79,4903		

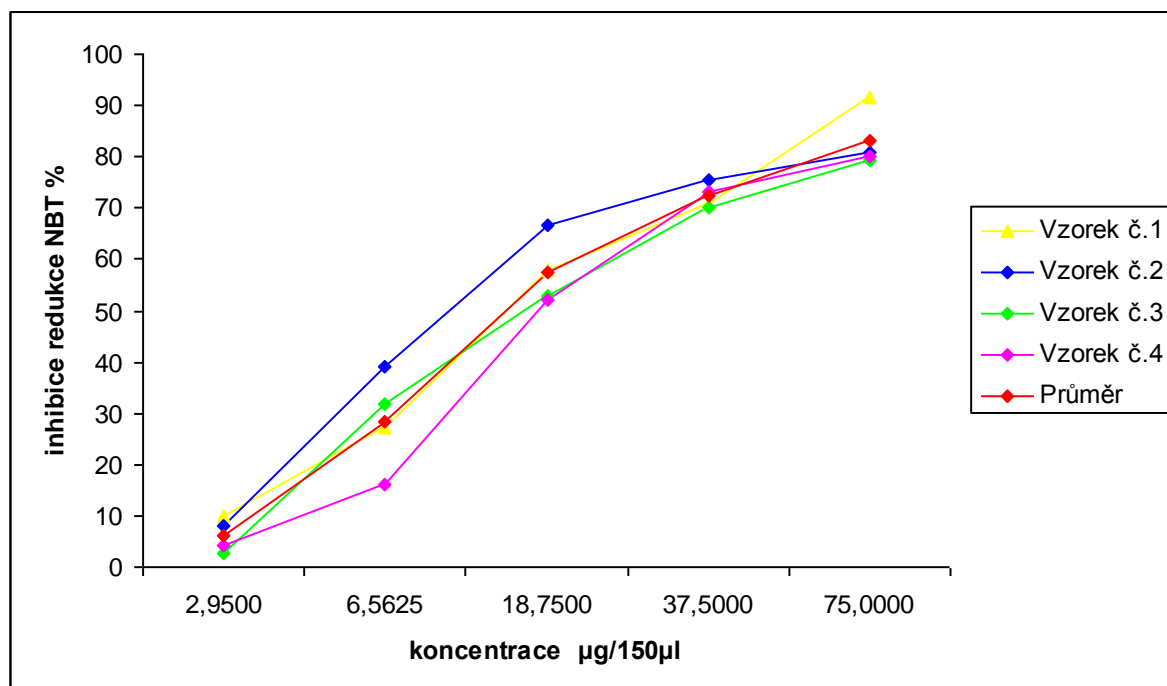
Tab.č.14 Vzorek č.4

koncentrace µg/150 µl	2,9500	6,5625	18,7500	37,5000	75,0000	kontrola
1. měření	0,1405	0,1376	0,0731	0,0428	0,0304	0,1493
2. měření	0,1509	0,1294	0,0964	0,0345	0,0302	0,1562
3. měření	0,1473	0,1180	0,0691	0,0448	0,0307	0
průměrná absorbance	0,1462	0,1283	0,0795	0,0407	0,0304	0,1528
inhibice redukce NBT %	4,2662	15,9847	52,0676	73,3552	80,0764	

