

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakognosie

Diplomová práce

2009

Petra Mikšátková

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakognosie

Diplomová práce

Antiradikálová aktivita extraktů

Fagopyri herba

Vypracovala: Petra Mikšátková

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

Oponent:

Datum zadání: 30.11.2007

Termín odevzdání: 15.5.2009

Datum obhajoby: 2.6.2009

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

Děkuji Doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc. za odborné vedení a pomoc při řešení této diplomové práce. Dále děkuji PharmDr. Tomáši Siatkovi, CSc. za provedení lyofilizace.

V Hradci Králové

15.5.2009

Obsah

1	ÚVOD	7
2	CÍL PRÁCE	10
3	TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1	ZAŘAZENÍ A POPIS RODU <i>FAGOPYRUM</i>	11
3.1.1	<i>Taxonomické zařazení</i>	11
3.1.2	<i>Fagopyrum esculentum Moench – Pohanka obecná</i>	12
3.1.3	<i>Fagopyrum tataricum Gaerth – Pohanka tatarská</i>	12
3.1.4	<i>Další druhy rodu Fagopyrum</i>	13
3.1.5	<i>Obsahové látky rodu Fagopyrum a jejich vlastnosti</i>	14
3.1.5.1	Flavonoidy	14
3.1.5.2	Další obsahové látky	15
3.1.6	<i>Použití jednotlivých druhů rodu Fagopyrum</i>	19
3.2	VOLNÉ RADIKÁLY.....	21
3.2.1	<i>Pojem volného radikálu</i>	21
3.2.2	<i>Vznik volných radikálů</i>	21
3.2.3	<i>Typy volných radikálů</i>	22
3.2.3.1	Reaktivní formy kyslíku	22
3.2.3.2	Reaktivní formy dusíku	24
3.2.4	<i>Poškození biomolekul volnými radikály</i>	25
3.2.5	<i>Nemoci a stavy způsobené volnými radikály</i>	26
3.2.6	<i>Příznivé účinky volných radikálů</i>	27
3.2.7	<i>Rovnováha mezi volnými radikály a antioxidanty</i>	27
3.3	ANTIOXIDANTY – OCHRANA PŘED VOLNÝMI RADIKÁLY	27
3.3.1	<i>Příklady jednotlivých antioxidantů</i>	29
3.3.1.1	Antioxidační enzymy.....	29
3.3.1.2	Vysokomolekulární endogenní antioxidanty.....	30
3.3.1.3	Nízkomolekulární antioxidanty	31
3.4	ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA RODU <i>FAGOPYRUM</i>	35

3.5	METODY POUŽITÉ KE STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY – TEORETICKÝ ZÁKLAD	
	37	
3.5.1	Zhášení DPPH	37
3.5.2	Zhášení superoxidu generovaného neenzymaticky	37
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1	POUŽITÝ MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	38
4.1.1	Rostlinný materiál	38
4.1.2	Použité chemikálie	38
4.1.3	Přístrojové vybavení	39
4.2	STANOVENÍ OBSAHU FLAVONOIDŮ DLE ČL 2005	40
4.3	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	40
4.3.1	Metoda zhášení superoxidového radikálu generovaného neenzymaticky.....	41
4.3.2	Metoda zhášení radikálu DPPH	43
4.3.2.1	Stanovení antioxidační aktivity methanolového extraktu drogy	43
4.3.2.2	Stanovení antioxidační aktivity lyofilizátu vodného extraktu	44
4.4	VÝSLEDKY	46
4.4.1	Tabulky.....	46
4.4.1.1	Stanovení obsahu flavonoidů.....	46
4.4.1.2	Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení superoxidu	46
4.4.1.3	Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení radikálu DPPH.....	48
4.4.1.4	Porovnání hodnot IC ₅₀	50
4.4.2	Grafy	52
4.4.2.1	Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení superoxidu	52
4.4.2.2	Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení radikálu DPPH.....	55
5	DISKUZE.....	59
6	ZÁVĚR.....	61
7	POUŽITÉ ZDROJE	62
8	ABSTRAKT.....	64
9	ABSTRACT.....	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.

1 Úvod

Rod *Fagopyrum* z čeledi *Polygonaceae* zahrnuje druhy, které jsou rozšířené především v severních teplotních oblastech. Obsahuje některé běžné obilniny a rostliny používané v medicíně. (1) Jako potravina se používají dva druhy, *F. esculentum* (pohanka obecná) a *F. tataricum* (pohanka tatarská). (2) Pohanka je celosvětově uznávaná jako výhodný zdroj nutričně hodnotných proteinů, lipidů, vlákniny a minerálů. Díky kombinaci s ostatními obsahovými látkami je jí věnována zvýšená pozornost jako výhodné funkční potravině. (3) Mezi významné obsahové látky patří především flavonoidy, které ve zmíněných druzích zastupují hlavně rutin, kvercetin, orientin, isoorientin, vitexin a isovitexin. Dále jsou obsaženy například katechiny, anthocyaniny, 2''-hydroxynikotinamin, skvalen, D-chiro-inositol nebo fototoxický fagopyrin. (3, 4, 5, 6, 7, 8)

Především díky obsahu flavonoidů je pohanka široce terapeuticky využitelná. Využití flavonoidů je založeno na jejich schopnosti normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemoragicky a antiedematózně. Jsou inhibitory hyaluronidasy, brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi. Některé působí diureticky, rozšiřují cévy, snižují krevní tlak. S vápenatými ionty tvoří komplexní soli a brání tak srážení krve a zadržují vápník v těle. Potencují účinek vitamínu C. Mají též vlastnosti choleretické, cholagogní a spasmolytické. (9) Flavonoidy také inhibují oxidaci lipoproteinů, čímž hrají významnou roli v procesu aterosklerózy. (3) Droga *Fagopyri herba* má dále účinky hypotenzivní a antikancerogenní. Většina těchto vlastností je důsledkem výrazného antioxidačního účinku flavonoidů, díky kterému by se mohl extrakt z pohanky používat v potravinářství místo syntetických antioxidantů. Je považován za zdravotně nezávadný a mohl by proto být používán ve vyšších koncentracích, než je povoleno pro antioxidanty syntetické. (10)

Antioxidační aktivita, tedy schopnost zhaset volné radikály, je výhodnou vlastností řady látek, neboť volné radikály se výrazně podílí na vývoji některých patologických jevů.

