

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA FENOLICKÝCH LÁTEK V BETULAE FOLIUM

Vypracovala:	Miluše Skálová
Vedoucí diplomové práce:	doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.
Oponent:	
Datum zadání:	30. 11. 2005
Termín odevzdání:	15. 5. 2007
Datum obhajoby:	5.6.2007

Děkuji doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce, za cenné rady a připomínky k danému tématu. Také děkuji všem pracovníkům katedry farmakognozie za spolupráci při praktické realizaci studie.

OBSAH

1	ÚVOD	4
2	CÍL PRÁCE	6
3	TEORETICKÁ ČÁST	7
3.1	Testování antioxidační aktivity	7
3.1.1	Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu	8
3.2	Betulae folium	8
3.2.1	Matečná rostlina	8
3.2.2	Droga	10
3.2.3	Obsahové látky	10
3.2.4	Účinky a použití	12
3.2.5	Přípravky	14
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	15
4.1	Přístroje	15
4.2	Chemikálie	15
4.3	Materiál	15
4.4	Stanovení antiradikálové aktivity	16
4.4.1	Příprava roztoku DPPH	16
4.4.2	Příprava extraktů drog	16
4.4.3	Postup stanovení antiradikálové aktivity	16
4.5	Stanovení obsahu flavonoidů	17
4.5.1	HPLC analýza	17
4.6	Ztráta sušením	18
5	VÝSLEDKY	19
6	DISKUSE	49
7	ZÁVĚR	52
8	POUŽITÁ LITERATURA	53

1 ÚVOD

Atom, molekula nebo ion, který obsahuje alespoň jeden nepárový elektron ve svém obalu, se nazývá volný radikál. Vzniká z normální částice ztrátou nebo přijetím elektronu. Další možností vzniku by mohlo být homolytické štěpení na dvě částice, kde každá má jeden elektron, ale z důvodu spotřeby velkého množství energie, tato možnost v lidském těle nepřichází v úvahu. ¹

Nejčastější volné radikály jsou reaktivní formy kyslíku: superoxid ($O_2^{\bullet -}$), hydroxylový radikál (OH^{\bullet}), peroxy (ROO^{\bullet}), alkoxy (RO^{\bullet}), hydroperoxy (HO_2^{\bullet}). Reaktivní formy dusíku jsou: oxid dusnatý (NO^{\bullet}) a oxid dusičitý (NO_2^{\bullet}). Jako radikály se chovají i atomy přechodných prvků, jako např. železo, nikl, měď, mangan. ^{2,3}

V organismu vzniká celá řada reaktivních forem kyslíku a dusíku, které mají fyziologický a patogenetický význam. Jen část z nich jsou volné radikály. Jedná se o látky, které jsou díky chybějícímu elektronu málo stabilní a vysoce reaktivní. Proto velmi rychle reagují s různými biologickými strukturami, jako jsou mastné kyseliny, lipidy, aminokyseliny, proteiny, mono- a polynukleotidy i s řadou nízkomolekulárních metabolitů. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. ²

Pro organismus je důležitá rovnováha mezi volnými radikály a antioxidanty. Pokud ovšem převažuje jedna či druhá složka, může dojít k závažným poruchám organismu. Převahu volných radikálů označujeme termínem oxidační stres. Příčiny vzniku volných radikálů jsou exogenní i endogenní. Paradoxně i nadbytek antioxidantů může také zvyšovat oxidační stres. ³

Volné radikály se podílejí na vzniku mnoha onemocnění, někdy jsou dokonce vyvolávajícími faktory vzniku onemocnění, jindy komplikují průběh nemoci. Hrají např. významnou roli v prvopočátcích vzniku aterosklerózy, uplatňují se při vzniku a poté i komplikacích u diabetu, dále zatěžují organismus v průběhu reperfuze po anaerobní práci. Volné radikály mohou působením na DNA způsobit maligní změny buněk, zánětlivé stavy, poškozují klouby při revmatických chorobách, atd. ^{2,3}

Existuje řada onemocnění, na jejichž vzniku a komplikacích se podílejí volné radikály. Proto je nesmírně důležitá antioxidační ochrana organismu. Ochrannými systémy jsou mechanismy zabraňující tvorbě volných radikálů, mechanismy odstraňující již vzniklé volné radikály a reparační systémy odstraňující molekuly, které byly poškozeny volnými radikály.

Antioxidanty (zhašeče) lze rozdělit podle různých kritérií. Podle rozpustnosti ve vodě a v lipidech na antioxidanty hydrofilní, lipofilní a amfofilní. Jejich polarita rozhoduje o průniku přes buněčné membrány. Dále je můžeme dle původu rozdělit na antioxidanty exogenní a endogenní. A také dle jejich chemické struktury na enzymové a neenzymové antioxidanty. ²

V posledních letech vzrůstá zájem o látky, jejichž zdrojem je příroda. Mnoho látek rostlinného původu má žádané antioxidační vlastnosti. Potíže způsobuje chemická nejednotnost účinných látek v rostlině a nestandardnost jejich obsahu v rostlinném materiálu. Novými analytickými přesnými metodami lze tyto problémy odstranit a přípravky z rostlinného materiálu přesně na účinnou látku standardizovat.

K přírodním látkám, které přijímá naše tělo, patří vedle fytofarmak také rostlinná potrava. V ní se vyskytuje celá řada antioxidačně působících látek, které zabraňují vzniku a množení volných radikálů v těle. Například *tokoferoly*, *β-karoten*, *kyselina askorbová*, *selen* a další. Z látek rostlinného původu jsou nejznámější *polyfenolické antioxidanty*. ³ Polyfenoly jsou významnou složkou výživy s antioxidačním účinkem, které jsou obsaženy v rostlinné stravě - ovoci, víně, čaji, kakau aj. Nejznámější z polyfenolů jsou anthocyaniny, flavonoly, flavony, katechiny, aj. ¹

Mnoho experimentálních studií prokazuje příznivý vliv antioxidantů v různých modelech. Na celém světě probíhá mnoho klinických studií zaměřených na působení antioxidantů u člověka. Výzkum nových látek z přírodního materiálu neustále rozšiřuje paletu perspektivních antioxidantů.

2 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo stanovit antioxidační aktivitu výluhů listů břízy sbíraných v během ontogeneze. Z rostlinného materiálu byly připraveny extrakty, stanoven obsah flavonoidů a byly sledovány změny v průběhu ontogeneze. U jednotlivých vzorků byla stanovena antiradikálová aktivita extraktů za použití stabilního radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH).

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Testování antioxidační aktivity

Mnoho různých antioxidantů (např. rostlinných extraktů, čistých látek aj.) má schopnost zhaset radikály a ukončovat radikálovou řetězovou reakci. Tato schopnost může být zjišťována různými metodami. Volba metod je závislá na řadě faktorů. Jde o metody různě náročné jak časově, tak i na vybavení laboratoře. Přímá detekce kyslíkových radikálů není příliš snadná, protože radikály reaktivních forem kyslíku jsou sloučeniny značně reaktivní a mají rozdílnou životnost i chemické vlastnosti. Proto jsou k určování antioxidační aktivity používány stabilní radikálové sloučeniny.⁴

Aktivita antioxidantů může být stanovována přímo v komplexním vzorku nebo v modelových systémech. Tyto modelové oxidační systémy umožňují snadný screening a porovnávání antioxidantů a jsou vhodné i pro zjišťování celkové antioxidační kapacity vzorků.

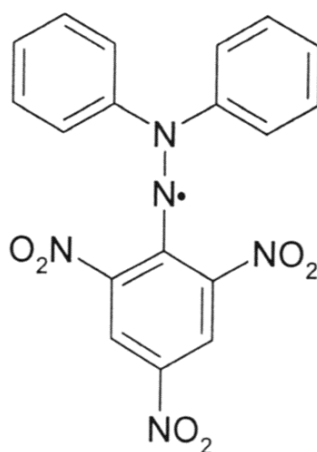
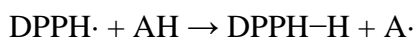
Jako modelové oxidační systémy jsou využívány například :

- peroxidace methyllinoleátu,
- inhibice chemiluminiscence luminolu (5-amino 2,3-dihydro-1,4-ftalazindion),
- inhibice chemiluminiscence tetralinu (1,2,3,4-tetrahydronaftalen),
- inhibice tvorby thiokyanátu železitého,
- odbarvení beta-karotenu,
- odbarvení ABTS⁺ radikálu (2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)),
- odbarvení DPPH radikálu (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl), aj.⁴

Používané detekční metody jsou založeny na spektrofotometrii, HPLC, GC, fluorescenci, chemiluminiscenci.

3.1.1 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu

2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH) (obr.1) je poměrně velmi stabilní radikál, který může být zhašen pouze antioxidantem (AH), který je donorem atomu vodíku.⁵



Obr.1

Při redukci DPPH dochází k poklesu absorpce při charakteristické vlnové délce. Absorpční maximum pro DPPH je při $\lambda = 517$ nm. To se projeví změnou zbarvení roztoku. Důležité je zde zmínit, že k poklesu absorpce dochází také vlivem světla a působením singletového kyslíku.⁵

3.2 *Betulae folium*

Betulae folium je usušený list druhu *Betula pendula* ROTH - bříza bělokorá a *Betula pubescens* EHRH - bříza pýřitá nebo jejich kříženců z čeledi Betulaceae.⁶

3.2.1 Matečná rostlina

Výskyt: Tyto dřeviny, zahrnující asi 120 druhů, jsou rozšířeny v mírném pásmu Evropy, Asie a Severní Ameriky. Některé druhy zasahují i do alpínských i arktických pásem. Jsou to nenáročné dřeviny, daří se jim téměř ve všech půdách, písčité jsou ideální. Snášejí i

nízké teploty i ne příliš čisté ovzduší. Většina druhů patří spíše k parkovým než zahradním okrasným dřevinám, protože potřebují prostorné slunné stanoviště. ⁷

Popis: Jsou to stromy nebo keře, borku mají v mládí hladkou, nejčastěji bílou, u některých druhů je tmavohnědá až černá. Pupeny jsou přisedlé, střežovitě kryté několika šupinami. Samčí jehnědy jsou na konci větví, přezimující, samičí jehnědy přezimují v pupenu zkráceného výhonu. Plodem je jednosemenná křídlatá nažka.

Druhy poskytující lékopisnou drogu jsou:

Druh *Betula pendula* ROTH – bříza bělokorá je strom až 25 m vysoký, s přímým kmenem a nepravidelnou přibližně vejcovitou korunou. Mladou borku má hladkou, žlutavou nebo načervenalou hnědou, ve stáří šedavě bílou až bílou, loupavou, ve stáří v dolní části nepravidelně rozpukanou. Větve nižších řádů jsou jemné, často převislé. Pupeny jsou vejcovité, zašpičatělé, s šupinami na okraji brvitými. Čepel listu je trojúhelníkovitě vejčitá až kosníkovitá, 3-6 cm dlouhá, 2,5 – 5 cm široká, dvojitě pilovitá se špičatě protaženým vrcholem. Barva je na líci svěže zelená, na rubu nasivělá. Druh je proměnlivý především ve vzrůstu, utváření borky, rozměrech i tvarech listů.

Druh *Betula pubescens* EHRH – bříza pýřitá je strom až 20 m vysoký, borku má matně bílou, hladkou, papírovitě příčně se odlupující. Zřetelně hluboce brázditá borka ve spodní části kmene se netvoří. Větve směřují šikmo vzhůru, na konci jsou nepřevísle. Pupeny jsou vejcovité, mírně lepkavé. Čepel listu je eliptická až vejčitá nebo kosníkovitě vejčitá, nejširší blíže poloviny, dlouhá 4-7, ojediněle až 8 cm, široká 2,5-5,0 cm, nepravidelně 2x vroubkovaně pilovitá, krátce špičatá, na bázi zaokrouhlená až mírně srdčitá. Na líci je sytě zelená na rubu bledší, chlupatá. I tento druh je velmi proměnlivý především v habitu, rozměrech a tvaru listů, plodních šupin a křídel nažek. ⁸



Obr. 2 *Betula pendula* ⁹



Obr. 3 *Betula pubescens* ⁹

3.2.2 Droga

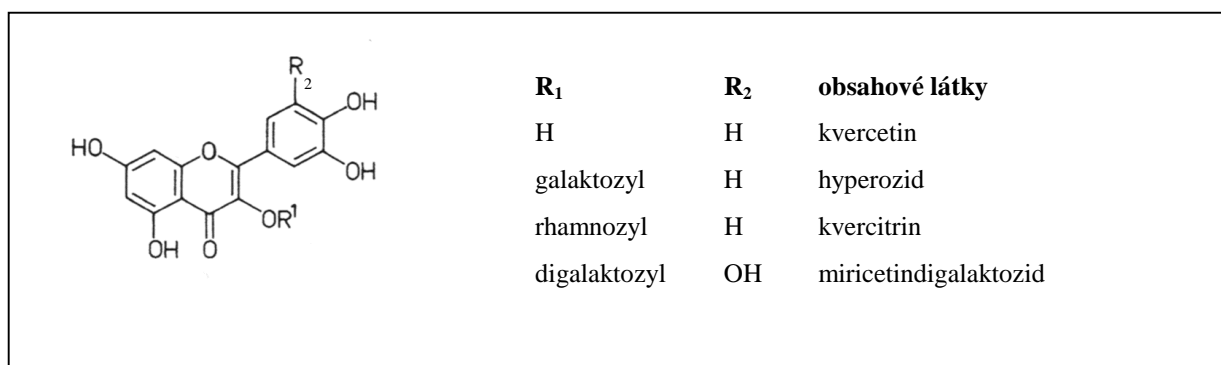
Betula pendula a *Betula pubescens* poskytují podle českého lékopisu drogu *Betulae folium*.

Popis. Pach drogy je slabý, typický, chuť slabá, nahořklá. ⁶

Sběr. Listovou drogu lze získat sběrem z obou druhů a jejich kříženců. Sbírá se na jaře od poloviny května do konce června. Listy se trhají i se stopkou a suší v tenké vrstvě, ve stínu na vzdušném místě. Teplota při umělém sušení by neměla překročit 35 °C. Listy schnou pomalu, ale jsou velmi odolné vůči zapaření. Správně usušené musí být svěže zelené barvy. Sesychací poměr váhy čerstvých listů k váze po správném usušení by měl být 4:1. ^{10, 11}

3.2.3 Obsahové látky

Betulae folium obsahuje látky různé struktury, nejobsáhlejší skupinou jsou flavonoidy, (až 3 %) - zejména glykosidy kvercetinů (1,5 %) a to hlavně kvercetin-3-O-arabinosid, kvercitrin (kvercetin-3-rhamnosid), hyperosid (kvercetin-3-D-galaktosid), rutin (kvercetin-3-rhamnoglukosid). Další glykosidy jsou odvozené od kempferolu a myricetinu (myricetin-3-digalaktozid). ⁶

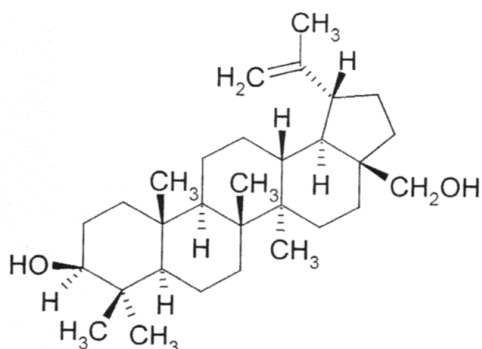


Obr. 4 Flavonoidy ⁶

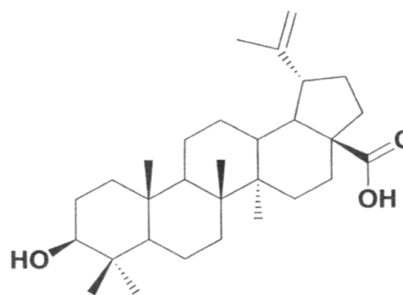
Dále jsou přítomny fenolické kyseliny. Nízkomolekulární fenoly jsou v listech břízy zastoupeny kromě flavonoidních glykosidů i deriváty hydroxybenzoových a hydroxyskořicových kyselin s kyselinou chinovou a glukozou. U listů *B. pubescens* bylo zjištěno, že obsah jednotlivých nízkomolekulárních fenolů v mladých listech je v negativní korelaci se vzdáleností od zdroje znečištění. Týkalo se to zejména látek 1-O-galloyl-beta-D-(2-O-acetyl)-glukopyranosidu, neochlorogenové kyseliny (trans-5 kafeoylchinová k.),

kyseliny trans-5-p-kumaroylchinové a kvercetin 3-O-beta-D-galaktopyranosidu. U zralých listů bylo ovlivněno množství jen u dvou sloučenin 1-O-galloyl-beta-D-(2-O-acetyl)-glukopyranosidu, neochlorogenové kyseliny (trans-5 kafeoylchinová k.). Tyto nálezy naznačují, že akumulace nízkomolekulárních fenolů v listech může být reakcí na stres působený znečištěním vzduchu.¹²

Dále jsou přítomny malonyl estery damaranového typu a triterpenové alkoholy (např. betulín, betulinová kyselina).



Obr. 5 Betulin¹³



Obr. 6 Betulinová kyselina¹⁴

V listech *Betula folium* jsou obsaženy také katechinové třísloviny (asi 5 %). Vysoký obsah gallotaninů byl zaznamenán u *B. pubescens* (ssp *tortuosa*). V mladých listech byl obsah nejvyšší, s růstem a stárnutím listů obsah klesá. HPLC bylo identifikováno 11 různých gallotaninů. Obsah gallotaninů byl přímo úměrný kapacitě extraktu srážet bílkoviny.¹⁵

V listech *Betula pubescens* ssp. *czerepanovii* byly prokázány jak hydrolyzovatelné třísloviny, tak i kondenzované (proanthocyaniciny). V mladých listech probíhá tvorba hydrolyzovatelných tříslovin (prekurzorem je kyselina gallová, v listech břízy je patrně tvořena přímou konverzí z kyseliny 3-dehydrošikimové za katalýzy dehydrošikimát dehydrogenázy II), zatímco ve zralých listech se vyskytuje vysoká hladina proanthocyanidinů.¹⁶

Dále jsou v listech *Betula folium* obsaženy silice (0,1%), pryskyřice, saponiny, slizy, vit. C, karoteny, antibioticky účinné fytoncidy a minerální látky, zejména soli draslíku (např. vínan draselný).¹⁷

Kvantitativně se liší složení obsahových látek u *B.pendula* a *B.pubescens*. Celkový obsah fenolyckých látek zjištěných u *Betula pendula* a *Betula pubescens* v práci od Keimänen Julkunen - Tiitto¹⁸ se lišil jen málo (33,0 mg/g sušiny pro *B. pendula* a 29,0 mg/g sušiny pro *B. pubescens*). V zastoupení jednotlivých látek byly zaznamenány rozdíly. Aglykony na povrchu listu tvoří 6,2 % z celkového množství analyzovaných fenolů listu *B. pubescens* a jen 1,2 % u *B. pendula*. Jako hlavní flavonoidy v *B. pendula* a *B. pubescens* jsou uváděny kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-rhamnozid, myricetin-3-digalaktosid. V některých studiích nebyl myricetin-3-digalaktosid nalezen a hlavním glykosidem myricetinu byl 3-galaktosid.^{18, 19, 20}

Přehled flavonoidů identifikovaných v *B. pendula* a *B. pubescens* je uveden v tab. 1.