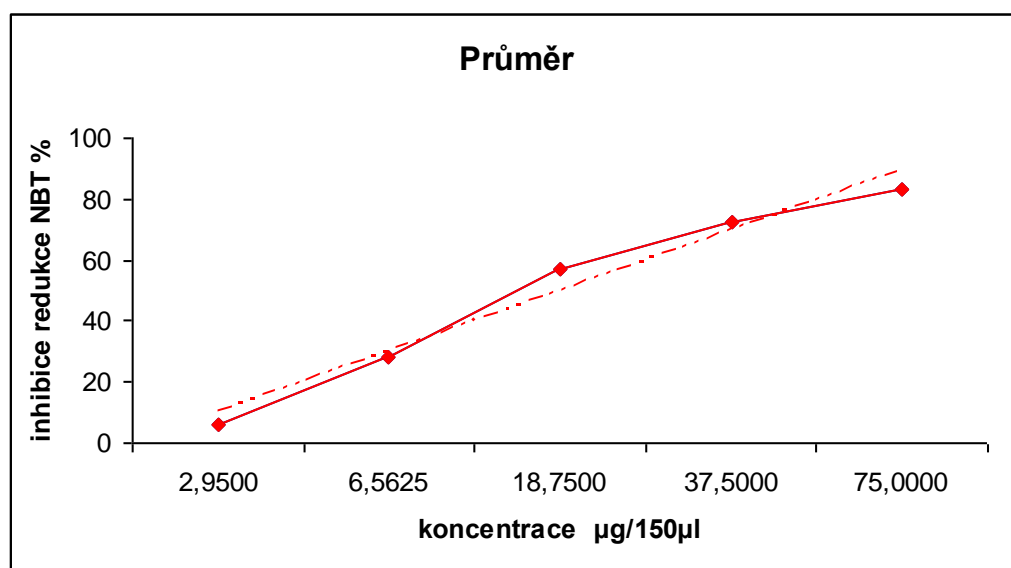
Tab.č.15 Průměrné hodnoty inhibice NBT

koncentrace $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$	2,9500	6,5625	18,7500	37,5000	75,0000
inhibice redukce NBT %	6,2847	28,5176	57,3623	72,4490	83,0445
s	2,9298	8,3920	5,7417	2,0927	4,9708

Obr. č.7 Závislosti inhibice NBT na koncentraci lyofilizátu vodného výluhu drogy *Crataegi folium cum flore*



Obr. č.8 Účinek nálevu *Crataegi folium cum flore* na redukci NBT. Uvedené hodnoty jsou průměrem čtyř měření prováděných třikrát.

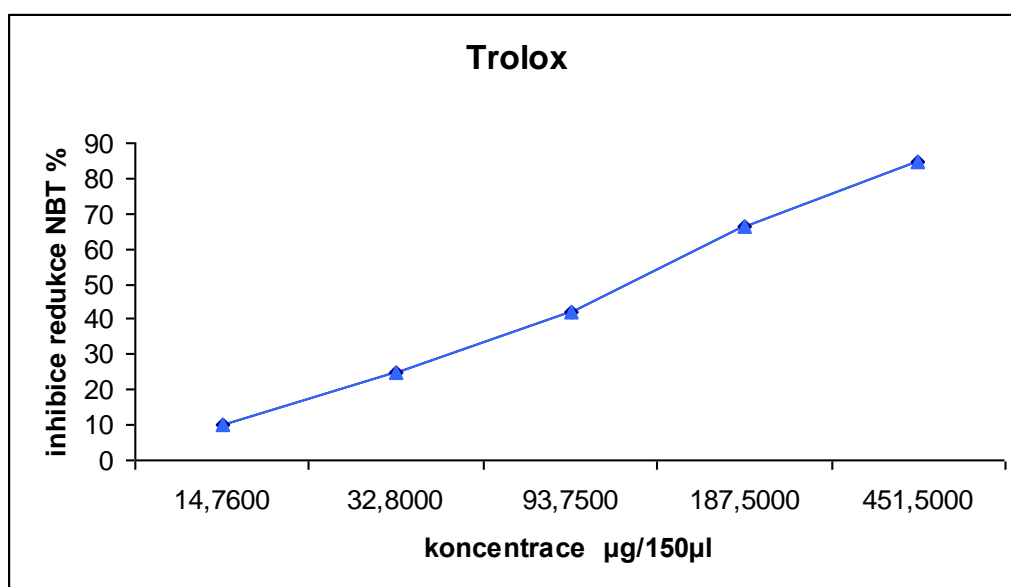


4.5.3.3 Aktivita Troloxu

Tab.č.16 Výsledky měření zhášení superoxidového radikálu působením standardu Troloxu