Volné radikály jsou látky, které mají ve svém elektronovém obalu nepárový elektron, případně více nepárových elektronů a jsou schopné samostatné existence. Do organismu se dostávají zvenčí, velká část však vzniká i v průběhu metabolismu. Příčiny vzniku se pak dělí na exogenní (například ionizující záření, škodliviny ze vzduchu, kouření, intoxikace nebo potrava) a endogenní, ke kterým patří například vznik kyseliny močové (např. při úrazech či

nekrózách), rozpad fagocytů a makrofágů (záněty, popáleniny), vznik methemoglobinu nebo třeba reperfuze po předchozí ischemii včetně svalového výkonu na kyslíkový dluh. (11)

V organismu běžně vznikají reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species - ROS) a dusíku (reactive nitrogen species - RNS). Mezi reaktivní formy kyslíku patří například superoxid, peroxid vodíku nebo kyselina chlorná. Reaktivní formy dusíku zastupují například oxid dusnatý nebo peroxyinitrit. (11, 12)

Nebezpečí volných radikálů tkví v jejich vysoké reaktivitě. Volná látka může napadnout prakticky kteroukoli molekulu organismu a způsobit tak její oxidační poškození. Nejzávažnější je poškození fosfolipidů buněčných membrán, vedoucí k poruše životně důležitých membránových dějů či dokonce zániku buňky, dále poškození nukleových kyselin, které má za následek mutagenezi, karcinogenezi až zánik buňky, a poškození bílkovin. To vede k inaktivaci enzymů a jiných bílkovin s různým biologickým významem. (11)

Volné radikály mají však vedle škodlivého působení na organismus i řadu příznivých účinků. Podílí se například na fagocytóze mikroorganismů nebo na biosyntéze cholesterolu a žlučových kyselin. Některé mají funkci signálních molekul. V organismu by proto měly být volné radikály a antioxidanty v neustálé rovnováze, neboť převaha jedné i druhé složky vede k poruchám. (11)

Organismus používá tři možné typy ochrany před volnými radikály. Nejbezpečnějším způsobem je bránit se tvorbě nadměrného množství reaktivních forem kyslíku nebo dusíku. Další možností je záchyt a odstranění radikálů, které se již vytvořily. Na antioxidační ochraně se podílejí též obecné reparační mechanismy poškozených biomolekul. (11, 12) Jako antioxidanty tak působí některé enzymy (například superoxiddismutasa, glutathionperoxidasa, glutathiontransferasa a katalasa), dále některé vysokomolekulární endogenní látky. Jedná se o řadu proteinů, které jsou schopny vázat přechodné prvky (Fe, Cu) a měnit jejich oxidoredukční vlastnosti tak, že tyto prvky přestanou katalyzovat radikálové reakce. Takto působí například transferin, ferritin nebo laktoferin. Ochranu před volnými radikály poskytují také některé nízkomolekulární látky. Patří sem například vitamin C, α -tokoferol, koenzym Q, karotenoidy a vitamin A, thioly a disulfidy, melatonin a již zmíněné polyfenolické látky, například flavonoidy obsažené v droze *Fagopyri herba*. (11)

Porovnáním antioxidační aktivity drogy *Fagopyri herba* s řadou významných antioxidantů byla zjištěna výrazná účinnost pohanky. Věnuje se jí proto další pozornost pro možné využití těchto vlastností v praxi.

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo prokázat a zhodnotit antioxidační účinky extraktů nati pohanky – *Fagopyri herba* a zpracovat přehled nových poznatků o obsahových látkách a biologické aktivitě druhů rodu *Fagopyrum*.

3 Teoretická část

3.1 Zařazení a popis rodu *Fagopyrum*

Rod *Fagopyrum*, čeleď *Polygonaceae*, zahrnuje 19 druhů (29), které jsou rozšířené především v severních teplotních oblastech. (1)

3.1.1 Taxonomické zařazení

říše: *Plantae*

kmen: *Magnoliophyta*

třída: *Magnoliopsida*

řád: *Polygonales*

čeleď: *Polygonaceae*

rod: *Fagopyrum* sp.

druh: *F. callianthum*

F. capillatum

F. cymosum

F. dibotrys

F. esculentum

F. gilesii

F. gracilipedoides

F. gracilipes

F. homotropicum

F. jinshaense

F. leptopodum

F. lineare

F. macrocarpum

F. megacarpum

F. pleioramosum

F. rubifolium

F. statice

F. tataricum

F. urophyllum (13, 29)

Fylogeneticky se rod dělí do dvou monofyletických skupin: skupina *F. cymosum* a skupina *F. urophyllum*.(13)

Rod obsahuje některé běžné obilniny a rostliny používané v medicíně. (1) Jako potravina se používají dva druhy, *F. esculentum* a *F. tataricum*. (2)

3.1.2 *Fagopyrum esculentum* Moench – Pohanka obecná

Tento druh je původní v severní Asii a Evropě (14), pěstuje se v mnoha částech světa, občas i přechodně zplaňuje (především v Evropě, Asii, Severní Americe). V porovnání s *F. tataricum* se pěstuje častěji například v Evropě, USA, Kanadě, Jižní Africe, Austrálii, Japonsku a severních částech Číny. (15) U nás se pěstuje jako polní plodina, zplaňuje na skládkách a rumišťích, podél silnic a železničních tratí.

Pohanka obecná je jednoletá bylina, 40-70(-140) cm vysoká, lodyha je vzpřímená, jednoduchá nebo chudě větvená, listy jsou stejně dlouhé jako široké, dolní listy řapíkaté, horní přisedlé, čepele jsou trojúhelníkovité, na bázi srdčité až střelovité. Květenství je složené, podobné hroznům, květy jsou drobné, pětičetné, koruna bílá nebo narůžovělá, kvete od června do července. Plodem je trojboká nažka, jejíž hrany jsou po celé délce hladké, celokrajné. Plody jsou zhruba dvakrát delší než zaschlé okvětí. (30) Nažky *F. esculentum* mají v porovnání s nažkami *F. tataricum* sladší chuť, jsou větší a snadněji se zbavují slupek. Nevýhodou je však nižší obsah rutinu. (3)

3.1.3 *Fagopyrum tataricum* Gaerth – Pohanka tatarská

Tento druh se pěstuje spíše v hornatých oblastech jihozápadní Číny. Společně s *F. esculentum* je znám i v Indii a Nepálu. Růstu je schopen i v nepříznivějších podmínkách. (15)

Na rozdíl od *F. esculentum* jsou čepele listů většinou delší než široké a okvěti je zelenavé. Plody jsou na hranách vroubkované až zoubkaté, bývají až čtyřikrát delší než zaschlé okvěti. (30) Nevýhodou oproti nažkám *F. esculentum* je hořká chuť a obtížnější zbavování slupek. Výhodou je však vyšší obsah rutinu. (3)

3.1.4 Další druhy rodu *Fagopyrum*

F. homotropicum je divoký druh nalezený v jihovýchodní Číně. Představuje zástupce v hodného pro křížení. (3)

F. dibotrys je vzpřímená vytrvalá rostlina rostoucí převážně v Číně, Indii, Vietnamu, Thajsku a Nepálu. (1)

F. gracilipedoides je divoký jednoletý druh z jihozápadní Číny. Morfologicky je podobný *F. gracilipes* a *F. capillatum*. *F. gracilipedoides* se na rozdíl *F. gracilipes* vyznačuje heterostylií. *F. gracilipes* má většinou malé homostylické květy. Oproti *F. capillatum* má *F. gracilipedoides* menší listy, květy i nažky (přibližně 3 mm dlouhé). S výškou 20 až 50 cm je i nižšího vzrůstu (*F. capillatum* dorůstá výšky 60 až 150 cm). Stonek, ochrea a listy jsou u *F. gracilipedoides* i *F. gracilipes* silně ochlupené.