Tab. 1 Přehled obsahu fenolyckých látek (mg/g sušiny)

	<i>Betula pubescens</i>	<i>Betula pendula</i>	citace
Kyseliny			
kyselina galová	0,14	+	19
1-O-galoyl-β-D-glukopyranóza	1,11	+	19
kyselina neochlorogenová	0,44	0,54 0,6	19 18
kyselina chlorogenová	2,7 20,42	4,2 1,28	18 19
kyselina p-kumarová a deriváty	1,1	0	18
kyselina cis-kumaroylchinová	0,17	0,33	19
kyselina trans-kumaroylchinová	0,31	0,67	19
katechin	0,6 0,8	+	18 20
Flavonoidy			
myricetin-3-O-β-D-glukoronopyranosid	1,16 0,94	1,45	19 20
myricetin-3-O-β-D-galaktopyranosid	0,8 0,56	0,21	19 20
myricetin-L-(acetyl)-rhamnopyranosid	1,65 1,07	8,66	19 20
kvercetin-3-O-β-D-glukoronopyranosid	4,92 2,55	0,77	19 20
kvercetin-3-O-β-D-galaktopyranosid	1,41 1,49	0,07	19 20
kvercetin-3-O-α-L-arabinofuranosid	1,88 1,45	1,95	19 20
kvercetin-3-O-α-L-rhamnopyranosid	+	0,33	19
	2,63		20
kvercetin-glykosid	0,65 0,65	+	19 20
kempferol-3-O-α-L-rhamnopyranosid	1,18 1,03	+	19 20
kempferol-3-O-β-D-glukopyranosid	1,56 1,3	0,19	19 20
naringenin	0,07 0,3	0	19 20

+ udává množství méně než 0,05 mg / g

3.2.4 Účinky a použití

Droga se používá jako diuretikum, diaforetikum a je obsažena v mnoha čajových směsích. Výhoda je, že droga nemá vedlejší účinky a je šetrná, protože zvýšené vylučování moče není provázeno drážděním ledvin.¹⁰ Tento účinek je dán převážně obsahem saponinů, ale i přítomností silic a slizů. Při léčbě chorob močových cest se podílí i obsah protizánětlivě působících flavonoidů.^{11, 17}

V herbářích je doporučován nálev nebo odvar, který se používá při chorobách močových cest a dně, ale i při revmatismu. Odvar se někdy používá i zevně při přípravě koupelí a k omývání při revmatismu a hemeroidech. Používaly se i pupeny pro kosmetické účely a prášek z kůry se dřív používal k zasypání lišejů. Z kůry a dřeva se destilací získával březový dehet (*Pix betulae*) na kožní onemocnění. Dříve se získávala březová šťáva k ošetřování vlasů navrtáváním kmenů. V severských oblastech kvašením mízy vzniká březové víno.^{11, 17}

Droga má také slabý desinfekční účinek, způsobený obsahem antibioticky účinných fytoncidů. Z třiceti testovaných rostlin měla *B. pubescens* nejsilnější antimikrobní účinek na gram-pozitivní bakterii *Staphylococcus aureus*. Má také slabý antimikrobní vliv na *E.coli*.²¹

U metanolových extraktů z kůry *Betula platyphylla* var. *japonica* byla zjištěna významná antioxidační a protinádorová aktivita. U extraktů *B. platyphylla* var. *japonica* byla zjištěna schopnost chránit myší játra před experimentálně navozeným jaterním poškozením.²² Extrakt působil protektivně proti oxidaci peroxidem vodíku na modelu buněčné linie plicních fibroblastů křečka (V79-4) a indukoval apoptózu na lidských promyelocytárních leukemických buňkách (HL-60). Životaschopnost buněk, na které působil peroxid vodíku byla významně zvýšena. Extrakty také vykazovaly DPPH zhášecí aktivitu s IC_{50} 2,4 $\mu\text{g/ml}$ (resveratrol užitý jako kontrola měl IC_{50} 4,8 $\mu\text{g/ml}$) a inhibovaly lipidovou peroxidaci (IC_{50} pod 4,0 $\mu\text{g/ml}$). Působením extraktu také došlo ke snížení počtu V79-4 buněk zastavených ve G_2 / M fázi buněčného cyklu jako reakce na působení peroxidu vodíku a zvyšoval aktivitu několika buněčných antioxidačních enzymů jako je superoxid dismutáza, kataláza a glutathion peroxidáza. Působením extraktu byla indukována cytotoxicita a apoptóza u HL-60 buněk, jak se ukázalo zvýšenou fragmentací nukleosomální DNA v subdiploidní populaci buněk a fluorescenční mikroskopií. Působením extraktu se pozvolně zvyšovala exprese Bax proteinu a docházelo k aktivaci kaspázy-3 a štěpení PARP (poly-ADP-ribosyl-polymerázy). Tyto výsledky vypovídají o možných antioxidačních a protirakovinných vlastnostech

extraktů. Látky, které jsou za pozorovaný efekt zodpovědné zatím popsány nejsou.²³ Jedna z obsahových látek, betulinová kyselina, má cytotoxický účinek jak in vitro, tak in vivo, a dokáže inhibovat růst lidského melanomu u myší, tím, že selektivně vyvolává apoptozu.¹⁴

Některé amidy odvozené od betulinové kyseliny, která byla izolovaná z kůry stromu *Plantatus hybrida Brot*, jsou účinné a selektivní inhibitory HIV-1 replikace a blokují vstup viru do buňky.¹⁴

3.2.5 Přípravky

Droga je u nás obsažená v těchto čajových směsích: *REDUKTAN* (Leros), *NEPHROSAL* (Slovakofarma), *SPECIES DIURETICAE PLANTA* (Leros), *SPECIES UROLOGICAE PLANTA* (Leros), *UROLOGICKÁ ČAJOVÁ SMĚS* (Megafyt)²⁴

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje

Analytické váhy

Blokový termostat ISOTEMP 125D

Ultrazvuková lázeň

Spektrofotometr UV-1601

Chromatograf Jasco s kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5 μ m)

Sušárna

4.2 Chemikálie

2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

methanol p. a.

petrolether

kys.kávová

kys. chlorgenová

hyperosid

kvercitrin

kys.orthofosforečná

acetonitril

4.3 Materiál

Listy břízy byly sbírány na Zahradě léčivých rostlin Farmaceutické fakulty v Hradci Králové v červnu roku 2006. Dále byly použity zmrazené vzorky sebrané v období března až června roku 2005. Droga *Betulae folium* byla zakoupena v prodejně léčivých rostlin Pharmacentrum v Hradci Králové.

4.4 Stanovení antiradikálové aktivity.

4.4.1 Příprava roztoku DPPH

0,05g DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) 90% jsem rozpustila 25 ml methanolu. Poté jsem nechala roztok na 5 minut v ultrazvukové lázni. Z tohoto roztoku jsem připravila konečný roztok pro měření zředěním v poměru 1:1 metanolem. Tento vytvořený roztok jsem uchovávala v lednici.

4.4.2 Příprava extraktů drog

Přibližně 2 g listů nebo pupenů břízy jsem extrahovala 100 ml methanolu na ultrazvukové lázni po dobu 15 minut. Extrakt jsem přefiltrovala a filtrát opět doplnila methanolem na 100 ml.

4.4.3 Postup stanovení antiradikálové aktivity

Do zkumavek jsem odměřila získaný extrakt v množství od 0,1 do 1,2 ml, přidala 0,2 ml roztoku DPPH a doplnila methanolem do 5 ml. Poté jsem všechny zkumavky nechala stát při teplotě 37°C po dobu 30 minut v blokovém termostatu ISOTEMP 125D. Po uplynutí této doby jsem měřila absorbanci při 517 nm proti methanolu a kromě vzorků jsem změřila i tzv. kontrolní vzorek, tj. 0,2 ml DPPH doplněno do 5 ml methanolem.

Z naměřených hodnot jsem vypočetla procento redukce DPPH podle následujícího vzorce:

$$\% \text{ redukce DPPH} = (1 - A_v / A_k) * 100$$

A_v = absorbance vzorku

A_k = absorbance slepého vzorku

Výsledky měření jsou v tabulce 3-11.

Antiradikálovou aktivitu jednotlivých vzorků můžeme pak srovnávat pomocí hodnoty IC_{50} , která vyjadřuje jaké množství extraktu je potřebné pro zredukování 50 % volného radikálu DPPH. Tyto hodnoty jsem získala pomocí metody lineární regrese – viz a graf 1-9. Celkové porovnání hodnot IC_{50} jednotlivých vzorků je uveden v tabulce 13 a v grafu 11.

4.5 Stanovení obsahu flavonoidů

4.5.1 HPLC analýza

4.5.1.1 Úprava vzorků

Z každého extraktu listů a pupenů jsem odebrala 50 ml a na rotační vakuové odparce zahustila na 25 ml. Poté jsem vytřepávala s 25 ml petroletheru.

4.5.1.2 Příprava standardů

Jako standardy pro HPLC jsem použila: kyselinu chlorgenovou, kyselinu kávovou, hyperosid a kvercitrin. Chromatogramy standardů jsou uvedeny na obrázcích 7 – 10.

4.5.1.3 Podmínky HPLC

HPLC analýzy byly prováděny na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), vybavené předkolonovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5 μ m) s ochranou předkolonkou.

Nastříkovaný objem byl 20 μ l. Eluentem A byla voda s obsahem 0,15% kys. fosforečné, eluentem B acetonitril. Eluce mobilní fáze probíhala nejdříve isokraticky (1 ml/min, 97% eluentu A a 3% eluentu B). Od času $t = 8$ min do $t = 40$ min probíhala gradientově (konečné podmínky: průtok 1,45 ml/min, el. A 25% a el. B 75%).

Detekce byla provedena pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 200 - 650 nm. Obsah sledovaných látek byl vypočten z píků při vlnové délce 254 nm (kvercitrin, hyperosid) a 320 nm (kys. chlorogenová, k. kávová). Obsah všech látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu těžé látky.

Chromatogramy jsou na obrázcích 11 – 19.

4.5.1.4 Validace HPLC analýzy

Instrumentální validace je zajištěna výrobcem HPLC sestavy (Jasco) a to normou ISO 9001 (International Organization for Standardization).

Způsobilost chromatografických systémů byla navíc ověřena *testem opakovaného nástřiku* – tzv. *test na přesnost* (provedeno vždy šest nástřiků týmž vzorkem, vypočtená

relativní směrodatná odchylka byla vždy menší než 1,5 %) a *testem linearity* (na základě pěti různých koncentrací standardu se lineární regresní analýzou zjistí hodnota korelačního koeficientu r , která musí být větší než 0,9900). Pro hodnocení analytického měření byly dále převzaty metody z Evropského lékopisu, 4. vydání: *Asymetrie píku* a *Počet teoretických pater*.²⁵

Pro hodnocení celé metody byly použity tyto validační parametry:

Správnost metody - jedná se o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou (tedy porovnáním ověřovaných hodnot se standardem, porovnáním s jinou již osvědčenou metodou, nebo srovnáním s referenčním materiálem).^{26, 27}

Kvantitativní limit – jde o nejmenší hodnotu, která je měřitelná s přijatelnou přesností a správností (relativní směrodatná odchylka menší než 15 %).^{26, 27}

4.6 Ztráta sušením

Podíl sušiny v listech a pupenech jsem zjistila pomocí metody ztráty sušením dle Českého lékopisu 2002. Přibližně 2 g materiálu jsem sušila 2 hodiny v sušárně při 105 °C, převážila a vypočítala procento sušiny. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.²⁸

5 VÝSLEDKY

Tab. 2 Stanovení sušiny

VZOREK		A			B			A+B
		hmotnost před vysušením (g)	hmotnost po usušení (g)		hmotnost před usušením (g)	hmotnost po usušení (g)		průměr
			navážka	navážka		% sušiny	navážka	
1	pupeny břez	0,7172	0,5194	72,42	0,7292	0,5290	72,55	72,48
2	pupeny dub	0,5288	0,2692	50,91	0,5113	0,2598	50,81	50,86
3	listy dub	0,5142	0,2500	48,62	0,5960	0,2855	47,90	48,26
4	listy květen začátek	0,4312	0,1684	39,05	0,4412	0,1758	39,85	39,45
5	listy květen konec	0,5373	0,2816	52,41	0,5135	0,2749	53,53	52,97
6	listy červen 05	0,5366	0,2934	54,68	0,5606	0,3182	56,76	55,72
7	čerstvý list červen 06	0,4580	0,2146	46,86	0,4425	0,2079	46,98	46,92
8	sušený list červen 06	0,5805	0,5458	94,02	0,5411	0,5029	92,94	93,48
9	Fo. Betulae	0,9443	0,8848	93,70	0,9328	0,8739	93,69	93,69

Tab. č. 3 Antiradikálová aktivita

1 PUPENY BŘEZEN (27.3.2005)			
sušina (%):	72,48		
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
navážka (g)	2,0008	2,0010	1,9992
sušina (g)	1,4502	1,4504	1,4491
objem extraktu (ml)	100	100	100
naředění (x)	50	50	50
hmotnost látky v 100ml roztoku po naředění (mg)	29,0048	29,0077	28,9816

c	vzorek 1			vzorek 2			vzorek 3			průměr mg/ml	průměr		
	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA		AA	Směrodatná odchylka	
0	0,0000	0,958	0,00	0,0000	0,958	0,00	0,0000	0,958	0,00	0,0000	0,00	+ - 0,000	+ - 0,000%
0,1	0,0290	0,838	12,53	0,0290	0,877	8,46	0,0290	0,907	5,32	0,0290	8,77	+ - 2,949	+ - 0,026%
0,2	0,0580	0,764	20,25	0,0580	0,81	15,45	0,0580	0,818	14,61	0,0580	16,77	+ - 2,484	+ - 0,042%
0,3	0,0870	0,696	27,35	0,0870	0,743	22,44	0,0869	0,8	16,49	0,0870	22,09	+ - 4,439	+ - 0,098%
0,4	0,1160	0,664	30,69	0,1160	0,697	27,24	0,1159	0,722	24,63	0,1160	27,52	+ - 2,479	+ - 0,068%
0,5	0,1450	0,57	40,50	0,1450	0,634	33,82	0,1449	0,64	33,19	0,1450	35,84	+ - 3,307	+ - 0,119%
0,6	0,1740	0,553	42,28	0,1740	0,614	35,91	0,1739	0,625	34,76	0,1740	37,65	+ - 3,306	+ - 0,124%
0,7	0,2030	0,463	51,67	0,2031	0,519	45,82	0,2029	0,558	41,75	0,2030	46,42	+ - 4,070	+ - 0,189%
0,8	0,2320	0,428	55,32	0,2321	0,518	45,93	0,2319	0,523	45,41	0,2320	48,89	+ - 4,557	+ - 0,223%
0,9	0,2610	0,407	57,52	0,2611	0,433	54,80	0,2608	0,455	52,51	0,2610	54,94	+ - 2,048	+ - 0,113%
1	0,2900	0,392	59,08	0,2901	0,377	60,65	0,2898	0,419	56,26	0,2900	58,66	+ - 1,814	+ - 0,106%
1,1	0,3191	0,376	60,75	0,3191	0,371	61,27	0,3188	0,386	59,71	0,3190	60,58	+ - 0,651	+ - 0,039%
1,2	0,3481	0,324	66,18	0,3481	0,321	66,49	0,3478	0,379	60,44	0,3480	64,37	+ - 2,783	+ - 0,179%
1,4	0,4061	0,296	69,10	0,4061	0,224	76,62	0,4057	0,266	72,23	0,4060	72,65	+ - 3,082	+ - 0,224%
1,8	0,5221	0,109	88,62	0,5221	0,13	86,43	0,5217	0,154	83,92	0,5220	86,33	+ - 1,919	+ - 0,166%

Tab. č. 4 Antiradikálová aktivita

2 PUPENY DUBEN (10.4.2005)			
sušina (%):	50,86		
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
navážka (g)	1,8420	1,8403	1,8404
sušina (g)	0,9368	0,9360	0,9360
naředění (x)	25	25	25
hmotnost látky v roztoku po naředění (mg)	37,4734	37,4388	37,4409

c	vzorek 1			vzorek 2			vzorek 3			průměr	průměr		
	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	AA	Směrodatná odchylka	
0	0,0000	0,922	0,00	0,0000	0,922	0,00	0,0000	0,922	0,00	0,0000	0,00	+ - 0,000	+ - 0,000%
0,1	0,0375	0,885	4,01	0,0374	0,909	1,41	0,0374	0,918	0,43	0,0499	1,95	+ - 1,511	+ - 0,003%
0,2	0,0749	0,851	7,70	0,0749	0,862	6,51	0,0749	0,904	1,95	0,0874	5,39	+ - 2,477	+ - 0,013%
0,3	0,1124	0,795	13,77	0,1123	0,816	11,50	0,1123	0,867	5,97	0,1248	10,41	+ - 3,279	+ - 0,034%
0,4	0,1499	0,767	16,81	0,1498	0,79	14,32	0,1498	0,838	9,11	0,1623	13,41	+ - 3,208	+ - 0,043%
0,5	0,1874	0,72	21,91	0,1872	0,746	19,09	0,1872	0,796	13,67	0,1997	18,22	+ - 3,421	+ - 0,062%
0,6	0,2248	0,684	25,81	0,2246	0,715	22,45	0,2246	0,748	18,87	0,2372	22,38	+ - 2,834	+ - 0,063%
0,7	0,2623	0,626	32,10	0,2621	0,648	29,72	0,2621	0,677	26,57	0,2746	29,46	+ - 2,265	+ - 0,067%
0,8	0,2998	0,605	34,38	0,2995	0,603	34,60	0,2995	0,663	28,09	0,3121	32,36	+ - 3,018	+ - 0,098%
0,9	0,3373	0,55	40,35	0,3370	0,587	36,33	0,3370	0,64	30,59	0,3495	35,76	+ - 4,006	+ - 0,143%
1	0,3747	0,515	44,14	0,3744	0,572	37,96	0,3744	0,596	35,36	0,3995	39,15	+ - 3,684	+ - 0,144%
1,2	0,4497	0,476	48,37	0,4493	0,539	41,54	0,4493	0,577	37,42	0,4744	42,44	+ - 4,518	+ - 0,192%
1,4	0,5246	0,415	54,99	0,5241	0,452	50,98	0,5242	0,507	45,01	0,5493	50,33	+ - 4,100	+ - 0,206%
1,6	0,5996	0,362	60,74	0,5990	0,397	56,94	0,5991	0,458	50,33	0,6242	56,00	+ - 4,302	+ - 0,241%
1,8	0,6745	0,313	66,05	0,6739	0,348	62,26	0,6739	0,389	57,81	0,6991	62,04	+ - 3,369	+ - 0,209%
2	0,7495	0,241	73,86	0,7488	0,283	69,31	0,7488	0,353	61,71	0,7740	68,29	+ - 5,011	+ - 0,342%
2,2	0,8244	0,208	77,44	0,8237	0,263	71,48	0,8237	0,289	68,66	0,8240	72,52	+ - 3,662	+ - 0,266%