koncentrace $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$	14,7600	32,8000	93,7500	187,5000	451,5000	kontrola
1. měření	0,1179	0,0936	0,0744	0,0402	0,0194	0,1203
2. měření	0,1180	0,0956	0,0751	0,0429	0,0172	0,1276
3. měření	0,1016	0,0941	0,0683	0,0439	0,0219	0,1277
průměrná absorbance	0,1125	0,0944	0,0726	0,0423	0,0195	0,1252
inhibice redukce NBT %	10,1438	24,6006	42,0128	66,2141	84,4249	

Obr č.9 Účinek Troloxu na redukci NBT

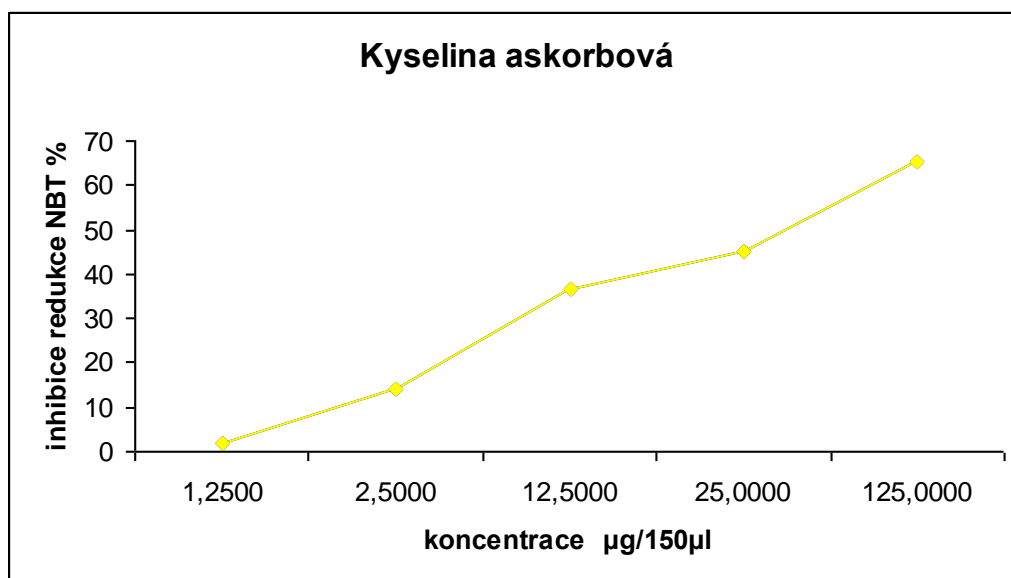


4.5.3.4 Aktivita kyseliny askorbové

Tab.č. 17 Výsledky měření zhášení superoxidového radikálu kyseliny askorbové

koncentrace $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$	1,2500	2,5000	12,5000	25,0000	125,0000	kontrola
1. měření	0,0764	0,0642	0,0507	0,0457	0,0275	0,0719
2. měření	0,0789	0,0763	0,0457	0,0469	0,0260	0,0920
3. měření	0,0859	0,0704	0,0597	0,0427	0,0316	0
průměrná absorbance	0,0804	0,0703	0,0520	0,0451	0,0284	0,0820
inhibice redukce NBT %	1,8914	14,2160	36,5060	44,9664	65,3854	

Obr. č.10 Účinek kyseliny askorbové na redukci NBT



5 Diskuse

Superoxidový radikál je jednoelektronová redukována forma molekulárního kyslíku. Je prekurzorem dalších ROS, jako H_2O_2 , hydroxylového radikálu a singletového kyslíku, které potom reagují s biologickými makromolekulami, napadají fosfolipidy, membránové a cytosolické proteiny, což vede k přerušení důležitých metabolických cest, membránovému poškození, poruše elektrolytové rovnováhy a nakonec k buněčné nekroze (31).