Z jihozápadní Číny pochází také *F. jinshaense*, jednoletý druh morfologicky podobný *F. gilesii* a *F. leptopodum*. Od *F. gilesii* se výrazně liší pouze květenstvím podobným klasu a od *F. leptopodum* dužnatými listy bez lesku. Listy *F. leptopodum* jsou lesklé. Druh *F. jinshaense* je 5 až 30 cm vysoký, s bílými květy. Čepele listů jsou střelovité, dužnaté, bez lesku a ochlupení. Stonek je na bázi lehce pokryt trichomy, jinak je hladký. Nažka je přibližně 1,5 mm dlouhá. (13)

3.1.5 Obsahové látky rodu *Fagopyrum* a jejich vlastnosti

3.1.5.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou deriváty fenylchromanu. Základem je chroman arylovaný v poloze 2 (flavany), 3 (isoflavany) nebo 4 (neoflavany). Vyskytují se pouze v rostlinné říši, a to nejčastěji flavany. Podle stupně oxidace pyranového kruhu se flavany dělí do několika skupin. Zvláště významné jsou deriváty 4-oxoflavanu – flavonoidy. Podle počtu a polo-hydroxylových skupin se rozlišují flavony, flavonoly a flavanony, a katechinové trísloviny – deriváty flavanu. V rostlinách se vyskytují většinou glykosidicky vázané. Účinné jsou však glykosidy i aglykony.

Terapeutické využití flavonoidů je založeno na jejich schopnosti normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemorhagicky a anti-edematosně. Jsou inhibitory hyaluronidasy, brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi. Některé působí diureticky, rozšiřují cévy, snižují krevní tlak. S vápenatými ionty tvoří komplexní soli a brání tak srážení krve a zadržují vápník v těle. Potencují účinek vitamínu C. Mají též vlastnosti choleretické, cholagogní a spasmolytické. (9) Flavonoidy také inhibují oxidaci lipoproteinů. Oxidace lipoproteinů o nízké denzitě indukovaná volnými radikály hraje významnou roli v procesu aterosklerózy. (3)

Díky inhibici diferenciaci adipocytů nebo zvýšením lipolýzy v adipocytech mohou působit proti vývoji obezity. S touto je spojen vznik steatózy jater. Příjmem flavonoidů potravou může dojít k potlačení vývoje steatózy. (16)

Nejrozšířenějším flavonoidem rodu *Fagopyrum* je rutin (kvercetin-3-O- β -rutinosid). Má kardioprotektivní, protizánětlivé a protikancerogenní účinky, ovlivňuje fragilitu kapilár. (4) Dále má vliv na relaxaci hladkých svalů. (5) Na potlačení vývoje steatózy jater se podílí inhibicí adipogeneze v preadipocytech a hepatocytech down-regulací exprese klíčového transkripčního faktoru adipogeneze. (16)

V pohance se vyskytuje také kvercetin (3',4'-dihydroxyflavonol), aglykon rutinu. (3)

Dalšími přítomnými flavonoidy jsou například orientin, isoorientin, vitexin a iso-vitexin. (10)

Spektrum flavonoidů *F. esculentum* se liší během klíčení semen. Suchá semena obsahují především kvercetin a rutin. Po dvoudenním klíčení vzrůstá celkový obsah flavonoidů,

koncentrace rutinu roste asi 10krát, objevuje se kvercitrin a naopak kvercetin již není detekován. (16) Nejvyšší obsah rutinu u *Fagopyrum esculentum* vykazují listy a květy v době plného kvetení. (5)

Také jednotlivé části semene se liší rozložením obsahových látek. Embryo a dělohy jsou části nejbohatší na rutin. Zároveň embryo, dělohy a testa obsahují nejvíce epikatechinu a epikatechin gallátu. V endospermu nebyla prokázána žádná ze studovaných látek (rutin, katechin, epikatechin ani epikatechin gallát). (4) Slupky semen *F. esculentum* obsahují z flavonoidů rutin, orientin, vitexin, kvercetin, isovitexin a iso-orientin. (10) Obsah rutinu v semenech klesá v pořadí *F. tataricum*, *F. homotropicum* a *F. esculentum*. Průměrný obsah celkových flavonoidů klesá ve stejném pořadí. (3)

Během růstu rostliny se mění obsah některých látek. Pozorováním *F. esculentum* a *F. tataricum* po dobu šesti týdnů od zasetí semen bylo zjištěno, že s růstem rostliny roste i množství některých látek (např. rutin) v listech. Jeho koncentrace byla po šesti týdnech vyšší u *F. tataricum*. Některé látky naopak během růstu ubývají. Jde například o kyselinu chlorogenovou nebo některé flavonoidy. Po 14 dnech růstu byly v obou druzích detekovány orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin a kvercetin. *F. esculentum* obsahovala více orientinu, isoorientinu a isovitexinu, množství vitexinu bylo u obou druhů zhruba srovnatelné, druh *F. tataricum* obsahoval více kvercetinu. Po šesti týdnech růstu byl detekovatelný pouze kvercetin, větší množství bylo dokázáno ve *F. esculentum*. (8)

Některé flavonoidy byly prokázány v oddenku *F. dibotrys* (např. kvercetin, 3-methylkvercetin, 3,5-dimethylkvercetin, rutin, lapathosid A). (1)

Spektrum obsahových látek se mění při případném zpracování rostliny. Například pohankové nažky se často používají tepelně opracované jako potravina. Touto úpravou však klesá obsah některých látek, například inositol fosfátu, tokoferolů a tokotrienolů, melatoninu a především flavonoidů. Koncentrace flavonoidů v celých nažkách po tepelném opracování klesla na polovinu původních hodnot. Pražené kroupy jich obsahovaly třikrát méně než pražené slupky. (17)

3.1.5.2 Další obsahové látky

Anthocyaniny

Anthocyaniny jsou intenzivně barevné pigmenty rozpustné ve vodě. Jsou zodpovědné za červené, rudé nebo modré zbarvení květů, plodů i listů. Mohou být přítomny ve vegetativních tkáních, listech, stoncích, květech, kořenech a nových výhoncích. Přirozeně se vyskytující anthocyaniny jsou zpravidla sloučeniny šesti aglykonů (anthocyanidinů) (18), což jsou hydroxyderiváty heterocyklu flavanu. (19) Ty jsou vázány na cukerný zbytek hydroxyly v poloze 3 nebo 5. Jsou hydrofilní a obecně se vyskytují v buněčných vakuolách. (18)