Tab. č. 5 Antiradikálová aktivita

3 LISTY DUBEN (24.4.2005)			
sušina (%):	48,26		
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
navážka (g)	1,8074	1,8067	1,807
sušina (g)	0,8723	0,8719	0,8721
naředění (x)	5	5	5
hmotnost látky v roztoku po naředění (mg)	174,4537	174,3861	174,4151

c	vzorek 1			vzorek 2			vzorek 3			průměr		průměr	
	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	AA	Směrodatná odchylka	
0	0,0000	0,964	0,00	0,0000	0,964	0,00	0,0000	0,964	0,00	0,0000	0,00	+0,000	+0,000%
0,1	0,1745	0,793	17,74	0,1744	0,801	16,91	0,1744	0,78	19,09	0,1744	17,91	+0,898	+0,016%
0,2	0,3489	0,688	28,63	0,3488	0,674	30,08	0,3488	0,699	27,49	0,3488	28,73	+1,061	+0,030%
0,3	0,5234	0,571	40,77	0,5231	0,608	36,93	0,5232	0,568	41,08	0,5232	39,59	+1,887	+0,075%
0,4	0,6978	0,497	48,44	0,6975	0,506	47,51	0,6976	0,519	46,16	0,6977	47,37	+0,937	+0,044%
0,5	0,8723	0,387	59,85	0,8719	0,427	55,71	0,8721	0,405	57,99	0,8721	57,85	+1,697	+0,098%
0,6	1,0467	0,341	64,63	1,0463	0,359	62,76	1,0465	0,315	67,32	1,0465	64,90	+1,874	+0,122%
0,7	1,2212	0,229	76,24	1,2207	0,262	72,82	1,2209	0,247	74,38	1,2209	74,48	+1,399	+0,104%
0,8	1,3956	0,171	82,26	1,3951	0,23	76,14	1,3953	0,193	79,98	1,3953	79,46	+2,525	+0,201%
0,9	1,5701	0,148	84,65	1,5694	0,163	83,09	1,5697	0,157	83,71	1,5697	83,82	+0,639	+0,054%
1	1,7445	0,123	87,24	1,7438	0,136	85,89	1,7441	0,13	86,51	1,7441	86,55	+0,551	+0,048%
1,1	1,9190	0,121	87,45	1,9182	0,125	87,03	1,9185	0,126	86,93	1,9186	87,14	+0,224	+0,020%
1,2	2,0934	0,113	88,28	2,0926	0,115	88,07	2,0929	0,12	87,55	2,0930	87,97	+0,305	+0,027%

Tab. č. 6 Antiradikálová aktivita

4 LISTY KVĚTEN (8.5.2005)			
sušina (%):	48,26		
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
navážka (g)	2,0086	2,0060	2,0073
sušina (g)	0,7916	0,7906	0,7911
naředění (x)	5	5	5
hmotnost látky v roztoku po naředění (mg)	158,3179	158,1129	158,2154

c	vzorek 1			vzorek 2			vzorek 3			průměr	průměr		
	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	AA	Směrodatná odchylka	
0	0,0000	0,929	0,00	0,0000	0,929	0,00	0,0000	0,929	0,00	0,0000	0,00	+ - 0,000	+ - 0,000%
0,1	0,1583	0,902	2,91	0,1581	0,888	4,41	0,1582	0,898	3,34	0,1582	3,55	+ - 0,634	+ - 0,002%
0,2	0,3166	0,875	5,81	0,3162	0,839	9,69	0,3164	0,821	11,63	0,3164	9,04	+ - 2,417	+ - 0,022%
0,3	0,4750	0,789	15,07	0,4743	0,765	17,65	0,4746	0,787	15,29	0,4746	16,00	+ - 1,170	+ - 0,019%
0,4	0,6333	0,731	21,31	0,6325	0,675	27,34	0,6329	0,687	26,05	0,6329	24,90	+ - 2,591	+ - 0,065%
0,5	0,7916	0,674	27,45	0,7906	0,627	32,51	0,7911	0,634	31,75	0,7911	30,57	+ - 2,229	+ - 0,068%
0,6	0,9499	0,63	32,19	0,9487	0,563	39,40	0,9493	0,553	40,47	0,9493	37,35	+ - 3,680	+ - 0,137%
0,7	1,1082	0,572	38,43	1,1068	0,494	46,82	1,1075	0,49	47,26	1,1075	44,17	+ - 4,063	+ - 0,179%
0,8	1,2665	0,519	44,13	1,2649	0,438	52,85	1,2657	0,479	48,44	1,2657	48,48	+ - 3,560	+ - 0,173%
0,9	1,4249	0,468	49,62	1,4230	0,421	54,68	1,4239	0,439	52,74	1,4239	52,35	+ - 2,084	+ - 0,109%
1	1,5832	0,394	57,59	1,5811	0,284	69,43	1,5822	0,337	63,72	1,5822	63,58	+ - 4,835	+ - 0,307%
1,2	1,8998	0,342	63,19	1,8974	0,246	73,52	1,8986	0,262	71,80	1,8986	69,50	+ - 4,520	+ - 0,314%
1,4	2,2165	0,249	73,20	2,2136	0,184	80,19	2,2150	0,212	77,18	2,2150	76,86	+ - 2,866	+ - 0,220%
1,6	2,5331	0,187	79,87	2,5298	0,15	83,85							
1,8	2,8497	0,154	83,42	2,8460	0,139	85,04							
2	3,1664	0,142	84,71										
2,2	3,4830	0,137	85,25										

Tab. č. 7 Antiradikálová aktivita

5 LISTY KVĚTEN (22.5.2005)			
sušina (%):	52,97		
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
navážka (g)	2,0003	2,0010	2,0006
sušina (g)	1,0596	1,0599	1,0597
naředění (x)	5	5	5
hmotnost látky v roztoku po naředění (mg)	211,9118	211,9859	211,9436

c	vzorek 1			vzorek 2			vzorek 3			průměr mg/ml	průměr		
	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA		AA	Směrodatná odchylka	
0	0,0000	0,935	0,00	0,0000	0,935	0,00	0,0000	0,935	0,00	0,0000	0,00	+ - 0,000	+ - 0,000%
0,1	0,2119	0,874	6,52	0,2120	0,889	4,92	0,2119	0,899	3,85	0,2119	5,10	+ - 1,099	+ - 0,006%
0,2	0,4238	0,728	22,14	0,4240	0,832	11,02	0,4239	0,834	10,80	0,4239	14,65	+ - 5,295	+ - 0,078%
0,3	0,6357	0,698	25,35	0,6360	0,74	20,86	0,6358	0,742	20,64	0,6358	22,28	+ - 2,170	+ - 0,048%
0,4	0,8476	0,633	32,30	0,8479	0,652	30,27	0,8478	0,658	29,63	0,8478	30,73	+ - 1,140	+ - 0,035%
0,5	1,0596	0,563	39,79	1,0599	0,55	41,18	1,0597	0,581	37,86	1,0597	39,61	+ - 1,359	+ - 0,054%
0,6	1,2715	0,483	48,34	1,2719	0,472	49,52	1,2717	0,53	43,32	1,2717	47,06	+ - 2,690	+ - 0,127%
0,7	1,4834	0,416	55,51	1,4839	0,424	54,65	1,4836	0,417	55,40	1,4836	55,19	+ - 0,381	+ - 0,021%
0,8	1,6953	0,348	62,78	1,6959	0,355	62,03	1,6955	0,364	61,07	1,6956	61,96	+ - 0,700	+ - 0,043%
0,9	1,9072	0,264	71,76	1,9079	0,291	68,88	1,9075	0,303	67,59	1,9075	69,41	+ - 1,744	+ - 0,121%
1	2,1191	0,231	75,29	2,1199	0,22	76,47	2,1194	0,237	74,65	2,1195	75,47	+ - 0,753	+ - 0,057%
1,2	2,5429	0,163	82,57	2,5438	0,172	81,60	2,5433	0,164	82,46	2,5434	82,21	+ - 0,431	+ - 0,035%

Tab. č. 8 Antiradikálová aktivita

6 LISTY ČERVEN (5.6.2005)			
sušina (%):	55,72		
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
navážka (g)	2,0081	2,0403	2,0665
sušina (g)	1,1189	1,1369	1,1515
naředění (x)	5	5	5
hmotnost látky v roztoku po naředění (mg)	223,7827	227,3710	230,2908

c	vzorek 1			vzorek 2			vzorek 3			průměr	průměr		
	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	AA	Směrodatná odchylka	
0	0,0000	0,904	0,00	0,0000	0,904	0,00	0,0000	0,904	0,00	0,0000	0,00	+ - 0,000	+ - 0,000%
0,1	0,2238	0,859	4,98	0,2274	0,782	13,50	0,2303	0,853	5,64	0,2271	8,04	+ - 3,868	+ - 0,031%
0,2	0,4476	0,738	18,36	0,4547	0,715	20,91	0,4606	0,754	16,59	0,4543	18,62	+ - 1,771	+ - 0,033%
0,3	0,6713	0,627	30,64	0,6821	0,622	31,19	0,6909	0,647	28,43	0,6814	30,09	+ - 1,195	+ - 0,036%
0,4	0,8951	0,553	38,83	0,9095	0,519	42,59	0,9212	0,56	38,05	0,9086	39,82	+ - 1,981	+ - 0,079%
0,5	1,1189	0,422	53,32	1,1369	0,388	57,08	1,1515	0,468	48,23	1,1357	52,88	+ - 3,626	+ - 0,192%
0,6	1,3427	0,351	61,17	1,3642	0,361	60,07	1,3817	0,378	58,19	1,3629	59,81	+ - 1,233	+ - 0,074%
0,7	1,5665	0,294	67,48	1,5916	0,273	69,80	1,6120	0,278	69,25	1,5900	68,84	+ - 0,991	+ - 0,068%
0,8	1,7903	0,231	74,45	1,8190	0,242	73,23	1,8423	0,242	73,23	1,8172	73,64	+ - 0,574	+ - 0,042%
0,9	2,0140	0,177	80,42	2,0463	0,163	81,97	2,0726	0,188	79,20	2,0443	80,53	+ - 1,132	+ - 0,091%
1	2,2378	0,141	84,40	2,2737	0,142	84,29	2,3029	0,152	83,19	2,2715	83,96	+ - 0,549	+ - 0,046%
1,2	2,6854	0,135	85,07	2,7285	0,141	84,40	2,7635	0,141	84,40	2,7258	84,62	+ - 0,313	+ - 0,026%

Tab. č. 9 Antiradikálová aktivita

7 ČERSTVÉ LISTY ČERVEN (8.6.2006)			
sušina (%):	46,92		
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
navážka (g)	2,0065	2,0073	2,0064
sušina (g)	0,9414	0,9418	0,9414
naředění (x)	5	5	5
hmotnost látky v roztoku po naředění (mg)	188,2900	188,3650	188,2806

c	vzorek 1			vzorek 2			vzorek 3			průměr	průměr		
	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	AA	Směrodatná odchylka	
0	0,0000	1,023	0,00	0,0000	1,023	0,00	0,0000	1,023	0,00	0,0000	0,00	+ - 0,000	+ - 0,000%
0,1	0,1883	0,882	13,78	0,1884	0,862	15,74	0,1883	0,858	16,13	0,1883	15,22	+ - 1,026	+ - 0,016%
0,2	0,3766	0,784	23,36	0,3767	0,775	24,24	0,3766	0,722	29,42	0,3766	25,68	+ - 2,674	+ - 0,069%
0,3	0,5649	0,656	35,87	0,5651	0,65	36,46	0,5648	0,617	39,69	0,5649	37,34	+ - 1,676	+ - 0,063%
0,4	0,7532	0,533	47,90	0,7535	0,476	53,47	0,7531	0,499	51,22	0,7532	50,86	+ - 2,289	+ - 0,116%
0,5	0,9415	0,444	56,60	0,9418	0,383	62,56	0,9414	0,399	61,00	0,9416	60,05	+ - 2,524	+ - 0,152%
0,6	1,1297	0,319	68,82	1,1302	0,281	72,53	1,1297	0,257	74,88	1,1299	72,08	+ - 2,495	+ - 0,180%
0,7	1,3180	0,216	78,89	1,3186	0,229	77,61	1,3180	0,197	80,74	1,3182	79,08	+ - 1,284	+ - 0,102%
0,8	1,5063	0,177	82,70	1,5069	0,136	86,71	1,5062	0,137	86,61	1,5065	85,34	+ - 1,867	+ - 0,159%
0,9	1,6946	0,142	86,12	1,6953	0,125	87,78	1,6945	0,121	88,17	1,6948	87,36	+ - 0,890	+ - 0,078%
1	1,8829	0,123	87,98	1,8837	0,166	83,77	1,8828	0,11	89,25	1,8831	87,00	+ - 2,339	+ - 0,204%

Tab. č. 10 Antiradikálová aktivita

8 SUŠENÉ LISTY ČERVEN (8.6.2006)			
sušina (%):	93,48		
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
navážka (g)	0,2004	0,2000	0,2005
sušina (g)	0,1873	0,1870	0,1874
naředění (x)	1	1	1
hmotnost látky v roztoku po naředění (mg)	187,3339	186,9600	187,4274

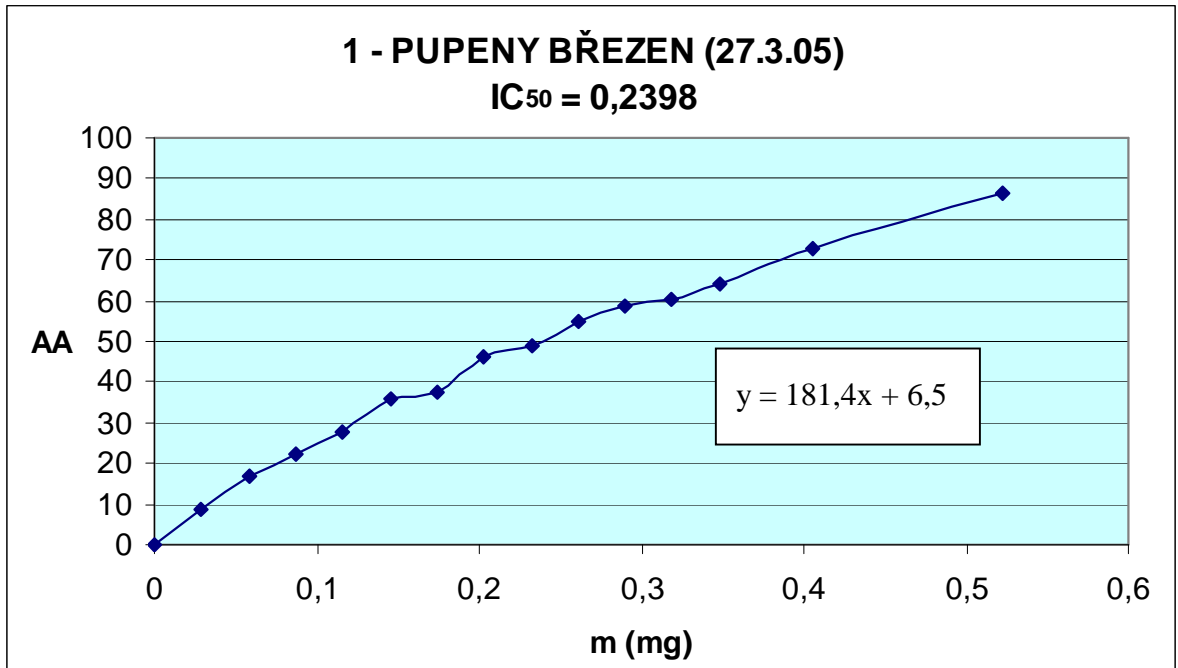
c	vzorek 1			vzorek 2			vzorek 3			průměr	průměr		
	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	AA	Směrodatná odchylka	
0	0,0000	0,875	0,00	0,0000	0,875	0,00	0,0000	0,875	0,00	0,0000	0,00	+ - 0,000	+ - 0,000%
0,1	0,1873	0,746	14,74	0,1870	0,849	2,97	0,1874	0,693	20,80	0,1872	12,84	+ - 7,402	+ - 0,095%
0,2	0,3747	0,524	40,11	0,3739	0,615	29,71	0,3749	0,531	39,31	0,3745	36,38	+ - 4,725	+ - 0,172%
0,3	0,5620	0,374	57,26	0,5609	0,493	43,66	0,5623	0,392	55,20	0,5617	52,04	+ - 5,985	+ - 0,311%
0,4	0,7493	0,25	71,43	0,7478	0,365	58,29	0,7497	0,266	69,60	0,7490	66,44	+ - 5,813	+ - 0,386%
0,5	0,9367	0,157	82,06	0,9348	0,163	81,37	0,9371	0,151	82,74	0,9362	82,06	+ - 0,560	+ - 0,046%
0,6	1,1240	0,118	86,51	1,1218	0,124	85,83	1,1246	0,121	86,17	1,1234	86,17	+ - 0,280	+ - 0,024%
0,7	1,3113	0,109	87,54	1,3087	0,113	87,09	1,3120	0,117	86,63	1,3107	87,09	+ - 0,373	+ - 0,033%
0,8	1,4987	0,107	87,77	1,4957	0,111	87,31	1,4994	0,117	86,63	1,4979	87,24	+ - 0,470	+ - 0,041%
0,9	1,6860	0,106	87,89	1,6826	0,111	87,31	1,6868	0,116	86,74	1,6852	87,31	+ - 0,467	+ - 0,041%
1	1,8733	0,106	87,89	1,8696	0,109	87,54	1,8743	0,114	86,97	1,8724	87,47	+ - 0,377	+ - 0,033%