Superoxidový radikál je v organismu produkován převážně NADPH oxidázou. Na jedné straně je produkce superoxidu NADPH oxidázou prostředek neutrofilů a makrofágů k odstranění zbytků mrtvých buněk a k zabíjení bakterií, na druhé straně však studie ukazují, že vzrůst superoxidového radikálu má za následek vývoj kardiovaskulárních onemocnění jako jsou hypertenze a hypercholesterolemie (32).

Flavonoidy patří mezi látky v přírodě hojně zastoupené. Mají významnou antioxidační aktivitu, která je dávana do souvislosti s řadou biologických účinků, které byly u flavonoidů a je obsahujících drog popsány. Jejich antioxidační aktivita je *in vitro* dobře prostudovaná (3, 6, 13, 16, 17, 25). Pro antioxidační aktivitu je důležité, aby v molekule flavonoidu byly hydroxylové skupiny vázané na uhlíky 3, 5, 7, 3', 4', jako jsou například u kvercetinu (14).

Schopnost flavonoidů zhaset reaktivní formy kyslíku, zejména OH^- a $\text{O}_2^{\bullet-}$ byla předmětem řady studií. Zpravidla je produkce superoxidu generována enzymaticky, v systému xantin / xantinoxidáza. (33)

Tvorbu $\text{O}_2^{\bullet-}$ více či méně inhibují například flavonoidy fisetin, myricetin, rutin, kempferol, kvercetin, 7,8 – dihydroxyflavon, chrysin, galangin, morin a apigenin s hodnotami IC_{50} 11,1 – 245,5 μM . Účinek je dán zejména inhibicí xantinoxidázy. Kvercetin, ale také (-) katechin nebo fisetin také přímo zhasí superoxid v systému PMS – NADH (33).

Flavonoidy a další fenolické látky se významně podílejí na antioxidační aktivitě extraktů rostlin. V této práci byla zjišťována antioxidační aktivita extraktů z drog *Betulae folium* a *Crataegi folium cum flore*. Nejprve byla sledována přítomnost látek, které mohou být zodpovědné za antioxidační aktivitu extraktů.

Postupem dle ČL 2005 (30) (spektrofotometricky) bylo v *Betulae folium* zjištěno $1,7567 \pm 0,0591\%$ flavonoidů (viz tab. 3). V *Crataegi folium cum flore* byl obsah flavonoidů $1,5533 \pm 0,1212\%$ (viz tab. 4). Zastoupení jednotlivých flavonoidů ukazují HPLC chromatogramy (obr. č. 1 – 4). Ve vodném výluhu *Betulae folium* jsou obsaženy flavonoidy: hyperosid 0,8 %, kvercitrin 0,13 % (obr.1, tab. 5).

Ve vodném výluhu *Crataegi folium cum flore* jsou obsaženy flavonoidy: hyperosid 0,3 %, vitexin – 2''- O – rhamnosid 0,2 %, vitexin 0,07 % (obr. 3, tab. 6).

Další fenolické látky, které jsou z literatury známé svojí antioxidační aktivitou jsou hydroxyskořicové kyseliny. Ve studovaných drogách byly zastoupeny kyselina chlorogenová 0,07 % v *Betulae folium* (obr. 2, tab. 5) a kyselina chlorogenová 0,3 % a kyselina kávová v *Crataegi folium cum flore* (obr. 4, tab. 6).