Několik studií naznačuje, že přiměřená konzumace anthocyaninů je spojena s nižší pravděpodobností poškození koronárních cév a se zlepšením funkcí zraku. Přínos anthocyaninů pro zdraví je většinou spojen s jejich účinky antioxidačními a anti-kancerogenními. (18)

Množství těchto látek během růstu rostliny klesá. Druh *F. esculentum*, sledovaný po dobu šesti týdnů, obsahoval v každé fázi růstu čtyři anthocyaniny (cyanidin 3-O-rutinosid, cyanidin 3-O-glukosid, cyanidin 3-O-galaktosid, cyanidin 3-O-galaktosyl-rhamnosid), zatímco *F. tataricum* obsahoval pouze cyanidin 3-O-rutinosid a cyanidin 3-O-glukosid. (8)

Katechiny

Katechiny jsou také polyfenolické látky, jde o hydrogenované flavanoly. Označují se také jako kondenzované (nebo nehydrolyzovatelné) třísloviny. (9)

Z druhů rodu *Fagopyrum* byly některé katechiny izolovány. (+)-katechin i (-)-epikatechin mohou působit jako inhibitory oxidace lipoproteinů o nízké hustotě (LDL). Dále inhibují buněčnou proliferaci a mohou tak ovlivňovat vývoj karcinomů. Epikatechin se vyskytuje jednak jako monomer, ale též ve formě polykondenzátu. (5)

Listy a květy *F. esculentum* obsahují více epikatechinu než výhonky. Nejvíce je ho v době kvetení, dále obsah klesá. (5)

V oddenku *F. dibotrys* byly prokázány kyselina gallová, (+)-katechin a (-)-epikatechin. (1)

Proteiny

Pohankové proteiny jsou vysoce biologicky hodnotné. Obsahují vhodný poměr jednotlivých aminokyselin, jsou bohaté na lysin a arginin. Jsou však poměrně těžce stravitelné. (2)

Bioaktivní proteiny jsou součástí funkčních potravin, které zpomalují progresi aterosklerózy. Důkaz o výhodách pohankových proteinů při ovlivnění kardiovaskulárních onemocněním snížením sérových hladin cholesterolu a zvýšením exkrece žlučových steroidů je zjevný z několika zvířecích modelů. (20) Ke snížení sérových lipidů dojde přerušáním inkorporace cholesterolu do micel. Tím je docíleno zhoršení rozpustnosti cholesterolu, což je mechanismus rostlinných fytosterolů a některých proteinů. (20) Pohankové proteiny vykazují aktivitu proti tumorům. U potkanů byl popsán ochranný vliv proti 1,2-dimethylbenz(α)anthracenem indukovaným karcinomům prsu. (2) Dále je popsán příznivý vliv při snižování krevního tlaku, či ovlivnění zácpy. (6)

Vitamíny

Byl popsán výskyt některých vitamínů, například E, C a některých vitamínů řady B.

Vyšší příjem vitamínu E je spojován s redukcí kardiovaskulárních onemocnění, snižuje riziko Alzheimerovy choroby a karcinomu prostaty. Zlepšuje imunitní systém, oddaluje vznik na věku závislé katarakty. (5)

Vitamín C je významný antioxidant, umožňuje biosyntézu kolagenu ve fibroblastech, podílí se na biosyntéze katecholaminů. Je také nezbytný pro absorpci železa ve střevech. (21)

Z řady B byly v pohance nalezeny vitamíny B1, B2, B3, B5, B6. Vitamín B1 (thiamin) je důležitý pro oxidační dekarboxylace, B2 (riboflavin) je součástí enzymů účastnících se přenosu elektronů v dýchacím řetězci. Nedostatek riboflavinu zpomaluje hojení ran. Niacin (vitamín B3) se uplatňuje při cévních poruchách a zánětech žil, snižuje také hladinu sérového cholesterolu. Kyselina panthotenová (B5) je součástí koenzymu A. Působí proti stresu (podněcuje vyplavování kortikoidů) a zvyšuje odolnost proti infekcím a alergiím. Pyridoxin (B6) se jako kofaktor podílí na metabolismu aminokyselin. Jeho nedostatek se projevuje záněty kůže, sliznic a poruchami CNS. (21)

Nažky *Fagopyrum esculentum* byly označeny za významný zdroj vitamínů řady B. Výhonky obsahují vitamíny B₁, B₆ a C. Z vitamínů řady E je v listech, kořenech a květech tohoto druhu nejčastější α -tokoferol. Jeho největší obsah vykazují listy. Detekované množství

stoupá během vegetace, roste s teplotou a množstvím slunečního záření. Naopak klesá s vyšším obsahem srážek. (5)

Skvalen

Skvalen je isoprenoidní sloučenina, která se hojně vyskytuje v rostlinách a vykazuje antioxidační účinky. Dále posiluje imunitní systém a snižuje riziko některých karcinomů. (5)

Obsah skvalenu ve *F. esculentum* je nejvyšší v době kvetení. Z vegetativní části rostliny ho nejvíce obsahují listy. Množství je pozitivně ovlivňováno teplotou během vegetace. (5)

2''-hydroxynikotinamin

Jedná se o derivát nikotinaminu, který inhibuje angiotensin-I konvertující enzym (ACE). Tím se tato látka podílí na antihypertenzním účinku extraktů pohanky. (6)

2''-hydroxynikotinamin byl izolován z mouky i výhonků *F. esculentum* i *F. tataricum*. (6, 8) V průběhu růstu obou druhů jeho obsah klesá. (8)

D-chiro-inositol

Inositolům je věnována pozornost pro jejich schopnost posilovat účinky insulinu. Mají význam jako podpůrná léčiva při poruchách insulinové rezistence, jako je diabetes mellitus typu II. nebo polycystický ovariální syndrom. D-chiro-inositol je epimer myoinositolu, který je koenzymem proteinu účastnícího se drah insulinové signalizace. Napodobuje tak transport glukózy, takže D-chiro-inositol by mohl být insulinovým mediátorem, který by se podílel na zvýšení aktivity insulinu a snížení krevního tlaku, triglyceridů v plazmě a koncentrace glukózy.