Tab. č. 11 Antiradikálová aktivita

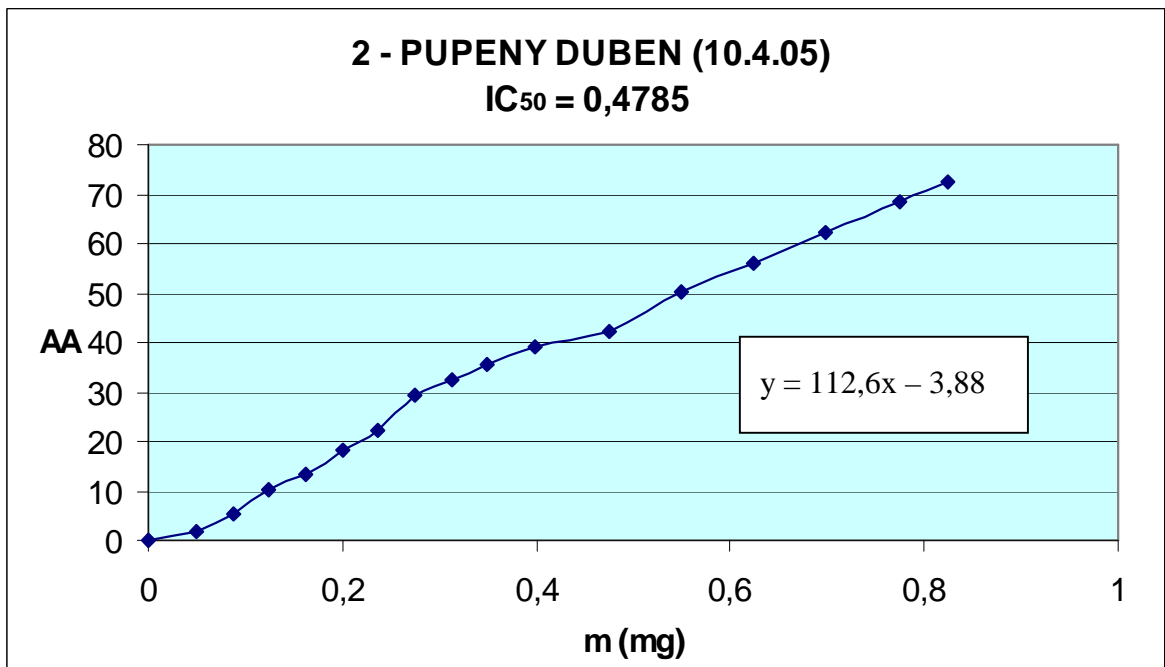
9 FOLIUM BETULAE			
sušina (%):	93,69		
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
navážka (g)	0,2001	0,2001	0,2002
sušina (g)	0,1875	0,1875	0,1871
naředění (x)	1	1	1
hmotnost látky v roztoku po naředění (mg)	187,4737	187,4737	187,0567

c	vzorek 1			vzorek 2			vzorek 3			průměr	průměr		
	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	A	AA	mg/ml	AA	Směrodatná odchylka	
0	0,0000	1,025	0,00	0,0000	1,025	0,00	0,0000	1,025	0,00	0,0000	0,00	+ - 0,000	+ - 0,000%
0,1	0,1875	0,798	22,15	0,1875	0,82	20,00	0,1871	0,803	21,66	0,1873	21,27	+ - 0,919	+ - 0,020%
0,2	0,3749	0,63	38,54	0,3749	0,646	36,98	0,3741	0,666	35,02	0,3747	36,85	+ - 1,437	+ - 0,053%
0,3	0,5624	0,466	54,54	0,5624	0,474	53,76	0,5612	0,53	48,29	0,5620	52,20	+ - 2,778	+ - 0,145%
0,4	0,7499	0,365	64,39	0,7499	0,376	63,32	0,7482	0,364	64,49	0,7493	64,07	+ - 0,530	+ - 0,034%
0,5	0,9374	0,258	74,83	0,9374	0,267	73,95	0,9353	0,259	74,73	0,9367	74,50	+ - 0,393	+ - 0,029%
0,6	1,1248	0,185	81,95	1,1248	0,189	81,56	1,1223	0,165	83,90	1,1240	82,47	+ - 1,024	+ - 0,084%
0,7	1,3123	0,127	87,61	1,3123	0,134	86,93	1,3094	0,122	88,10	1,3113	87,54	+ - 0,480	+ - 0,042%
0,8	1,4998	0,118	88,49	1,4998	0,123	88,00	1,4965	0,117	88,59	1,4987	88,36	+ - 0,256	+ - 0,023%
0,9	1,6873	0,117	88,59	1,6873	0,119	88,39	1,6835	0,116	88,68	1,6860	88,55	+ - 0,122	+ - 0,011%
1	1,8747	0,113	88,98	1,8747	0,116	88,68	1,8706	0,116	88,68	1,8733	88,78	+ - 0,138	+ - 0,012%