Superoxidový radikál byl generován neenzymaticky postupem popsaným v práci Vrchovska a kol. (3). V systému PMS – NADH – NBT redukuje superoxid vytvořený reakcí PMS / NADH nitrotetrazolinovou modř (NBT). Redukce NBT na modře zbarvený formazan byla sledována spektrofotometricky. Pokles absorbance při 560 nm dosažený antioxidantem pak indikuje zhášení superoxidu v reakční směsi. Výsledky měření jsou v tabulkách 7 – 10 pro *Betulae folium* a 11 – 15 pro *Crataegi folium cum flore*. Inhibiční efekt vodných výluhů drog *Betulae folium* a *Crataegi folium cum flore* na tvorbu superoxidového radikálu je znázorněn na obr. 5 – 8. Vodné výluhy měly na koncentraci závislou zhášecí aktivitu superoxidového radikálu, s IC_{50} 23,8267 $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$ u *Betulae folium* a IC_{50} 24,4712 $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$ u *Crataegi folium cum flore*. Aktivita *Crataegi folium cum flore* je tedy srovnatelná s aktivitou *Betulae folium*. Podobný je i obsah potenciálních antioxidantů jak ukazují tab. 4 – 6. Ve srovnání se standardy je IC_{50} lyofyлизátu *Betulae folium* 6 x vyšší než IC_{50} Troloxu a 2x vyšší než IC_{50} kyseliny askorbové. Toto zjištění je překvapující, neboť kyselina askorbová i Trolox jsou považovány za jedny z nejsilnějších antioxidantů. Na antioxidační aktivitě extraktů z drog se zřejmě podílí soubor látek.

V práci (34) byl zjištěn vliv extraktů z plodu hlohu *C. aronia* na snížení oxidace LDL. V plodech hlohu jsou obsaženy tyto flavonoidy, které se podílí na účinku: hyperosid, isokvercitrin, kvercetin a rutin, dále potom epikatechin. Tyto flavonoidy se nachází též v droze *Crataegi Folium cum flore*, jejíž aktivitu jsem sledovala.

Mechanismus, jak flavonoidy obsažené v hlohu snižují oxidaci LDL, spočívá v chelaci a inaktivaci Cu^{2+} iontů, ty se pak nemohou zapojit do Fentonovy reakce a nedochází k přeměně superoxidového radikálu na nebezpečný hydroxylový radikál.

V mechanismu onemocnění kardiovaskulárního systému se účastní i nadprodukce volných radikálů. Z fytoterapie se v dnešní době na srdeční onemocnění nejvíce užívá právě hloh. Je používán ve formě standardizovaných roztoků, tablet, je součástí i čajových směsí. *Betulae folium* se využívá hlavně pro svůj močopudný účinek, používá se při zánětech močových cest a ledvinných kaméncích. Je hlavní složkou čajů *Species urologiceae* a *Sp. diureticae*. Mechanismus účinku však není znám, neboť existuje jen velmi málo, nebo spíše téměř žádné studie objasňující tuto problematiku. Antioxidační aktivita extraktů prokázaná u studovaných drog podporuje názor na prospěšnost užívání extraktů flavonoidních drog při prevenci onemocnění spojených s oxidačním stresem.

6 Závěr

V práci byla sledována schopnost vodných extraktů flavonoidních drog *Betulae folium* a *Crataegi folium cum flore* zhášet superoxidový radikál.

Superoxid byl generován reakcí NADH / PMS / NBT.

Obsah flavonoidů v drogách byl stanoven spektrofotometricky a HPLC.

Betulae folium obsahuje $1,7567 \pm 0,0591\%$ počítáno jako hyperosid; hlavními látkami ve vodném výluhu byly flavonoidy: hyperosid 0,8 %, kvercitrin 0,13 % a hydroxyskořicové kyseliny: kyselina chlorogenová 0,07 %.

Crataegi folium cum flore obsahuje $1,5533 \pm 0,1212\%$ počítáno jako hyperosid; hlavními látkami ve vodném výluhu byly flavonoidy: hyperosid 0,3 %, vitexin – 2''- O – rhamnosid 0,2 %, vitexin 0,07 % a hydroxyskořicové kyseliny: kyselina chlorogenová 0,3 %.

Vodné výluhy působily zhášení superoxidového radikálu v závislosti na koncentraci s IC_{50} 23,8267 $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$ u *Betulae folium* a IC_{50} 24,4712 $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$ u *Crataegi folium cum flore*.