D-chiro-inositol existuje také ve formě svých galaktosidů, tzv. fagopyritolů. V pohance jich bylo detekováno pět. (7)

GABA (kyselina aminomáselná)

Kyselina aminomáselná je významný inhibiční neurotransmiter. (21) Snižuje také vysoký krevní tlak. (8)

Je obsažena v semenech a výhoncích *F. esculentum* i *F. tataricum*. Její množství v listech obou druhů se zvyšuje během růstu rostliny. Po šesti týdnech růstu je koncentrace vyšší u *F. tataricum*. (8)

Fagopyrin

Je to fototoxický derivát hypericinu. Detekované množství je vyšší v čerstvých rostlinách, v sušených byly nalezeny pouze stopy. (5)

F. esculentum dále obsahuje některé fytosteroly. Například β -sitosterol, kampestrol a stopy stigmasterolu. Dále řadu galaktosylových cyklitolů včetně fagopyritolů (A1, A2, A3, B1, B2, B3) a thiamin-vážíci protein. (17)

Během kultivace bylo prokázáno, že *F. esculentum* obsahuje více proteinů, popela a lipidů než *F. tataricum*. Obsah vlákniny se výrazně neliší. Nažky *F. esculentum* obsahují více potravní vlákniny a méně popela než *F. tataricum*, zatímco otruby *F. tataricum* obsahují více proteinů než otruby *F. esculentum*. (22)

Oba druhy se liší také obsahem lipidů. Semena *F. esculentum* obsahují převážně nenasycené mastné kyseliny, zatímco ve *F. tataricum* převažují kyseliny nasycené. V obou druzích jsou lipidické sloučeniny obsaženy více v otrubách než v mouce. (15)

Rozložení obsahových látek se liší v jednotlivých druzích, ale i částech rostliny. Vliv na obsah mají též vlastnosti prostředí. (3) Spektrum a množství obsahových látek získaných z jednotlivých rostlin se liší také v závislosti na podmínkách extrakce. (23) Například celkový obsah fenolických látek *F. esculentum* se liší při použití různých rozpouštědel. Klesá pak v pořadí: aceton > methanol = ethanol > butanol = ethylacetát. (10)

3.1.6 Použití jednotlivých druhů rodu *Fagopyrum*

Pohanka je celosvětově uznávaná jako výhodný zdroj nutričně hodnotných proteinů, lipidů, vlákniny a minerálů. Díky kombinaci s ostatními obsahovými látkami, jako jsou flavonoidy, fagopyrin nebo steroly je pohanka věnována zvýšená pozornost jako výhodné funkční potraviny. (3) Nutričně hodnotné loupané nažky jsou použitelné i v bezlepkové dietě. (5) Může být také použita jako probiotická potravina, neboť na zvířecích modelech bylo prokázáno, že zvyšuje obsah mléčných bakterií ve střevě. (14) Ve střední a východní Evropě se nažky zbavují slupek spařením vodní párou. Vzniklé pražené kroupy jsou připravené k vaření. (17) Listy a klíčky jsou používány jako salátová zelenina, případně tepelně opracované podobně jako špenát. (5) Pohanka je stále považována za hlavní potravní zdroj rutinu. (3)

Kromě využití coby potravina je pohanka používána na přípravu nálevů a extraktů.

Jako zdroj rutinu je pohanka účinná při redukci kapilární fragility. (3) Nálev z nati působí proti vysokému krevnímu tlaku. (5) Extrakt z nati byl úspěšně používán proti otokům dolních končetin, při chronické žilní nedostatečnosti. Může také chránit proti diabetické retinopatii. (5)

Příjmem extraktu naklíčených semen roste koncentrace sérového HDL-cholesterolu. Zároveň se snižuje hladina triglyceridů v játrech a celkový cholesterol. (16)

Pohankové proteiny vykazovaly na zvířecích modelech pozitivní vliv proti tvorbě žlučových kamenů. Jsou také spojovány se zpomalením vývoje karcinomu prsu snížením sérového estradiolu a karcinomu tlustého střeva redukcí buněčné proliferace. (15)

Oddenky *F. dibostrys* byly používány v tradiční čínské medicíně při léčbě plicních onemocnění, dysenteriiích a revmatismu. (1)

Pro svůj antioxidační účinek by se mohl extrakt z pohanky používat v potravinářství místo syntetických antioxidantů. Je považován za zdravotně nezávadný a mohl by proto být používán ve vyšších koncentracích, než je povoleno pro antioxidanty syntetické. (10)

3.2 Volné radikály

3.2.1 Pojem volného radikálu

Volné radikály jsou látky, které mají ve svém elektronovém obalu nepárový elektron, případně více nepárových elektronů a jsou schopné samostatné existence. Vznikají z normální částice ztrátou či přijetím elektronu. Další možnost, tj. homolytické štěpení na dvě částice, z nichž každá má jeden elektron, vyžaduje příliš mnoho energie, a proto v biologických systémech prakticky nepřichází v úvahu. Stabilní konfigurace vyžaduje párové seskupení elektronů, a proto se volné radikály snaží chybějící elektron doplnit. Jsou proto většinou málo stabilní a vysoce reaktivní. (11)

3.2.2 Vznik volných radikálů

Volné radikály se do organismu dostávají zvenčí, velká část však vzniká i v průběhu metabolismu. Podle toho se příčiny vzniku dělí na exogenní a endogenní.

Mezi exogenní příčiny patří například ionizující záření (γ paprsky, X paprsky), vysoký obsah škodlivin ve vzduchu, kouření, intoxikace (polychlorované bifenyly, tetrachlormetan, chloroform, alkohol – volné radikály vznikají při metabolismu těchto látek), potrava (volné radikály v ní vznikají při tepelné úpravě, drcení, vlivem světla atd.)

K endogenním příčinám patří vznik kyseliny močové (v reakci katalyzované xantinoxidasou; např. při úrazech, nekrózách, pooperačních stavech), rozpad fagocytů a makrofágů (záněty, popáleniny, septický stav), vznik methemoglobinu, syntéza prostaglandinů, zvýšený metabolismus estrogenů, autooxidace thiolů, hyperglykémie, reperfuze po předchozí ischemii včetně svalového výkonu na kyslíkový dluh. (11)

3.2.3 Typy volných radikálů

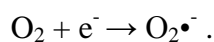
V organismu běžně vznikají reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species - ROS) a dusíku (reactive nitrogen species - RNS). Tyto látky mají značný fyziologický i patogenetický význam.