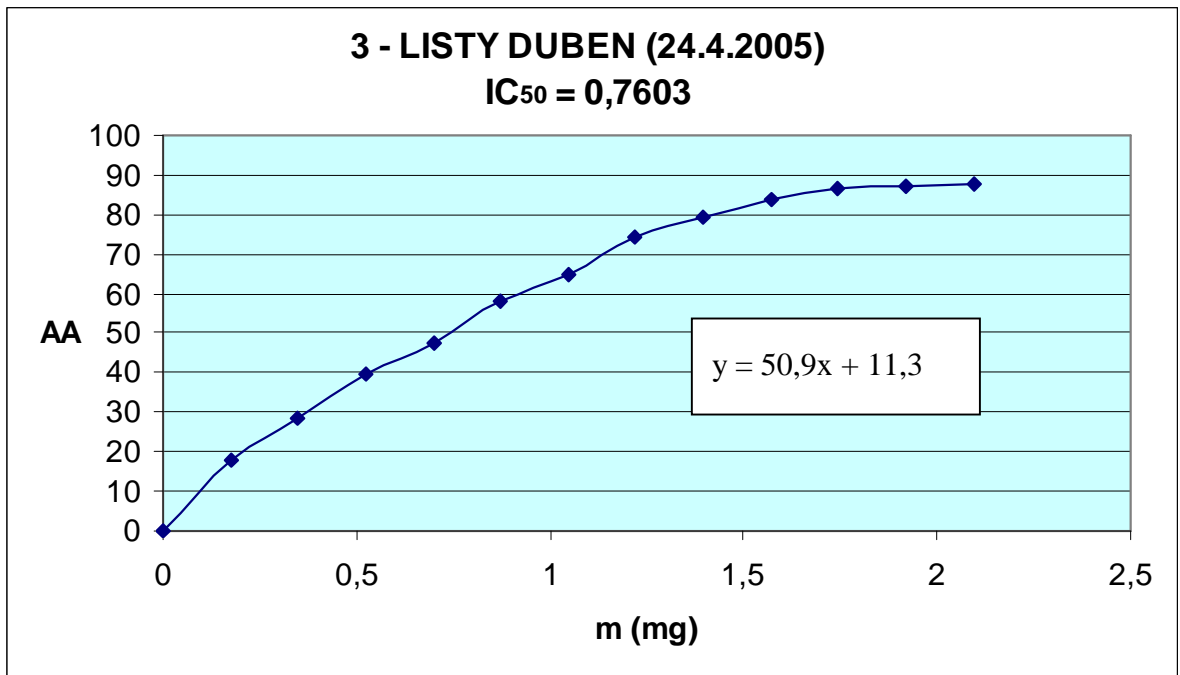
Graf. č. 1



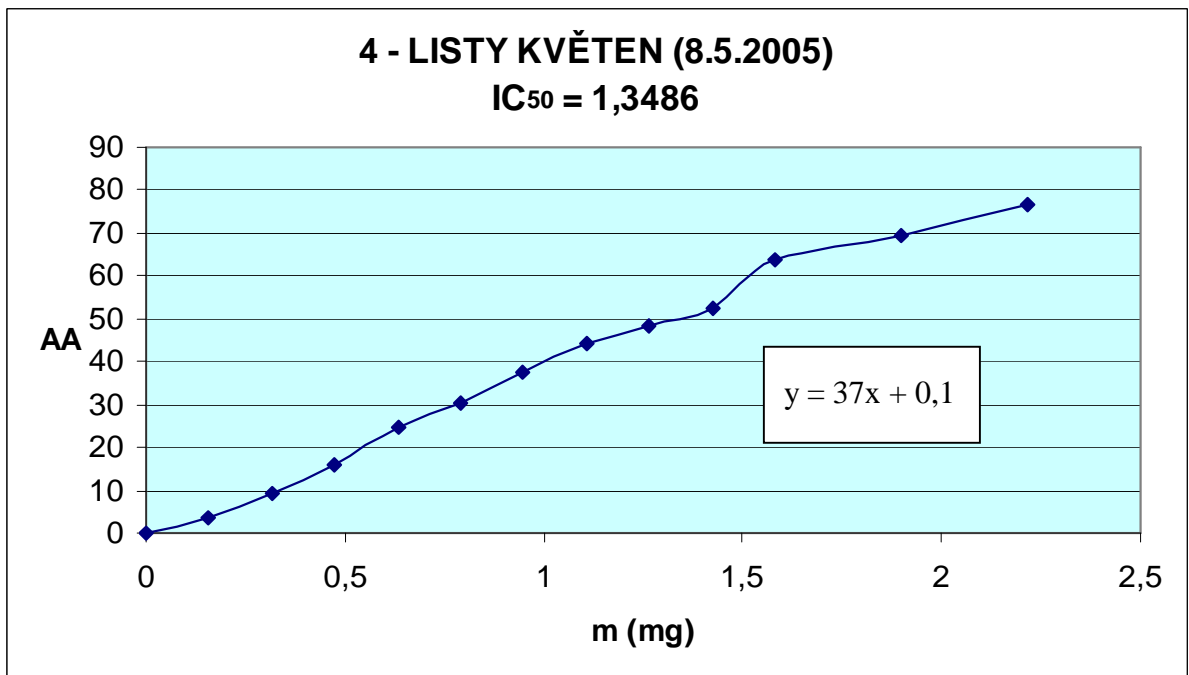
Graf. č. 2



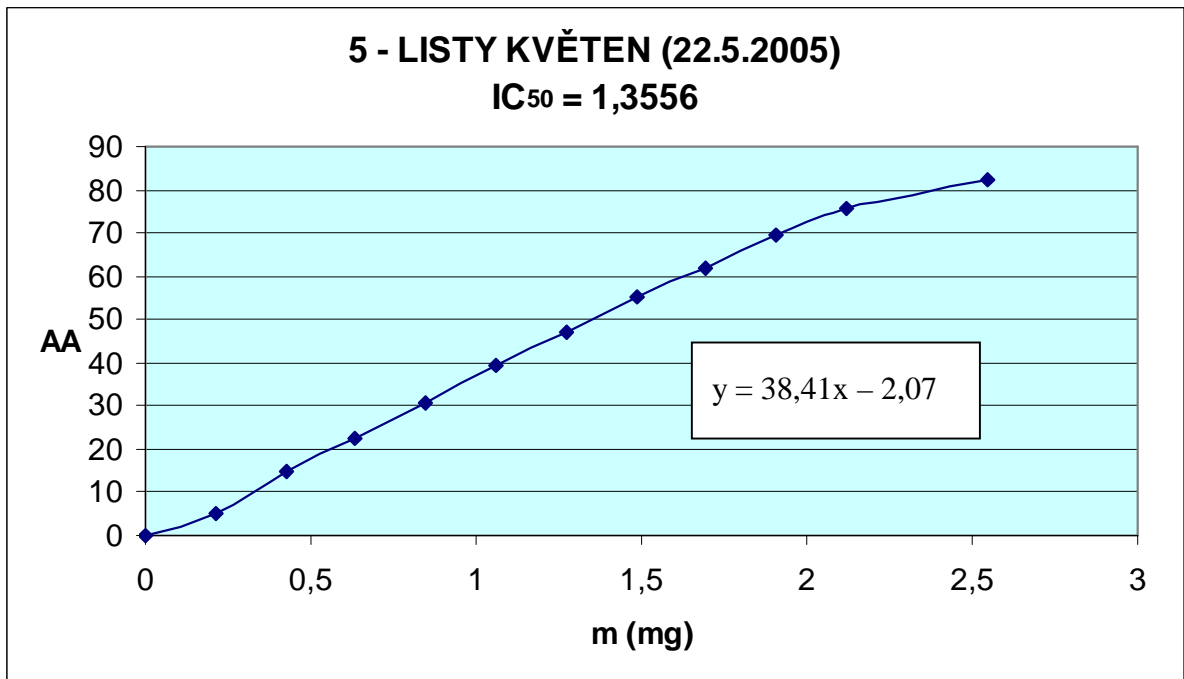
Graf. č. 3



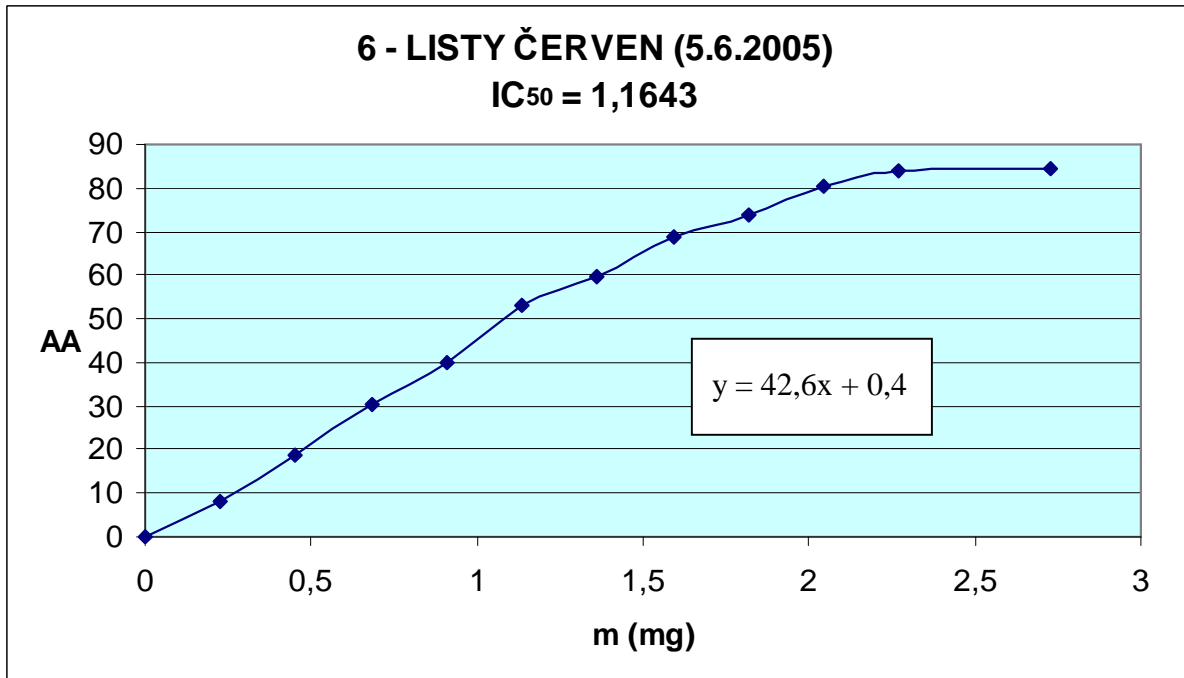
Graf. č. 4



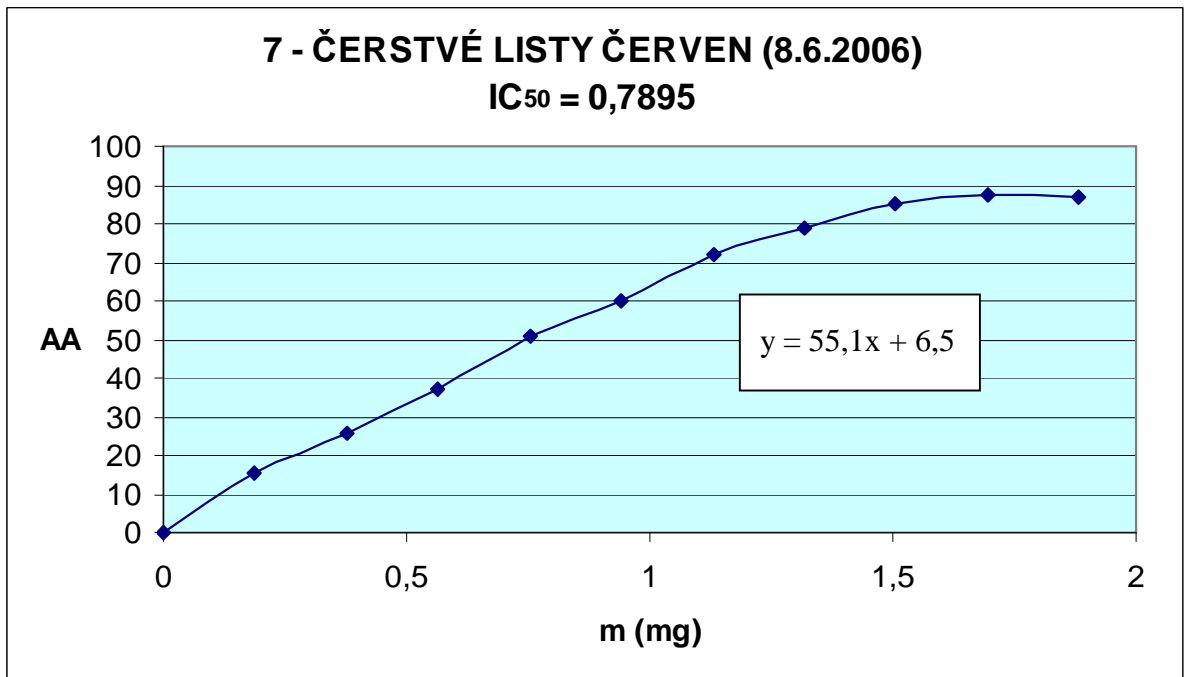
Graf. č. 5



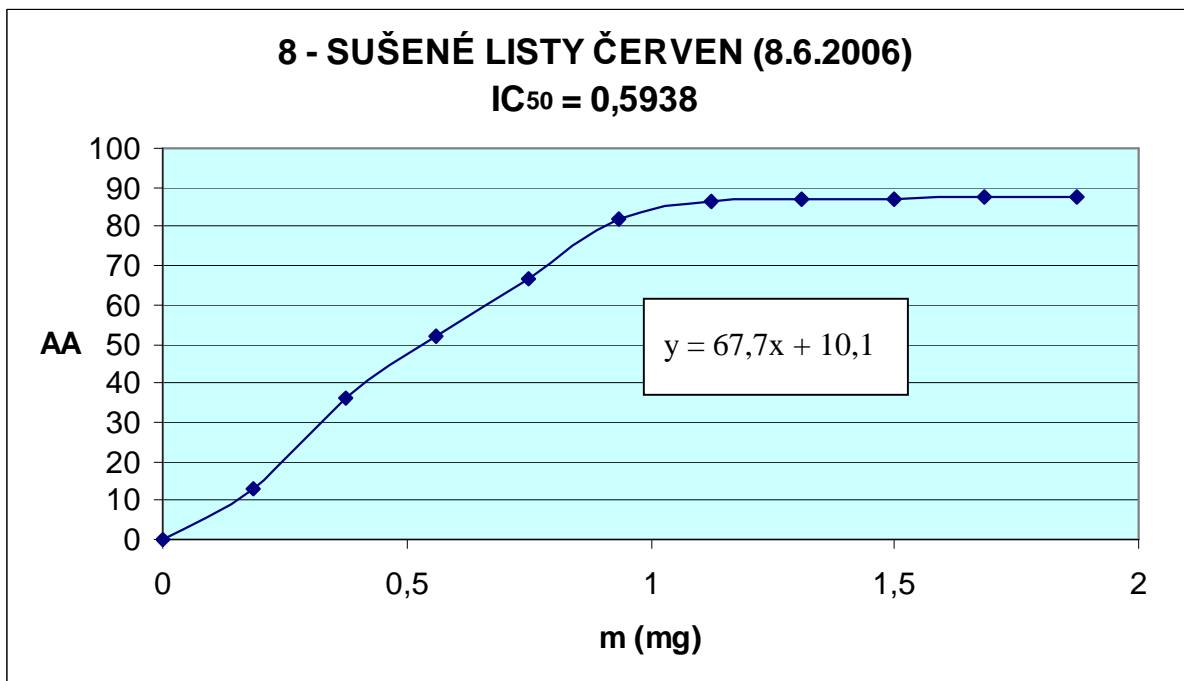
Graf. č. 6



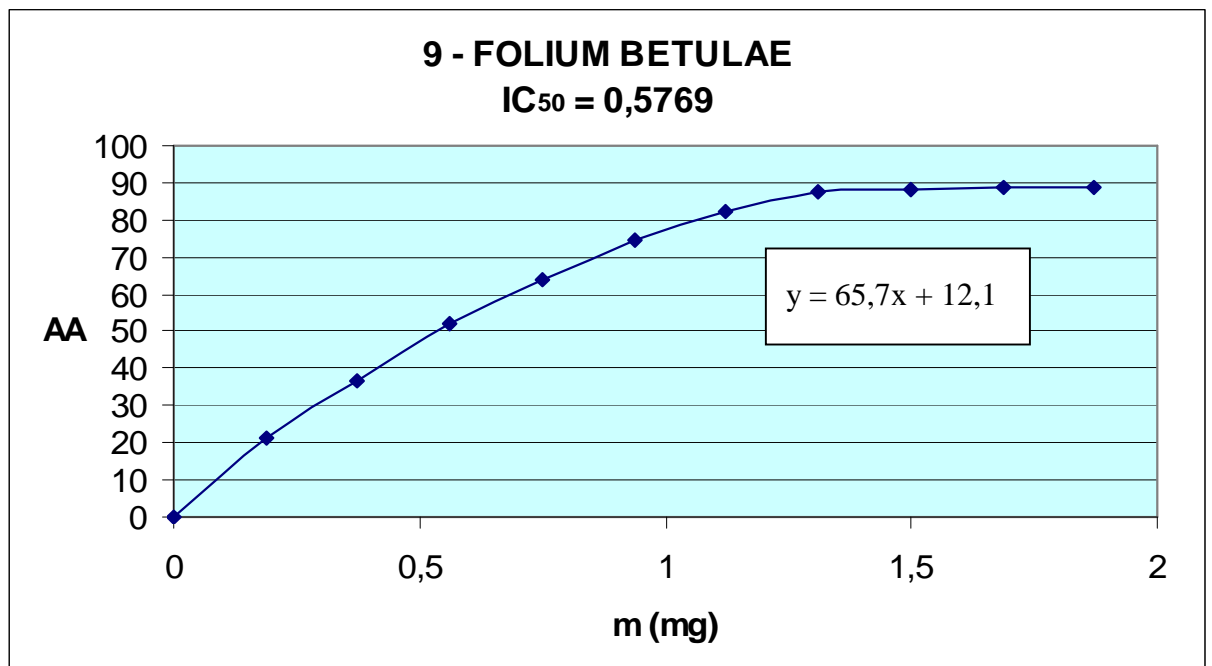
Graf. č. 7



Graf. č. 8



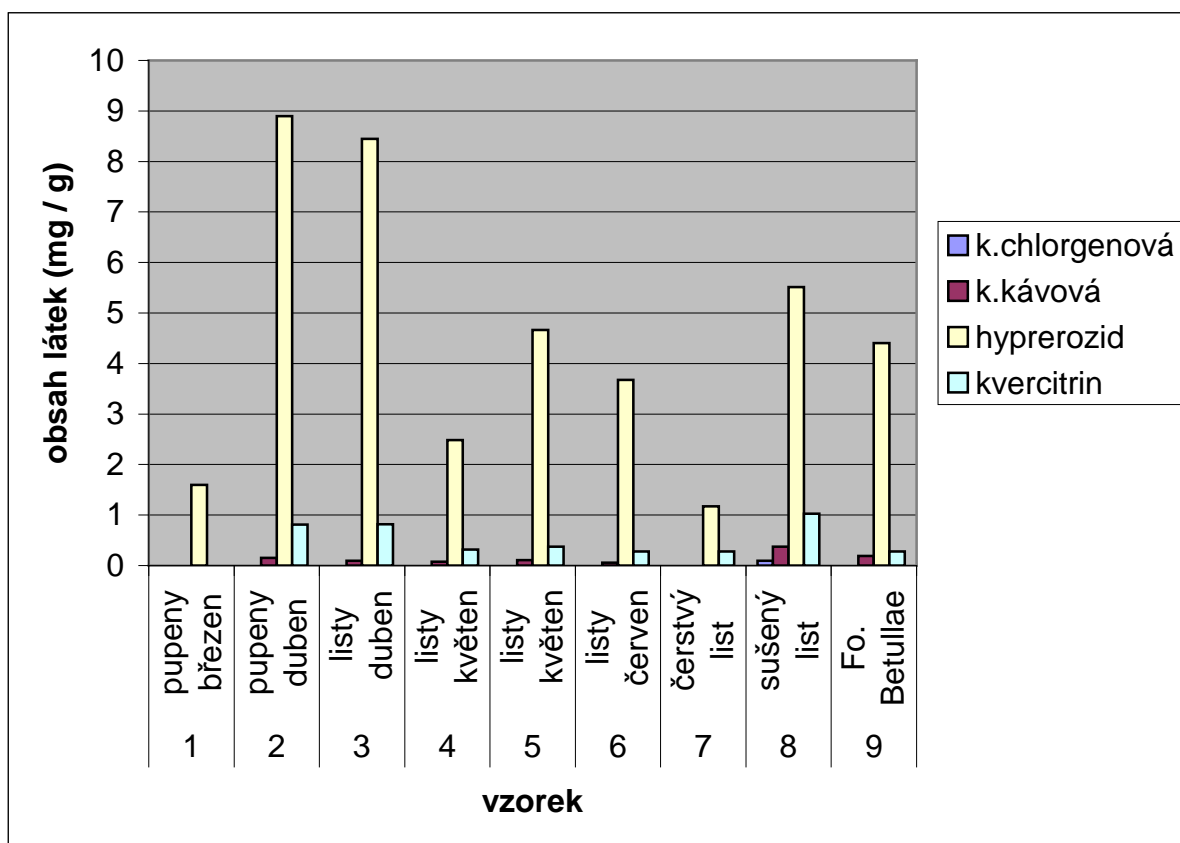
Graf. č. 9



Tab. č. 12 Zastoupení vybraných fenolických látek v bříze v průběhu ontogeneze (%), přepočteno na vysušenou drogu

vzorek	sušina %	kys. chlorgenová	kys. kávová	hyperosid	kvercitrin	Σ
1 pupeny březan	72,48	0	0	1,595	0	1,595
2 pupeny duben	50,86	0	0,153	8,901	0,814	9,868
3 listy duben	48,26	0	0,097	8,446	0,820	9,363
4 listy květen začátek	39,41	0	0,079	2,483	0,315	2,877
5 listy květen konec	52,97	0	0,106	4,661	0,371	5,138
6 listy červen	55,72	0	0,056	3,678	0,279	4,013
7 čerstvý list červen 2006	46,92	0	0	1,173	0,282	1,455
8 sušený list červen 2006	93,48	0,093	0,374	5,515	1,028	7,010
9 Fo. Betullae	93,69	0	0,187	4,403	0,281	4,871

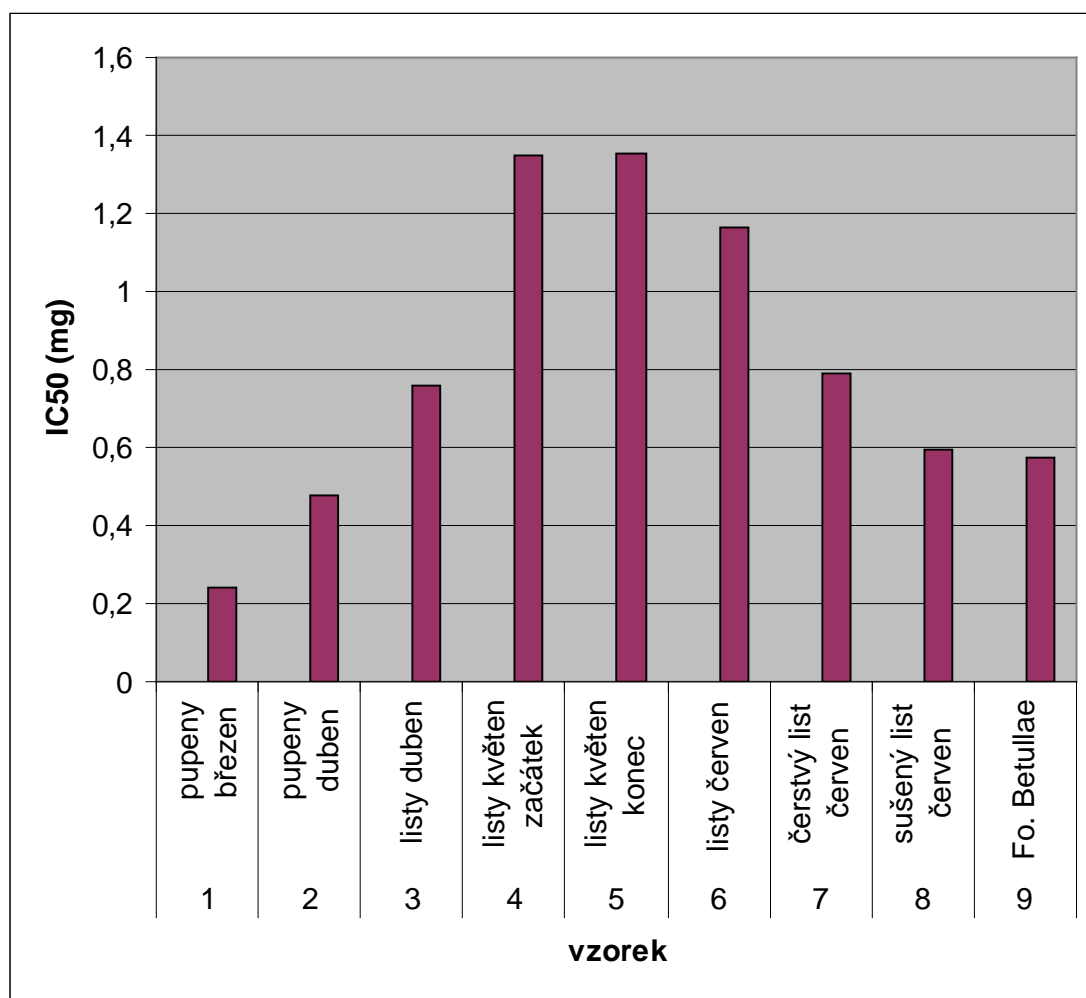
Graf 10 Zastoupení jednotlivých látek v bříze v průběhu ontogeneze



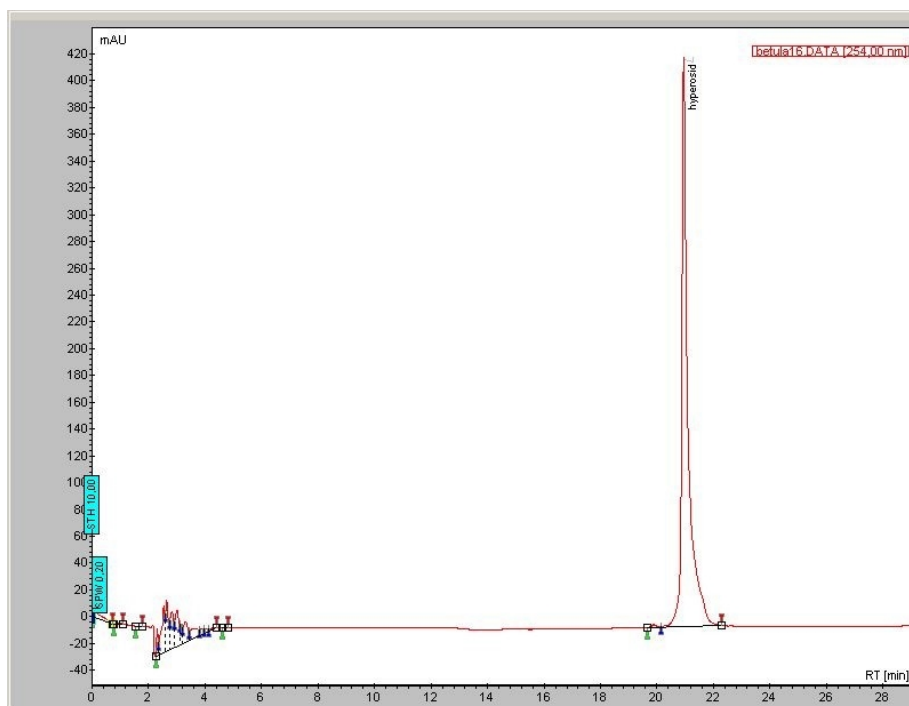
Tab. 13 DPPH šhášecí aktivita porovnaná na základě hodnoty IC₅₀

	Vzorek	IC ₅₀ (mg)
1	pupeny březen	0,2398
2	pupeny duben	0,4785
3	listy duben	0,7603
4	listy květen začátek	1,3486
5	listy květen konec	1,3556
6	listy červen	1,1634
7	čerstvý list červen 2006	0,7895
8	sušený list červen 2006	0,5938
9	Fo. Betullae	0,5769

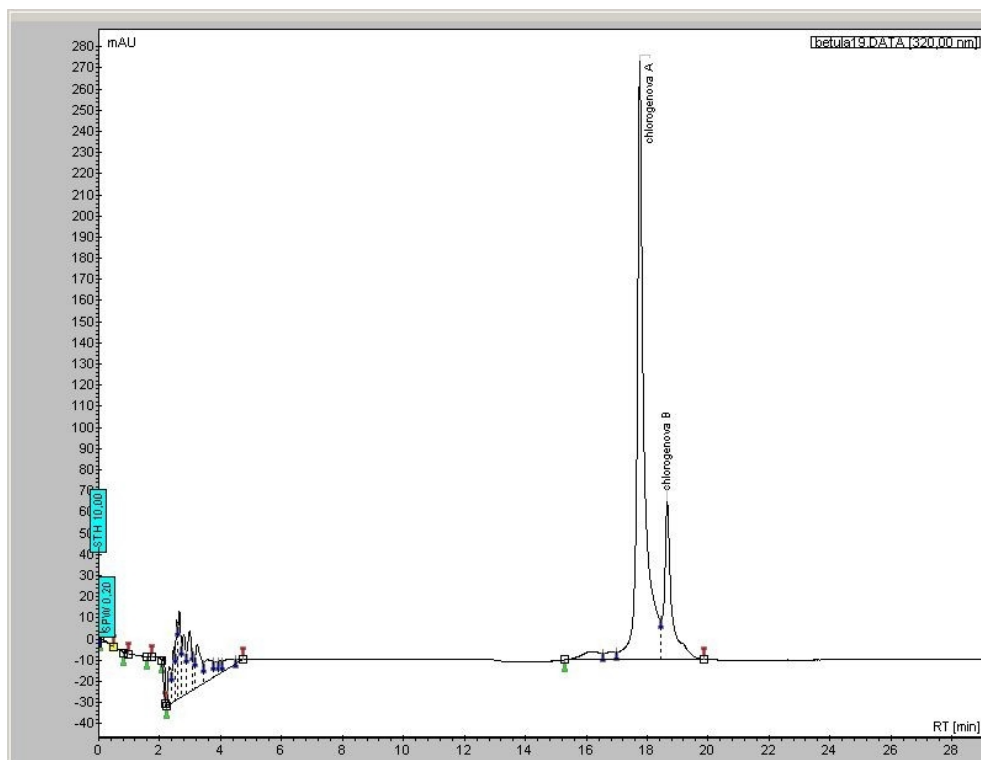
Graf č. 11 Antiradikálová aktivita extraktů pupenů a listů břízy a drogy Betula folium