V porovnání s aktivitou Troloxu ($IC_{50} = 131,9951 \mu\text{g}/150 \mu\text{l}$) a kyseliny askorbové ($IC_{50} = 61,6928 \mu\text{g}/150 \mu\text{l}$) je aktivita *Betulae folium* i *Crataegi folium cum flore* 6x větší než aktivita Troloxu a 2x větší než aktivita kyseliny askorbové.

Antioxidační aktivita extraktů podporuje názor na prospěšnost užívání extraktů flavonoidních drog při prevenci onemocnění spojených s oxidačním stresem.

7 Použitá literatura

1. Poli G. et al.: *Curr Med Chem*, 2004; 11, 1163–1182
2. Cadenas E.: *Ann Rev Biochem*, 1989; 58, 79–110
3. Vrchovská V. et al.: *Food Chem*, 2006 ; 98, 416 – 425
4. Racek J.: *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*, Galen, Praha 2003
5. Valko M. et al.: *Chem Biol Inter*, 2006; 160, 1, 1-40
6. Šípek S. a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*, Grada Publishing, 2000
7. Klaunig J.E. et al.: *Free Radical Toxicol*, 1997; 375–400
8. Klatt P. et al.: *Eur J Biochem*, 2000; 267, 4928–4944
9. Mates J.M. et al.: *Clin Biochem*, 1999; 32, 595–603
10. McCall M.R. et al.: *Free Rad Biol Med*, 1999; 26, 1034–1053
11. Landis G.N. et al.: *Mech Ageing Dev*, 2005; 126, 365–379
12. Knekt P. et al.: *Am J Epidemiol*, 1991; 134, 471–479
13. Škerget M. et al.: *Food Chem*, 2005; 89, 2, 191-198
14. Manach C et al.: *Nutr Res*, 1996; 16, 3, 517-544
15. Kabeya L. M. et al.: *Bioorg Med Chem* , 2007; 15, 3 , 1516-1524
16. Heim K. E. et al.: *J Nutr Biochem*, 2002; 13, 10, 572-584
17. Van Acker S.A.B.E. et al.: *Chem Res Toxicol*, 1996; 9, 1305–1312
18. Cheng I.F. et al.: *Biometals*, 2000; 13, 77–83.
19. Korbelař J. a kol., *Naše rostliny v lékařství*, Nakladatelství Avicenum Praha, 1990, 6.vydání, s. 108, 146
20. Keinänen M. et al.: *J Chromatogr A*, 1998; 793, 370 – 377
21. Bruneton J.: *Pharmacognosy. Phytochemistry. Medicinal Plants.*, Intercept Publ., Hampshire 1999, p. 396 – 398, 763
22. Větvička V. a kol., *Na srdce je srdečník aneb Co prozradí jména rostlin*, Andplay s.r.o, Praha 2006, s. 16, 26
23. Jirásek V., Starý F., *Atlas léčivých rostlin*, Státní pedagogické nakladatelství, 1986, s. 11, 22
24. Valli G. et al.: *J Am Coll Cardiol*, 2002; 39, 7, 1083-1095

25. Svedström U. et al. : *Phytochemistry*, 2002; 60, 8, 821-825
26. Rehwald A. et al.: *J Chromatogr A*, 1994; 677, 25-33
27. Svedström U. et al.: *J Chromatogr A*, 2006; 1112, 103 – 111
28. Long S.R. et al.: *Phytomedicine*, 2006; 13, 9-10, 643-650
29. WHO monographs on selected medicinal plants, vol.2, WHO Ženeva, 2002.
[http://: whqlibdoc.who.int/publications/2002/9241545372.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2002/9241545372.pdf)
30. *Český lékopis 2005*, Grada Publishing, Praha 2005
31. Rump A. F. E. et al: *Gen Pharmacol*, 1995; 26, 3, 603 - 611
32. Tripathi Rakshamani et al.: *Food Chem* , 2007; 100, 81 - 90
33. Hanasaki Y. et al.: *Free Rad Biol Med*, 1994; 16, 6, 845 - 850
34. Ljubuncic P.et al.: *J Ethnopharmacol*, 2005; 101, 1 – 3,153 – 161