Reaktivní formy kyslíku a dusíku

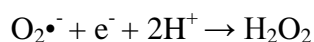
Reaktivní formy kyslíku	
Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
Superoxid, O ₂ •	Kyselina chlorná, HOCl
Hydroxylový radikál, HO•	Ozon, O ₃
Peroxy, ROO•	Singletový kyslík, ¹ O ₂
Alkoxy, RO•	Peroxid vodíku, H ₂ O ₂
Hydroperoxy, HO ₂ •	
Reaktivní formy dusíku	
Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
Oxid dusnatý, NO•	Nitrosyl, NO+
Oxid dusičitý, NO ₂ •	Nitroxid, NO
	Kyselina dusitá, HNO ₂
	Oxid dusitý, N ₂ O ₃
	Oxid dusičitý, N ₂ O ₄
	Nitronium, NO ²⁺
	Peroxyinitrit, ONOO
	Alkylperoxyinitrit, ROONO

3.2.3.1 *Reaktivní formy kyslíku*

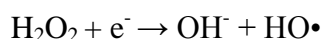
Přijetím jednoho elektronu se molekula kyslíku redukuje na monoradikál superoxid:



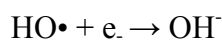
Další elektron redukuje superoxid na peroxid vodíku:



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



Poslední elektron redukuje hydroxylový radikál na další molekulu vody



Popsaná redukce molekuly kyslíku probíhá v dýchacím řetězci mitochondrií, v aktivním centru cytochromoxidasy a umožňuje transformaci energie do adenosin trifosfátu. Ani neaktivnější forma kyslíku (hydroxylový radikál) není ve vazbě s enzymem škodlivá. Volná látka se však ve tkáni okamžitě slučuje s téměř jakoukoli sousední molekulou nebo z ní vytrhne elektron a aktivuje ji.

Z patobiochemického hlediska stojí za pozornost též další reakce, při níž tripletový kyslík získává energii (např. ze záření nebo z chemické reakce), která vyzdvihla nepárové elektrony do jiné orbitalové pozice, popřípadě změnila jeho spin. Je pak označován jako singletový kyslík a je velmi reaktivní. Rychle se slučuje například s nenasycenými mastnými kyselinami na lipidové peroxidy. V lidském těle singletový kyslík vzniká po absorpci světla některými pigmenty (fotosenzitizace kůže prostřednictvím porfyrinů) nebo při spontánní neenzymové dizmutaci superoxidu.

Superoxid

Má oxidační i redukční vlastnosti. Podléhá dizmutaci, při které jedna jeho molekula poskytuje elektron druhé. Produkty reakce jsou kyslík a peroxid vodíku:



Peroxid vodíku

Peroxid vodíku se účastní vzniku volných radikálů. Reakce samotného peroxidu s biomolekulami jsou poměrně pomalé, avšak v přítomnosti tranzitních kovů (dvojmocné železo Fe^{2+} , jednomocná měď Cu^+) se peroxid rychle redukuje:



Reakce je známa jako Fentonova. Vzniká vysoce toxický hydroxylový radikál $\text{HO}\cdot$, který v organismu okamžitě reaguje s okolními biomolekulami. Jde o extrémně silné oxidační činidlo, vytrhující elektron z nenasycených mastných kyselin, atakující a hydroxylojící aminokyseliny a báze nukleových kyselin. Po Fentonově reakci pak další superoxid redukuje trojmocné železo zpět na dvojmocné, takže je regenerováno pro další katalýzu.

Přechodné kovy se významně účastní vzniku reaktivních forem kyslíku, jen pokud nejsou vázány v depozitních formách, jako je železo ve feritinu a v transferinu a měď v ceruloplazminu. Bezpečné uložení a tím „inaktivace“ tranzitních kovů jsou nezbytné

k tomu, aby byl čas odstranit superoxid z tkáně superoxid-dismutase a peroxid vodíku katalasou. Oba enzymy jsou součástí antioxidačního ochranného systému organismu.

Kyselina chlorná

Tuto kyselinu syntetizují neutrofilní granulocyty a používají ji spolu s dalšími ROS a RNS jako baktericidní prostředek.

3.2.3.2 Reaktivní formy dusíku

Oxid dusnatý

Ve vysoké koncentraci reaguje oxid dusnatý rychle s kyslíkem na oxid dusičitý a po-té na dusitan.

I v nízké fyziologické koncentraci má oxid dusnatý biologický poločas jen několik sekund. Příčinou je jeho rychlé vychytávání v erythrocytech. Reaguje se železem oxyhemoglobinu. Vzniká methemoglobin a nitrát a jde o jeden z nejúčinnějších způsobů inaktivace oxidu dusnatého a o jednu z podmínek jeho regulační funkce in vivo.

Stejně pohotově se váže na hemové železo guanylátcyklasy, což je podstata stimulace syntézy c-AMP, vedoucí k relaxaci hladkého svalstva cév a mechanismu dalších regulací.

In vivo, v přítomnosti akceptorů elektronu, se oxid dusnatý snadno slučuje s fenoly (tyrozinem), thioly (cysteinem, GSH, albuminem) a se sekundárními aminy. Glutathion se snadno metabolizuje na radikál a ten s oxidem dusnatým dává nitrosothiol.

Reakcí se sulfhydrylovými skupinami cysteinu, glutathionu, albuminu a dalších látek tak oxid dusnatý tvoří o něco stářejší nitrosothioly. Tyto látky jsou zřejmě transportní formou oxidu dusnatého. Mohou totiž předávat nitrosyl jiným molekulám a tak sloužit jako přenašeče biologicky aktivního oxidu dusnatého.

Peroxyinitrit

Patologicky nejvýznamnější je reakce oxidu dusnatého se superoxidem, kdy vzniká toxický peroxynitrit. Fyziologické podmínky nejsou pro vznik peroxynitritu výhodné, avšak při intenzivní syntéze oxidu dusnatého a superoxidu (např. aktivovanými polymorfonukleáry) může koncentrace peroxynitritu dosáhnout významné mikromolární hladiny. Peroxynitrit je in vivo odpovědný za nitraci a hydroxylaci tyrozinu (spíše než oxid dusnatý). Přechodné kovy včetně kovů aktivních center superoxididizmutasy a myeloperoxidasy katalyzují jeho heterolytické štěpení na hydroxidový aniont a nitroniový kationt, kterému je připisována schopnost napadnout fenolové sloučeniny a in vivo v proteinech měnit např. tyrozin na 3-nitrotyrozin. (12)

Obecně vzato, 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. (12)

3.2.4 Poškození biomolekul volnými radikály

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

Snad nejvíce je prostudován proces poškození lipidů, resp. mastných kyselin volnými radikály – lipoperoxidace. Postiženy jsou obvykle polyenové mastné kyseliny. Naproti tomu nasycené či monoenové kyseliny jsou vůči oxidačnímu poškození poměrně rezistentní.

Po adici kyslíku vzniká peroxylový radikál, dále mohou vznikat lipidové hydroperoxydy. Ty se cyklizují a může dojít k rozštěpení řetězce a uvolnění alkanů a reaktivních aldehydů, zejména malondialdehydu. Lipoperoxidaci zastavují lipofilní „chain-breaking“ antioxidanty, zejména vitamin E a koenzym Q10, které jsou schopny vázat lipidové peroxyradikály.

Volné radikály mohou poškozovat i DNA. Projeví se to zlomy chromosomů, kancerogenním a mutagenním účinkem. Oxidace postihuje rovněž dusíkaté báze, nejčastěji guanin: vzniká tak 8-hydroxyguanin.