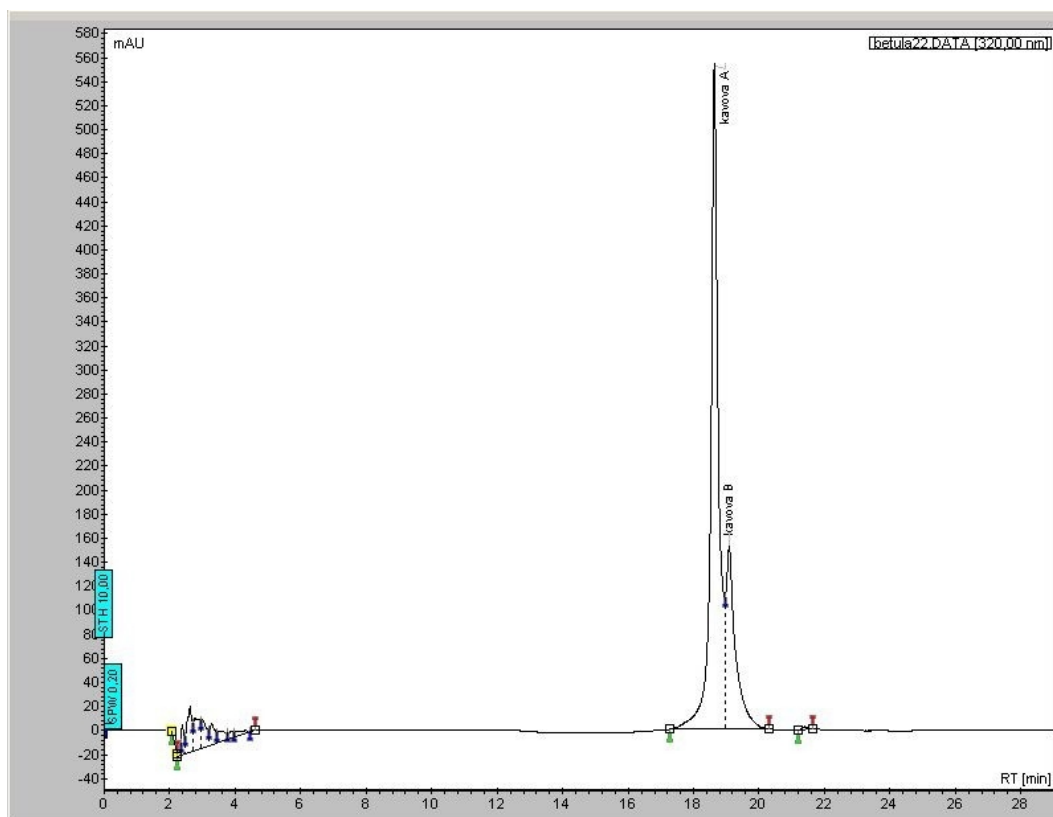
Obr. č. 7 HPLC - Hyperosid



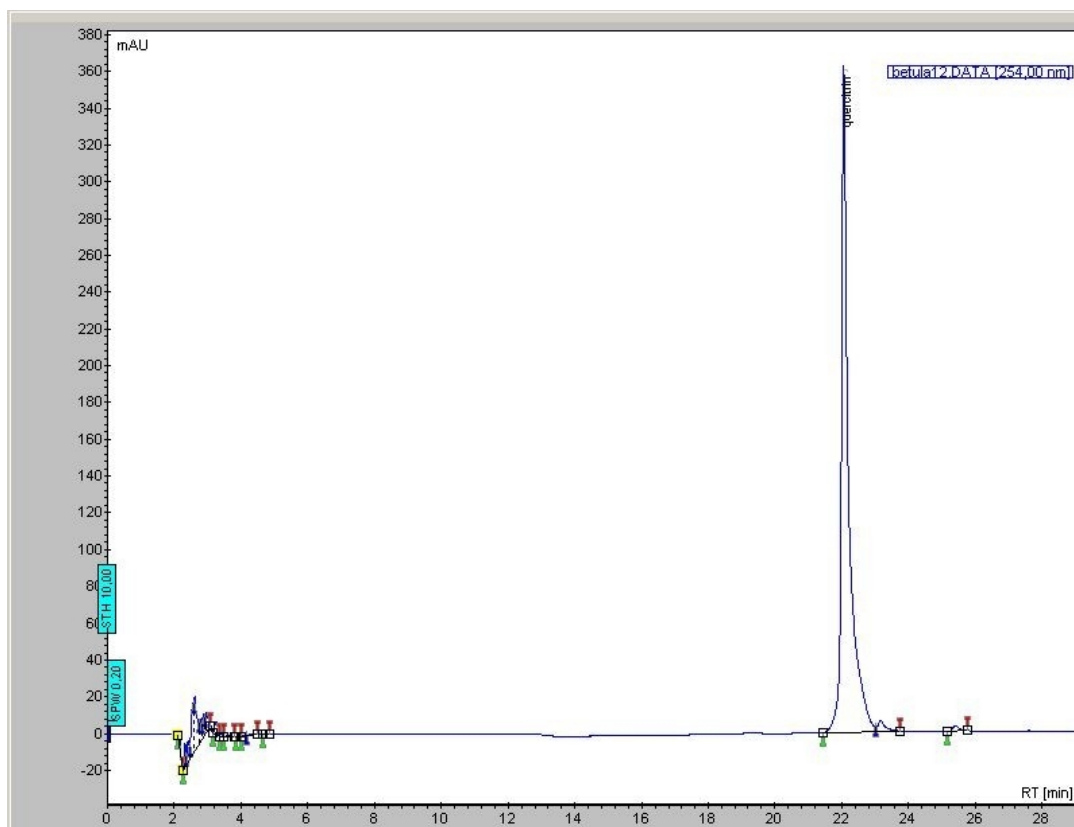
Obr. č. 8 HPLC - Kyselina chlorogenová



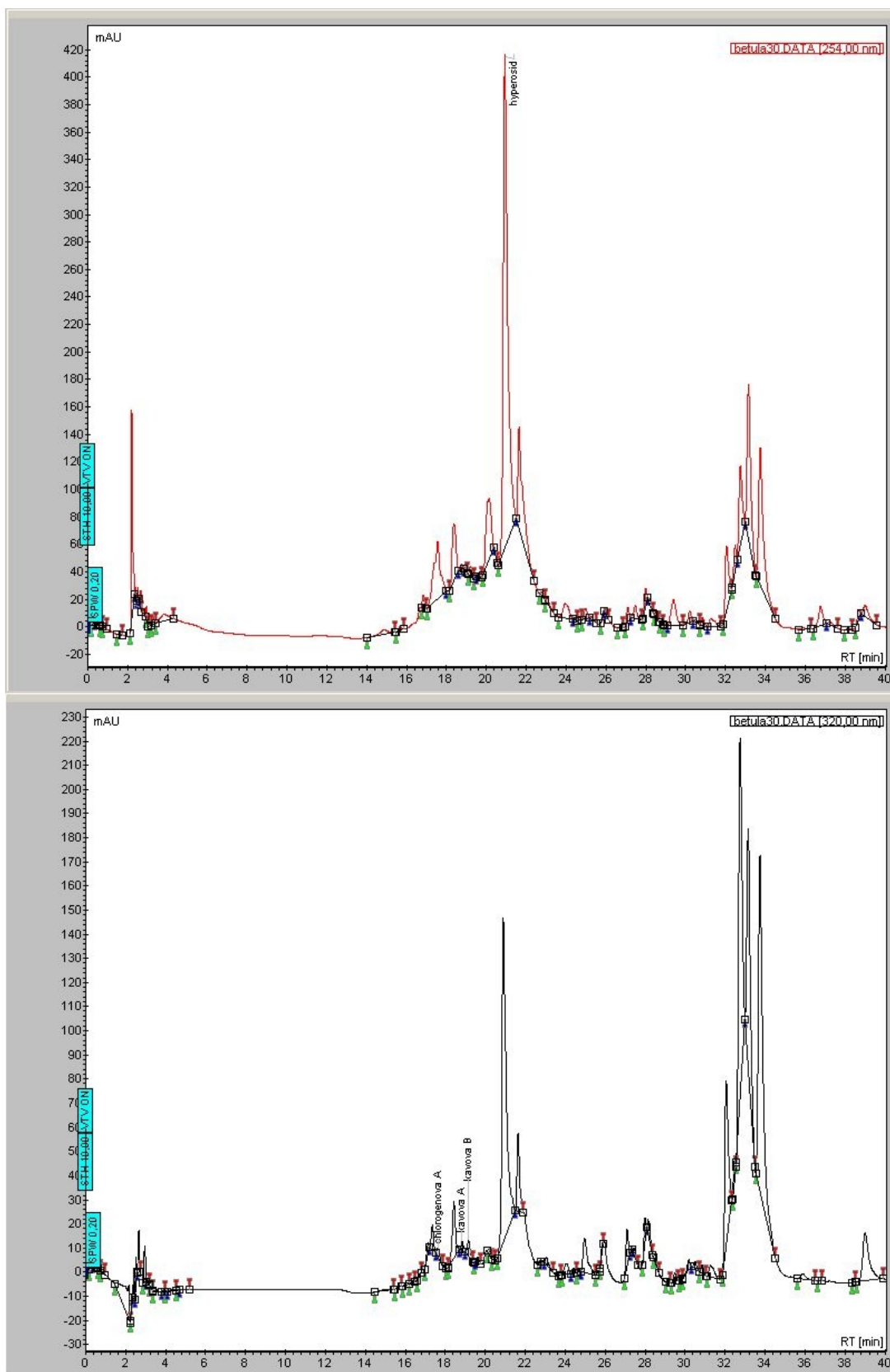
Obr. č. 9 HPLC - Kyselina kávová



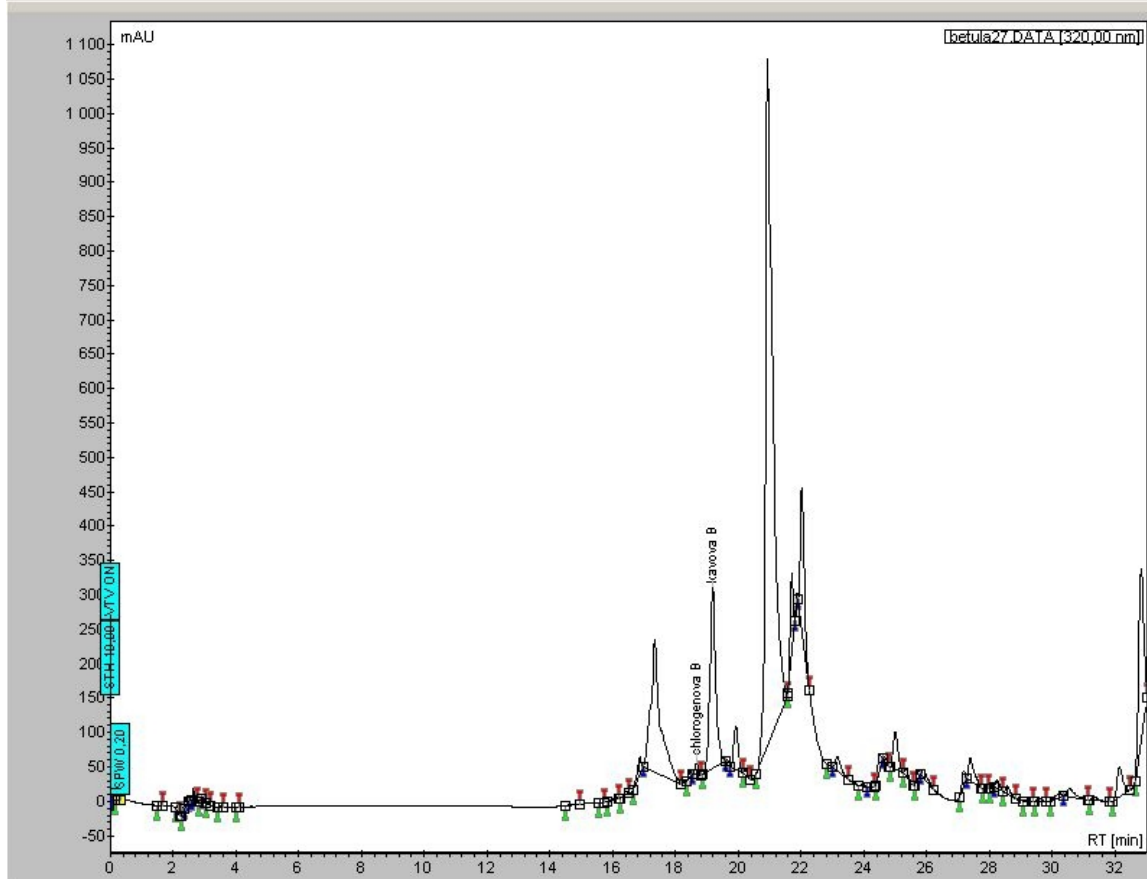
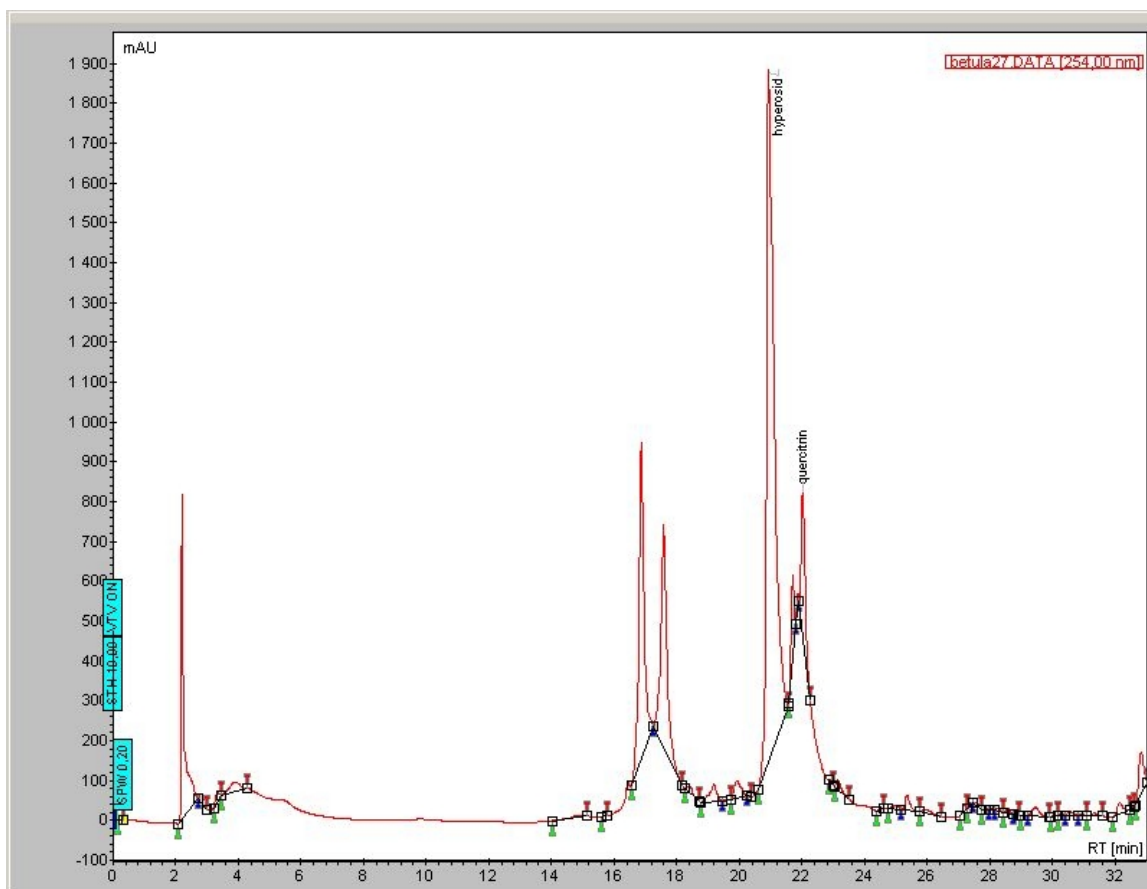
Obr. č. 10 HPLC - Kvercitrin



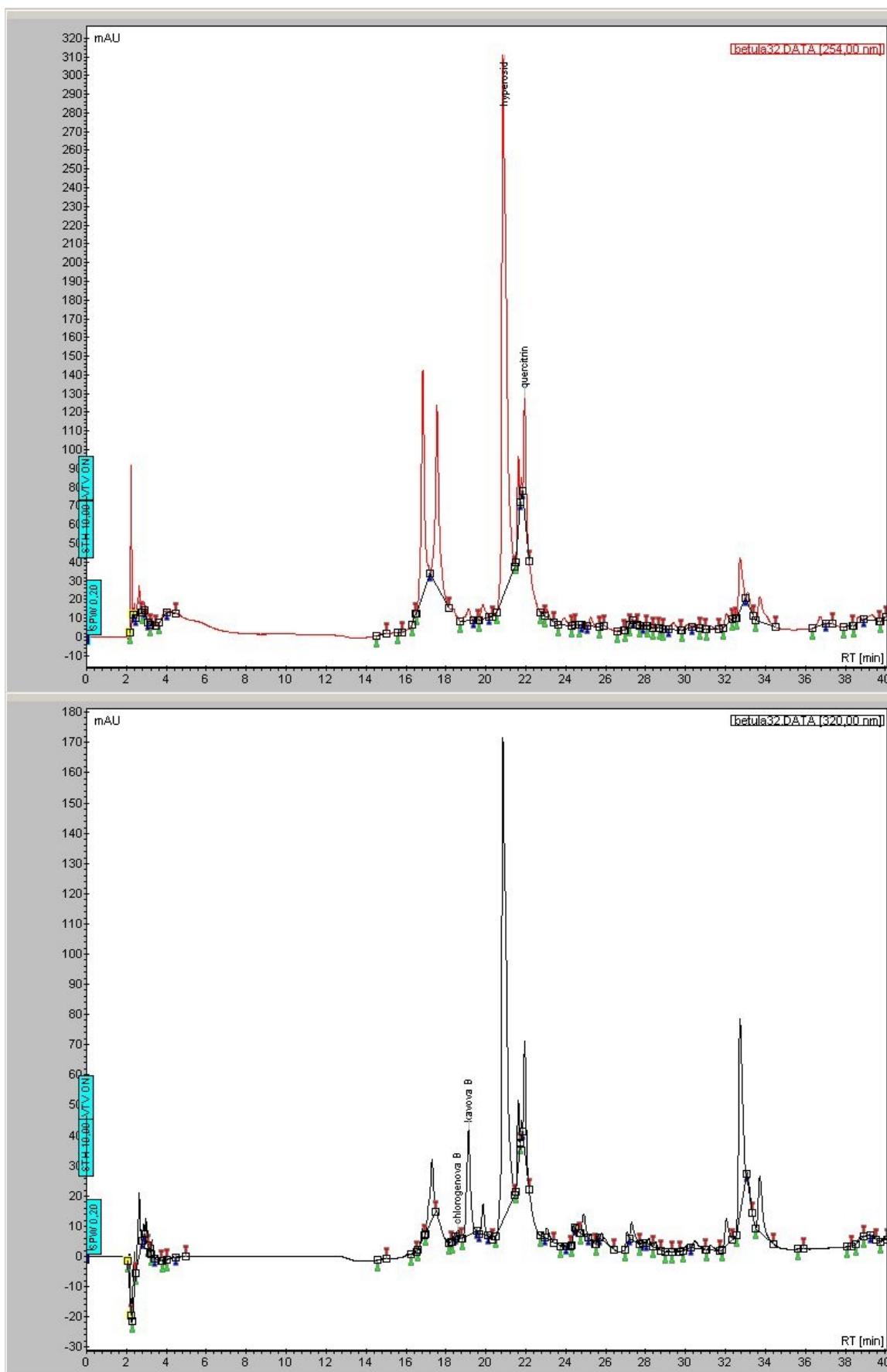
Obr. č. 11 HPLC – vzorek 1 pupeny březan



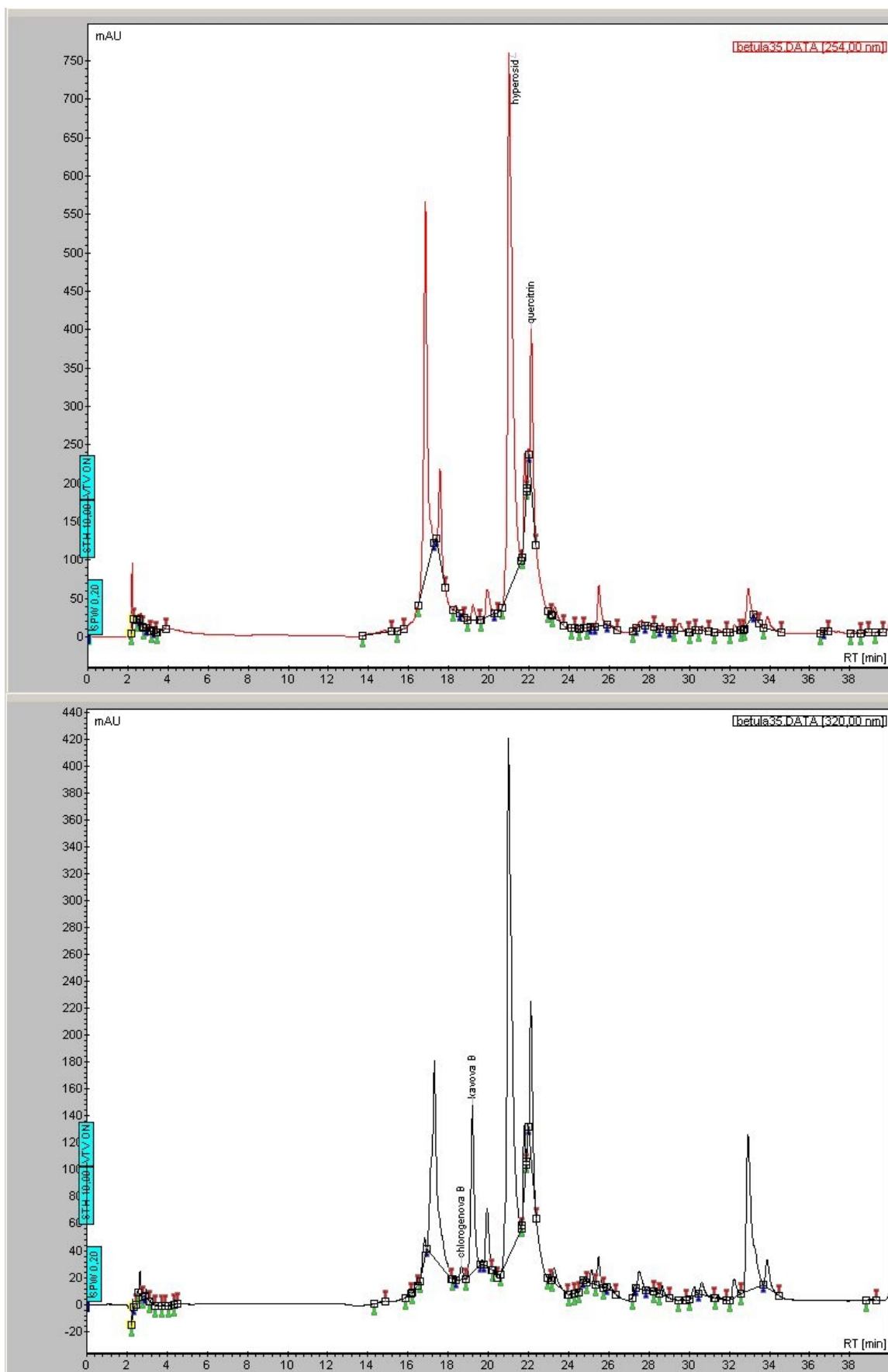
Obr. č. 12 HPLC – vzorek 2 pupeny duben



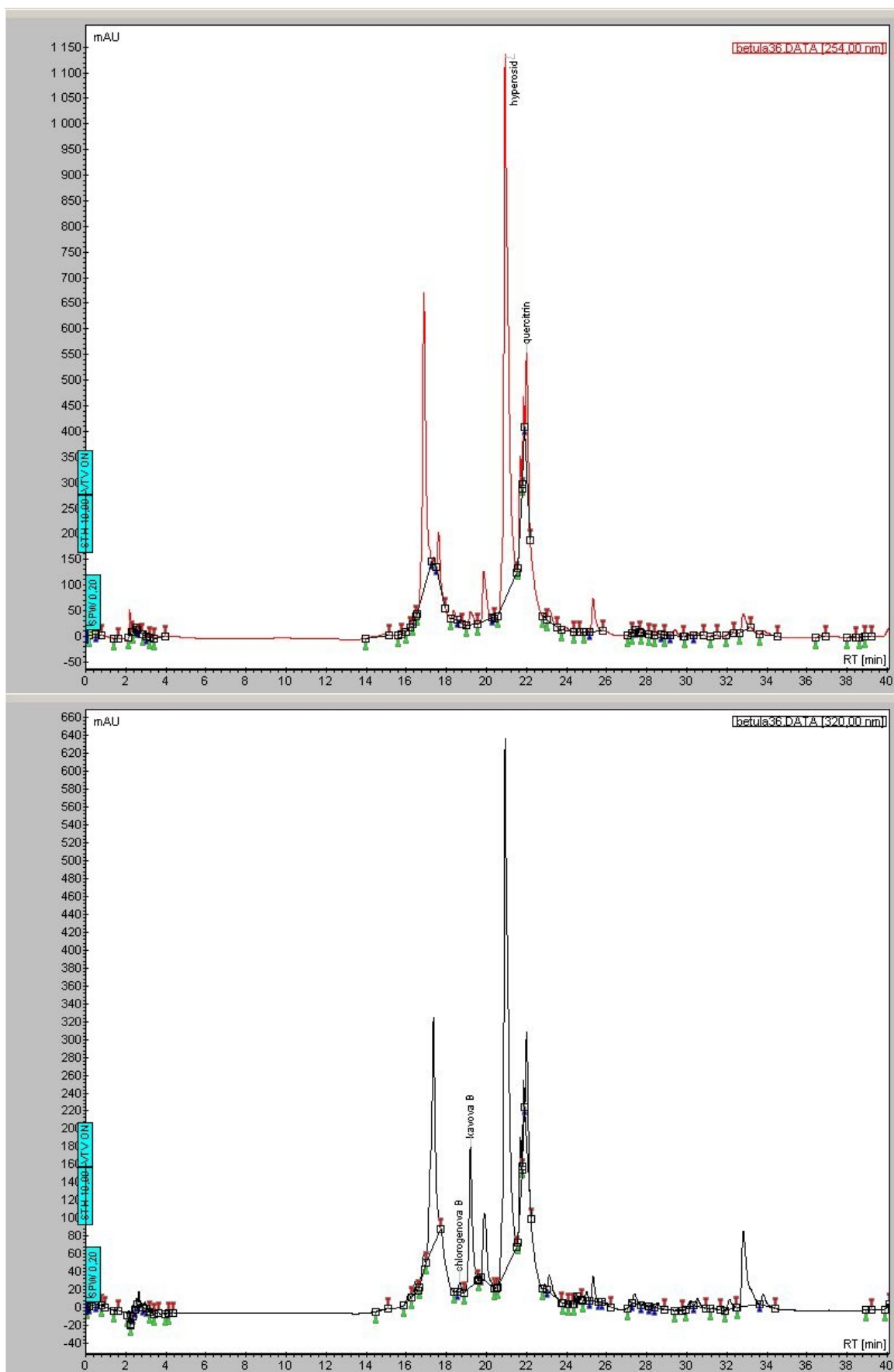
Obr. č. 13 HPLC – vzorek 3 listy duben



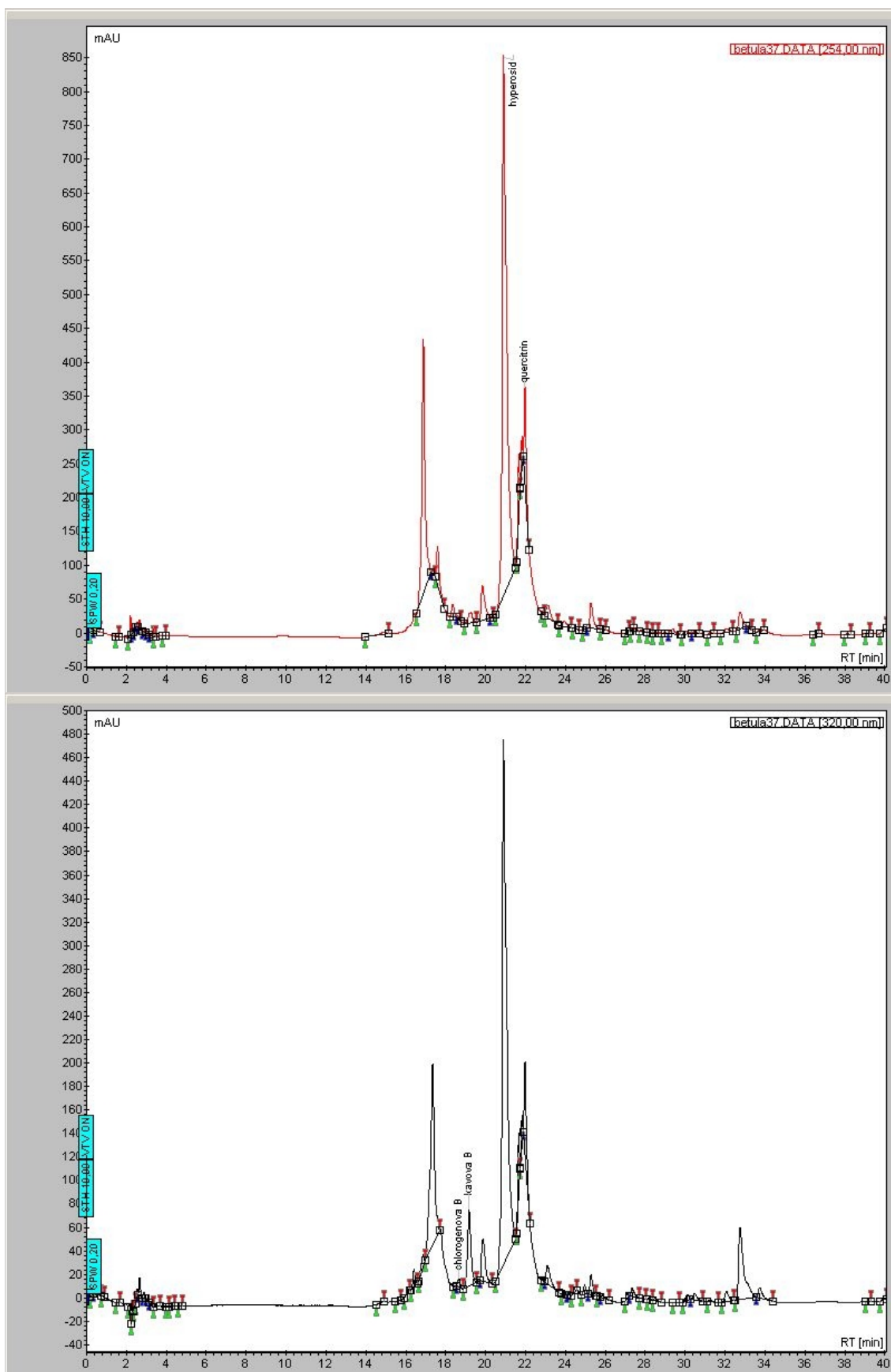
Obr. č. 14 HPLC – vzorek 4 listy květen začátek



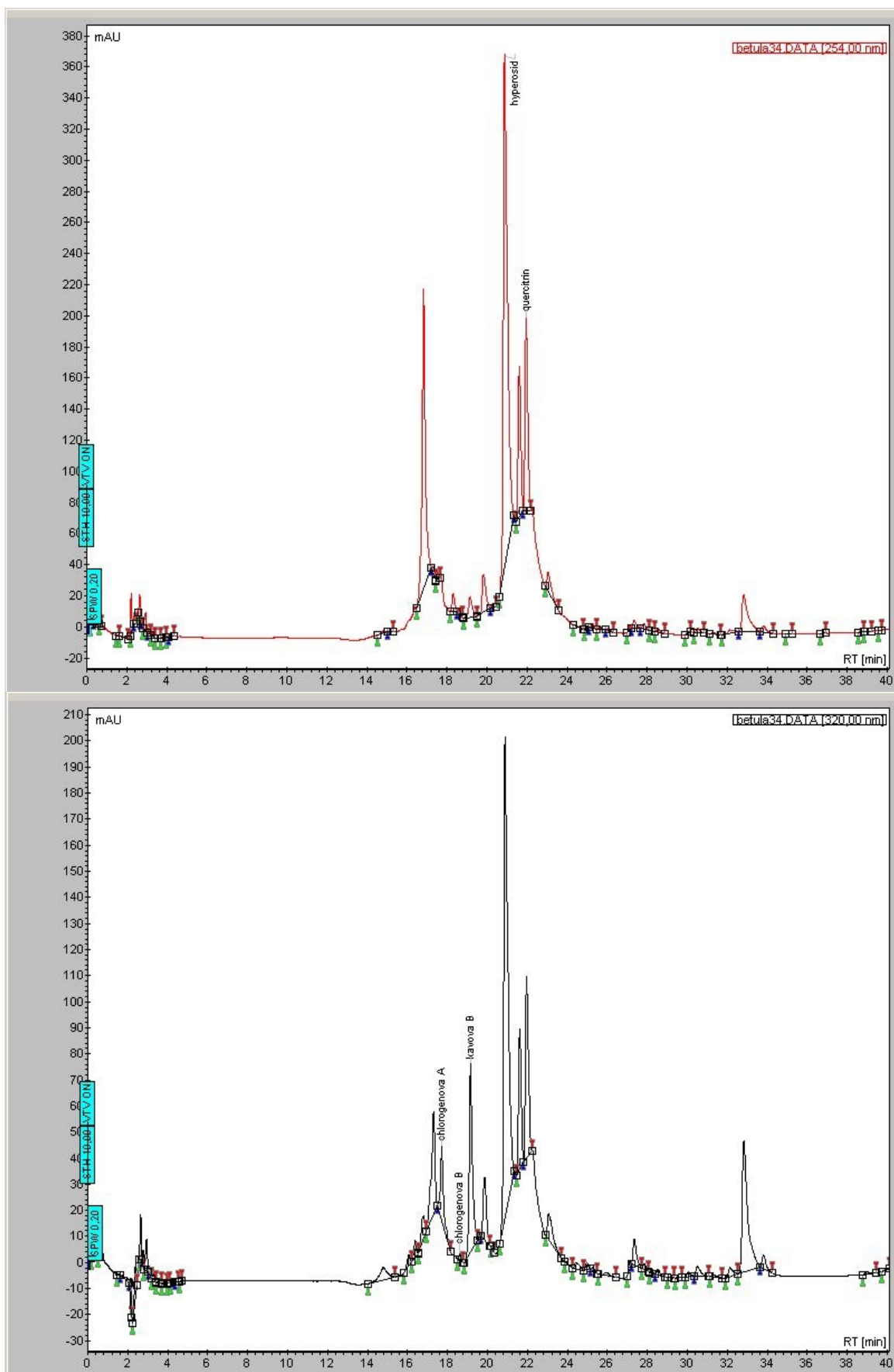
Obr. č. 15 HPLC – vzorek 5 listy květen konec