Primární oxidační modifikace proteinů působením volných radikálů zahrnuje podobné změny jako v případě lipidů: vznikají peroxylové radikály, hydroperoxydy, v konečné fázi se mohou tvořit reaktivní aldehydy i z bílkovin a uvolňovat další radikály. Hydroxylový radikál i radikál oxidu dusnatého inaktivují enzymy Krebsova cyklu. Superoxidový radikál s radikálem oxidu dusnatého tvoří velmi reaktivní peroxynitrit, který nitruje aromatické jádro tyrosinu.

Bílkoviny však mohou být poškozeny i sekundárně, a to vazbou aldehydů (zejména malonyldialdehydu) vznikajících při lipoperoxidaci. Tyto aldehydy se váží na volné aminokyseliny. To vede k tvorbě příčných vazeb a změně vlastností proteinů. (11)

Modifikace aminokyselin vedou ke vzniku nových antigenních determinant a k autoimunitním reakcím. (12)

3.2.5 Nemoci a stavy způsobené volnými radikály

Volné radikály se podílí na celé řadě patologických procesů. Jde například o aterosklerózu, na jejímž počátku je oxidace lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) volnými radikály. Dále o diabetes mellitus. Volné radikály se uplatňují při jeho vzniku i při rozvoji pozdních komplikací.

Velké množství volných radikálů vzniká v okamžiku reperfuze dočasně ischemického orgánu. Patří sem např. infarkt myokardu s rekanalizační léčbou. Volné radikály a další ROS vznikající v okamžiku reperfuze mohou vyvolat závažnou arytmií. Stejně tak poškozují ischemickou končetinu po odstranění embolu z postižené tepny a zhoršují činnost transplantovaného orgánu.

Volné radikály mohou svým působením na DNA vyvolat maligní přeměnu buňky a tím vznik zhoubných novotvarů. Radikály se však uplatňují i při destrukci nádorů.

Dále ovlivňují např. zánětlivé stavy, selhání ledvin a jiné. (11)

Volné radikály také ovlivňují stárnutí organismu. Byly popsány tři typy oxidačních změn závislých na věku: hromadění konečných produktů oxidačního stresu, modifikace biologických struktur a vyčerpání složek antioxidační ochrany. (12)

3.2.6 Příznivé účinky volných radikálů

Vedle škodlivého působení na organismus však vykazují volné radikály i řadu příznivých účinků.

Například v membráně fagocytů se nachází enzym NADPH-oxidasa, která katalyzuje vznik superoxidového radikálu. Ten je pak přeměňován na účinnější ROS. Největší význam má kyselina chlorná, která se využívá k zabíjení fagocytovaných mikroorganismů.

Volné radikály se tvoří i v dýchacím řetězci na úrovni cytochromoxidasy. Monooxygenasy využívají hydroxylový radikál k hydrolyzačním reakcím např. při biosyntéze cholesterolu a žlučových kyselin nebo při detoxikaci některých xenobiotik. Peroxid vodíku je nezbytný pro oxidaci jodidu na elementární jód, který je štítnou žlázou využit k jodaci tyroninu. Spermie vyžaduje k úspěšnému oplodnění vajíčka superoxid a peroxid vodíku. Příznivý účinek má také oxid dusnatý, který vzniká např. v endoteliálních buňkách a má výrazný vazodilatační efekt. Dále má význam v regulaci imunitních pochodů i jako neurotransmitter. Rovněž jiné volné radikály působí jako signální molekuly. (11)

3.2.7 Rovnováha mezi volnými radikály a antioxidanty

Za normálních okolností existuje mezi produkcí volných radikálů a antioxidanty rovnováha. Převaha jedné i druhé složky vede k poruchám, které mohou organismus vážně ohrozit. Převaha volných radikálů se označuje jako oxidační stres. Může vést k rozvoji řady nemocí.

I převaha antioxidantů, je-li výrazná, může mít nepříznivé následky. Blokuje totiž ty účinky volných radikálů, které jsou příznivé a pro organismus nezbytné. (11)

3.3 Antioxidanty – ochrana před volnými radikály

Organismus používá tři možných typů ochrany před vysoce reaktivním prvkem:

Nejbezpečnějším způsobem je bránit se tvorbě nadměrného množství reaktivních forem kyslíku nebo dusíku např. regulací aktivity enzymů, které je tvoří (indukovatelná syntéza oxidu dusnatého), nebo vychytáváním tranzitních prvků z reaktivních pozic. Takto působí transportní bílkoviny i bílkoviny pro uložení zásob kovů (transferin, feritin), dále haptoglobin a hemopexin vazbou hemového železa, nebo ceruloplazmin oxidující Fe^{2+} na Fe^{3+} , které se při tvorbě volných radikálů Fentonovou reakcí neuplatňuje.

Další možností je odstranění peroxidu vodíku katalasou či peroxidasami, což brání jeho další přeměně na hydroxylový radikál za katalytického působení přechodných kovů. (11, 12)

Druhou možností je záchyt a odstranění radikálů, které se již vytvořily. Tyto látky bývají označovány jako vychytávače či zametače (scavengers), lapače (traps) a zhášedce (quenchers). Dále je možné dělit antioxidanty na enzymy a na látky dávající s reaktivními formami kyslíku a dusíku stálejší a tudíž méně toxické produkty.

Na antioxidační ochraně se podílejí též obecné reparační mechanismy poškozených biomolekul. Fosfolipasy odstraňují poškozené mastné kyseliny z fosfolipidů, oxidačně modifikované proteiny se rozkládají proteolyticky, zvláštní reparační enzymy opravují poškozenou DNA a glutathionperoxidasa štěpí nejen peroxid vodíku, ale i lipidové hydroperoxydy, a brání tak vzniku reaktivních aldehydů a poškození molekul vazbou těchto aldehydů. (11, 12)

Některé látky působí proti volným radikálům několika popsány mechanismy současně.

3.3.1 Příklady jednotlivých antioxidantů

3.3.1.1 Antioxidační enzymy

Při vzniku a vzájemných přeměnách reaktivních forem kyslíku se významně uplatňují enzymy. Některé jsou tvorbou volných radikálů nezbytné pro správnou funkci organismu. Jiné dávají vzniknout volným radikálům, které se mohou uplatnit při poškození buněk a tkání. Velkou skupinu tvoří enzymy, které představují základ intracelulární antioxidační ochrany.

Superoxiddismutasa

Superoxid sám není příliš reaktivní. Spontánně se tzv. dizmutací přeměňuje na peroxid vodíku. Nebezpečí superoxidu tkví v tom, že z něj mohou vznikat další, mnohem škodlivější reaktivní formy kyslíku (peroxid vodíku, hydroxylový radikál, peroxyinitrit, kyselina chlorná). Superoxiddismutasa urychluje dizmutaci superoxidu o čtyři řády. Vzniklý peroxid vodíku je účinně odstraňován navazujícími reakcemi katalyzovanými katalasou a peroxidasami.