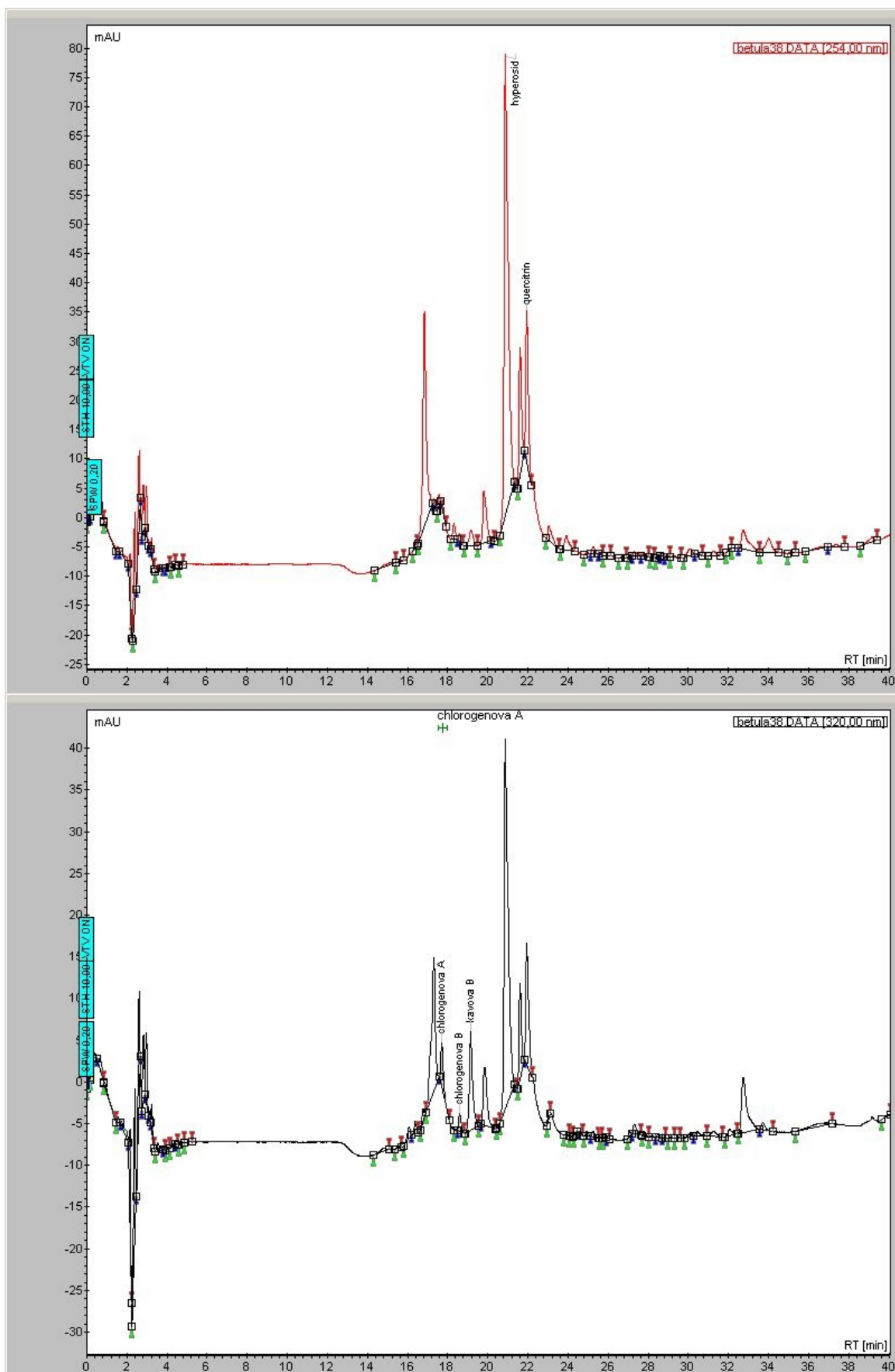
Obr. č. 16 HPLC – vzorek 6 listy červen



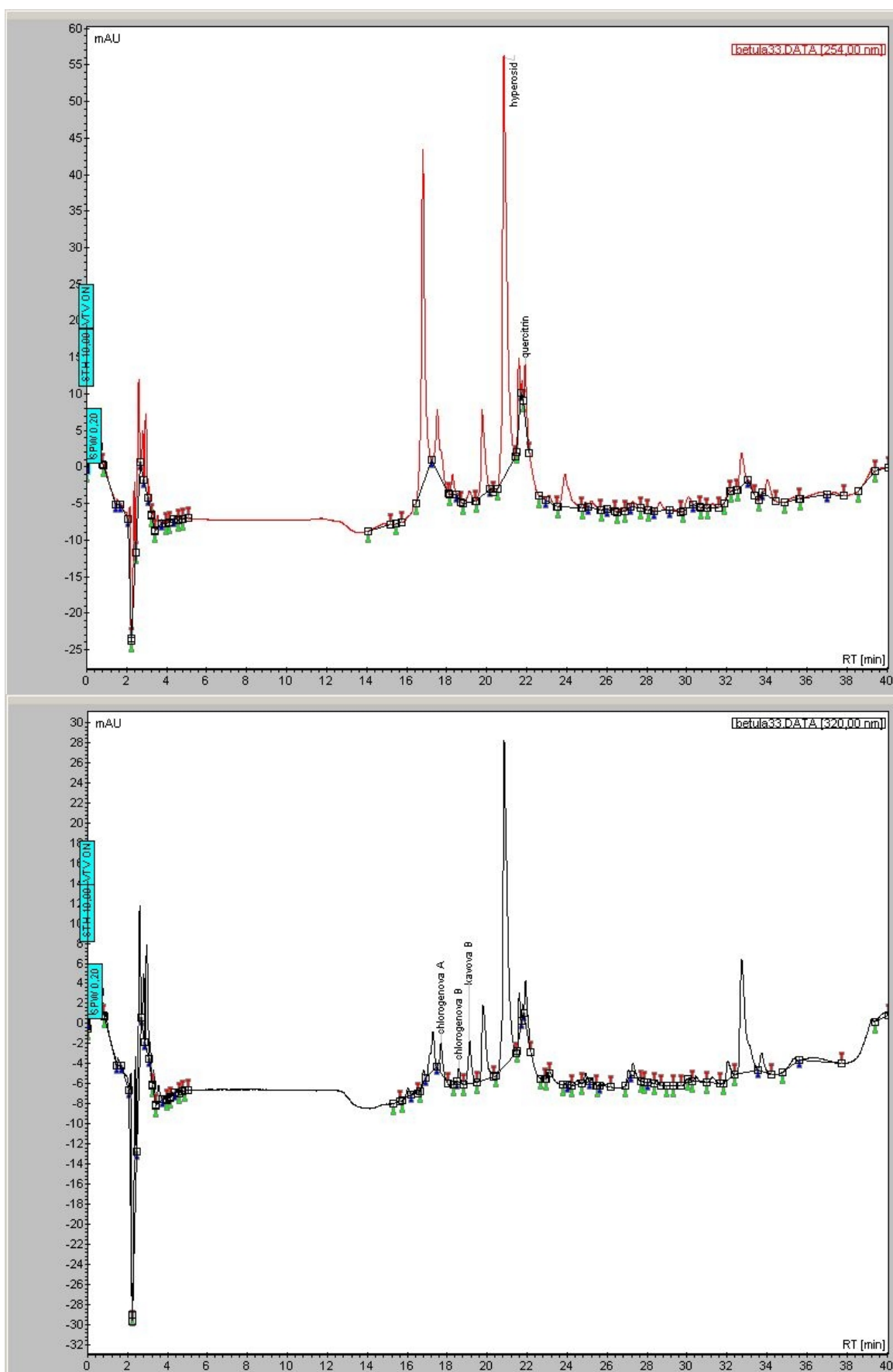
Obr. č. 17 HPLC – vzorek 7 čerstvé listy červen 2006



Obr. č. 18 HPLC – vzorek 8 sušené listy červen 2006



Obr. č. 19 HPLC – vzorek 9 Betulae folium



6 DISKUSE

Pro náš organismus je důležitá rovnováha mezi antioxidanty a volnými radikály. Při převaze volných radikálů mluvíme o oxidačním stresu.

Mohou být významnými ochrannými štíty v organismu, ale na druhou stranu volné radikály významně figurují ve vzniku a vývoji mnoha onemocnění. Sehrávají také důležitou roli při hypoxii, ischemii, zánětu a stárnutí buněk. Nejen že komplikují průběh některých nemocí, ale mnohdy jsou i vyvolávajícími faktory vzniku jak akutních tak chronických onemocnění.

Mají vliv na rozvoj kardiovaskulárních onemocnění, jako hypercholesterolémie a následná aterosklerosa, hypertenze, hyperhomocysteinémie a samozřejmě akutních stavů, jako je infarkt myokardu a trombozy. Ovlivňují také dýchací cesty (astma, chronická bronchitis, CHOPN, bronchopulmonální dysplazie). Dále figurují u onemocnění gastrointestinálního traktu, jater, pankreatu a ledvin (glomerulonefritidy, iscemie, neuropatie) Hrají roli při diabetu 1. i 2. typu. Zřejmě figurují i při vzniku Alzheimerovy choroby a Parkinsonovy choroby. A neméně důležité jsou i reakce volných radikálů s melaninem v kůži a účinky UV záření na stárnutí pokožky. Podílí se vzniku nádorového bujení, protože způsobují vznik mutací a ovlivňují apoptózu. ^{2, 29}

Mezi důležité přírodní zdroje s antioxidační funkcí patří mimo jiné i fenolické sloučeniny, z nich nejprostudovanější flavonoidy. Antioxidační účinek je podmíněn polohou hydroxylových skupin, přítomností dvojných vazeb.

Výsledky několika epidemiologických studií zaměřených na vliv konzumace ovoce a zeleniny na výskyt kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny ukázaly, že hydroxyskořicové kyseliny (HSK) mohou mít i v organismu antioxidační a antikarcinogenní vlastnosti. ³⁰

Hydroxyskořicové kyseliny jsou deriváty fenylypropanu s navzájem velmi podobnou strukturou a vlastnostmi. Jsou v rostlinách rozšířené, často se vyskytují spolu s flavonoidy a nacházejí se také v rostlinné potravě (ovoce, zelenina, ořechy) a v pochutinách (víno, čaj, káva, olivový olej).

Nejrozšířenější látky jsou kyselina kávová, kyselina chlorogenová a kyselina p-kumarová. Vyskytují se buď volné nebo vázané ve formě esterů, glykosidů, vázané na organické kyseliny a lipidy. Vzhledem ke struktuře, zejména OH skupinám v o- postavení na aromatickém kruhu, mají tyto látky předpoklady zhaset volné radikály.

Další významnou skupinou obsahových látek s antioxidační aktivitou jsou flavonoidy. Ze studií vztahů mezi strukturou a antioxidační aktivitou vyplývá, že velmi účinné jsou kvercetiny. Hyperosid a kvercitrin byl obsažen v *Betulae folium*.

Sledování obsahu fenolických látek, HSK a flavonoidů v pupenech a listech břízy a stanovení antioxidační aktivity jsem se věnovala ve své práci. Vzorky byly sbírány v průběhu ontogeneze.

Chromatografický profil fenolických látek ukazují záznamy HPLC analýzy na obr. 11 – 19. Výsledky stanovení HSK uvádí tab. 12 a graf 10.

Maximální obsah kyseliny kávové (počítáno na vysušenou drogu) byl v pupenech 0,153 mg/g, v listech 0,106 mg/g. Přítomnost kyseliny chlorogenové (0,093 mg/g) byla zaznamenána až v listech plně vyvinutých (sběr červen).

Obsah flavonoidů v hodnocených vzorcích ukazuje tab. 12 a graf 10. Vysoký obsah hyperozidu byl v pupenech těsně před rozvinutím a v mladých listech, další maximum, ale nižší bylo v mladých listech sbíraných koncem května. Obsah 4,661 mg/g byl srovnatelný s obsahem v sušených listech i v droze *Betulae folium* zakoupené v lékárně (4,403). Přítomnost kvercitrinu byla zaznamenána až v pupenech před rozvinutím (0,814 mg/g), srovnatelné množství bylo v mladých listech (0,82 mg/g), načež následoval prudký pokles a během vegetace byla hladina kvercitrinu v listech vyrovnána. Významné zvýšení obsahu kvercitrinu bylo zaznamenáno v listech po usušení – viz graf 10. V listech ze stejného sběru jsou ve spektru i množství látek výrazné rozdíly mezi čerstvými a usušenými listy.

Vzhledem k přítomnosti flavonoidů a HSK byla sledována také antioxidační aktivita extraktů listů v různém ontogenetickém stadiu a aktivita extraktů drogy *Betulae folium* lékopisné kvality. Antioxidační aktivita byla testována na základě schopnosti zhášet radikál DPPH. Výsledky uvádí tab. 13 a graf 11. Pro porovnání aktivity byla vypočtena IC_{50} . Z grafu 11 je patrné, že AA extraktů klesá během ontogeneze, maximální je u pupenů ($IC_{50} = 0,2398$), nejnižší je listů již vyvinutých, sbíraných v období od května do června (1,3486, 1,3556, resp. 1,1634). U starších listů antioxidační aktivita opět stoupá. Sušené listy z vlastního sběru i zakoupená droga mají aktivitu shodnou ($IC_{50} = 0,5938$, resp. 0,5769) jen o málo nižší než byla u extraktů z plně vyvinutých pupenů. Protože byl sledován obsah jen vybraných látek – kyseliny chlorogenové a kyseliny kávové a flavonoidů kvercitrinu a hyperosidu, nelze učinit jednoznačný závěr o vztahu mezi množstvím fenolických látek a naměřenou antioxidační aktivitou. Nízký obsah sledovaných fenolických látek u pupenů (viz

tab. 12), avšak vysoká aktivita (viz graf 11) naznačuje, že na antioxidační aktivitě se podstatnou měrou podílejí ještě další látky.

7 ZÁVĚR

V listech břízy sbíraných během ontogeneze byly HPLC sledovány vybrané fenolické látky ze skupiny hydroxyskořicových kyselin a flavonoidů.

Maximální obsah kyseliny kávové (počítáno na vysušenou drogu) byl v pupenech 0,153 mg/g, v listech 0,106 mg/g. Přítomnost kyseliny chlorogenové (0,093 mg/g) byla zaznamenána až v listech plně vyvinutých (sběr červen).

Vysoký obsah hyperosidu 8,91 a 8,446 mg/g byl v pupenech těsně před rozvinutím a v mladých listech, další maximum, ale nižší bylo v mladých listech sbíraných koncem května. Obsah hyperosidu v listech na konci května 4,661 mg/g byl srovnatelný s obsahem v sušených listech i v droze *Betulae folium* zakoupené v lékárně. Přítomnost kvercitrinu byla zaznamenána až v pupenech před rozvinutím (0,814 mg/g), srovnatelné množství bylo v mladých listech (0,820 mg/g) načež následoval prudký pokles a během vegetace byla hladina kvercitrinu v listech vyrovnaná. Významné zvýšení obsahu kvercitrinu bylo zaznamenáno v listech po usušení (1,028 mg/g). V listech ze stejného sběru jsou ve spektru i množství látek výrazné rozdíly mezi čerstvými a usušenými listy.

Antioxidační aktivita byla testována na základě schopnosti zhášet radikál DPPH. Pro porovnání aktivity byla vypočtena IC_{50} . Antiradikálová aktivita extraktů klesá během ontogeneze, maximální je u pupenů ($IC_{50} = 0,2398$ a $0,4785$), nejnižší je u listů již vyvinutých, sbíraných v období od května do června ($1,3486$, $1,3556$, resp. $1,1634$). U starších listů antioxidační aktivita opět stoupá. Sušené listy z vlastního sběru i zakoupená droga mají aktivitu shodnou ($IC_{50} = 0,5938$, resp. $0,5769$), jen o málo nižší než byla u extraktů z plně vyvinutých pupenů.

Nízký obsah sledovaných fenolických látek u pupenů avšak vysoká aktivita naznačuje, že na antioxidační aktivitě se podstatnou měrou podílejí ještě další látky.

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. Racek, J.: Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. Galén, Praha, 2003
2. Štípek, S. et al.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Grada, 2000
3. Nečas, E. et al.: Obecná patologická fyziologie, Praha, Nakladatelství Karolinum, 2000, s. 213 –140, s. 347
4. Dapkevicius, A., van Beek, T. A., Niederländer, H. A. G., Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates., 2001; s. 73-82
5. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C.: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity., 28-1995, 25- 30
6. Tomko, J. et al.: Farmakognózia. 2. vyd. Osveta, Martin, 1999, s. 184
7. Mosaik Verlag GmbH, Bertelsmannův zahradní lexikon. Mnichov, 1998, s. 122 – 124
8. Hejný, S., Slavík, B., et al.: Květena České republiky. 2. Academia, Praha, 1990, 35 – 46
9. <http://www.avicennum.cz/item/betula-pendula-briza-belokora.cz>
10. Rubcov, V.G., Beneš, K.: Zelená lékárna. Praha, Lidové nakladatelství, 1984, 1985, s. 50 – 51
11. Jaroš, Z.: Léčivé látky z rostlin. Nakladatelství DONA, 1992, s. 15
12. Loponen, J., Ossipov, V., Koricheva, J., et al.: Low molecular mass phenolic in foliage of *Betula pubescens* Ehrh. in relation to aserial pollution., Chemosphere, 1997; 4, s. 687 – 697
13. Jahodář, L.: Pharamcobotanica – semenné rostliny. Praha, Nakladatelství Karolinum, 2006, s. 56
14. Bruneton, J.: Pharmacognozy. 2. edition, Lourdes, Paris, N.Y., Editions TEC A DOC, Lavoisier, 1999, s. 760 – 761

15. Ossipov, V., Loponen, J., Ossipova, S., et al.: Gallotannins of Birch *Betula pubescens* Leaves : HPLC Separation and Qualification. *Biochemical Systematic and Ecology*, 1997; 6, s. 493 – 504
16. Ossipov, V., Salminen, J., Ossipova, S., et al.: Gallic acid and hydrolisable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway., *Biochemical Systematic and Ecology*, 2003; 31, s. 3 – 16
17. Korbelař, J., Endris, Z., et al.: Naše rostliny v lékařství. 4. vyd., Praha, Avicenum, 1973, 110 - 111
18. Keinänen, M., Julkunen-Tiitto, R.: High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. *Journal of Chromatography A*, 1998; 793, s. 370 – 377
19. Ossipov, V., Nurmi, K., Loponen, J., et al. : High-performance liquid separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*. *Journal of Chromatography A*, 1996; 721, s. 59 – 68
20. Ossipov, V., Nurmi, K., Loponen, J., et al. : HPLC Isolation and identification of flavonoids White Birch *Betula pubescens* Leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1995; 23, s. 213 – 222
21. Rauha, J., Remes, S., Heinonen, M., et al. : Antimicrobial effect of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 2000; 56, s. 3 – 12
22. Soudamini, K.K., Kuttan, R.: Inhibition of chemical carcinogenesis by curcumin. *Journal of Ethnopharmacology*, 1989; 27, s. 227 – 233
23. Ju, E. M., Lee, S.E., Hwang, H. J., et al. : Antioxidant and anticancer activity of extract from *Betula platiphylla* var. *japonica*. *Life Sciences*, 2004; 74, s. 1013 – 1026
24. Mikroverze AISLP – ČR, 2003. 3 pro MS Windows
25. Kolektiv autorů, European Pharmacopoeia. 4th Edition, Strassbourgh, EDQM, 2002
26. Kolektiv autorů : ČSN ISO 3534 – 1, Statistika – slovník a značky, část 1. : Pravděpodobnost a obecné statistické termíny., Praha, ČNI, 1994, s. 4
27. Kolektiv autorů : Věstník SÚKL 1, 6, 1999

28. Dušek, J., Kašparová, M., Spilková, J., et al.:Praktická cvičení z farmakognozie. 1. vyd., Praha, Nakladatelství Karolinum, 2002, s. 24
29. Fölsch, U.R., Kochsiek, K., et al. : Patologická fyziologie. 1. vyd., Praha, Grada, 2003, s. 158, 242, 289, 365
30. Laranjihy, J. : Caffeic acid and related antioxidants compounds : Biochemical and Cellular effect. In: Cadenas, E., Packer, L. :Handbook of antioxidants. 2. ed., Marcel Decker, New York, Basel, 2002, p. 279 - 302