Rozeznávají se tři druhy SOD:

Mn^{2+} SOD a Fe^{2+} SOD – vyskytuje se ve všech prokaryotech, prokaryotických řasách a protozoích

Cu^{2+}/Zn^{2+} SOD – vyskytuje se v buňkách vyšších eukaryot

Glutathionperoxidasa

Katalyzuje redukci peroxidu vodíku a současnou oxidaci glutathionu. Aby tento enzym mohl plynule zajišťovat likvidaci peroxidu vodíku, je třeba regenerovat glutathion v redukované formě. K tomu slouží enzym glutathionreduktasa.

Dvě formy enzymu se nachází v cytoplazmě buněk a v krevní plazmě (extracelulární tekutina), třetí forma je vázána v buněčné membráně, kde přímo redukuje také lipidové hydroperoxydy, které přeměňuje na příslušné hydroxylové deriváty lipidů bez uvolnění mastných kyselin z lipidů. (11, 12)

Glutathiontransferasy

Jsou cytosolové enzymy katalyzující konjugační reakci, při které je sulfhydrylová skupina redukovaného glutathionu navázána na elektrofilní organickou látku. Takto jsou detoxikována některá xenobiotika. Jsou významnou ochranou před následky peroxidace lipidů. (12)

Katalasa

Katalyzuje dvouelektronovou dismutaci peroxidu na dioxygen a vodu. (12)

3.3.1.2 Vysokomolekulární endogenní antioxidanty

Řada proteinů je schopna vázat přechodné prvky (Fe, Cu) a měnit jejich oxidoredukční vlastnosti tak, že tyto prvky přestanou katalyzovat radikálové reakce. Protože Fentonovy reakce se kovy mohou účastnit jen tehdy, jsou-li volné a v redukované formě, je ochranou před jejich působením jejich vazba v pevném chelátu (např. na transportní či skladovací protein) a oxidace přechodného kovu na vyšší valenci.

Tak je železo při transportu pevně vázáno na transferin, ve sliznici střevní a v kostní dřeni je vázáno v molekule feritinu, v leukocytech v bílkovině laktoferinu. Ve všech těchto proteinech je navíc v trojmocné formě. Dále oxidaci železa v krvi zajišťuje ceruloplazmin. Měď je také vázána na proteiny – ceruloplazmin, albumin, transkuprein.

Další roli hrají také chaperony. Oxidační stres indukuje syntézu těchto proteinů, které rozpoznají oxidací poškozené proteiny, vážou je na sebe a urychlí jejich odstranění v proteosomech. Mohou též pomoci při opravách konformace proteinů. (11, 12)

3.3.1.3 Nízkomolekulární antioxidanty

Askorbát (vitamin C)

Askorbát je nutný jako kofaktor enzymů při syntéze kolagenu a při přeměně dopaminu na noradrenalin. Dále je důležitým redukčním činidlem. Redukuje Fe^{3+} na Fe^{2+} a Cu^{2+} na Cu^{1+} . Umožňuje tak vstřebávání železa ze střeva a využití přechodných prvků v aktivním centru hydroxylas.

Antioxidační účinek askorbátu spočívá v tom, že redukuje anorganické i organické radikály, jako $\text{O}_2^{\bullet-}$, HO_2^{\bullet} , HO^{\bullet} , hydrofilní RO_2^{\bullet} , NO_2^{\bullet} , a reaguje s $^1\text{O}_2$ a HClO . Askorbát také regeneruje tokoferolový radikál. Při těchto reakcích ztratí elektron a změní se na semidehydroaskorbát (askorbylový radikál), který je mnohem méně reaktivní než vyjmenované radikály. Regeneruje se dehydrogenasou zpět na askorbát nebo dizmutuje na askorbát a dehydroaskorbát. Dehydroaskorbátreduktasa za účasti GSH regeneruje dehydroaskorbát na askorbát. Avšak GSH je intracelulární antioxidant, a tak se při oxidačním stresu askorbylové radikály mohou hromadit v extracelulární tekutině a ničit zde biomolekuly.

Také intracelulární ochranné reakce askorbátu se mohou obrátit proti organismu, jestliže se železo a měď ve zvýšené míře přesunou z bezpečných vazeb transportních a skladovacích struktur do komplexů, které jsou oxidoredukčně aktivní. Pak askorbát může redukovat měď a železo na formy katalyzující Fentonovu reakci a stimulovat oxidační poškození tkáně. (12) Tak bylo například prokázáno, že kombinovaná suplementace vitamínu C a železa působí oxidační poškození DNA a podporuje lipoperoxidaci. (11)

Alfa-tokoferol a vitamin E

Vitamin E je skupina osmi izomerů, z nichž biologicky nejúčinnější je α -tokoferol. Je antioxidační látkou membrán, protože jeho izoprenová struktura je lipofilní. Při peroxidaci lipidů přeměňuje alkylperoxylové radikály LOO^{\bullet} na hydroperoxydy, které následně rozloží glutathionperoxidasa. Zneškodní tak peroxylové radikály mastných kyselin dříve, než mohou atakovat sousední nepoškozené lipidy. Tokoferol se přitom mění na tokoferolový radikál, který je stabilnější než látky, s nimiž tokoferol reaguje.

Askorbát alespoň z části tokoferolový radikál redukuje zpět na tokoferol. Popsaný antioxidační cyklus tokoferolu tlumí propagaci radikálových reakcí v lipidech membrán a lipoproteinů (LDL, VLDL, HDL). (12)

Ubichinon/ubichinol (koenzym Q)

Koenzym Q je přenašeč elektronů v dýchacím řetězci v mitochondriích. Vyskytuje se však ve všech membránách, kde tlumí radikálové reakce ve spolupráci s tokoferolem. Zřejmě jako ubichinol pomáhá při regeneraci vitamínu E z tokoferolových radikálů. (11, 12)

Karotenoidy, β -karoten a vitamin A

Karotenoidy jsou izoprenové sloučeniny. Z některých karotenoidů vznikají vitamíny A1 – retinol a A2 – dehydroretinol. β -karoten velice účinně zhasí singletový kyslík a je schopen likvidovat volné radikály, mj. alkylperoxylové. Ještě účinnějším karotenoidem je lykopen, obsažený především v rajčatech, zatímco antioxidační schopnosti vitamínu A jsou zanedbatelné. (11, 12)

Thioly a disulfidy

Do ochrany proti radikálovým reakcím významnou měrou zasahují thioly (redukovaný glutathion – GSH), disulfidy (oxidovaný glutathion – GSSG) a další sirné sloučeniny (lipoamid, taurin, homocystein).

Glutathion je v poměrně vysoké koncentraci ve všech savčích buňkách. Je jedním z nejvýznamnějších redoxních pufrů buňky. Jeho posláním je odstraňovat ROS, udržovat v redukované formě sulfhydrylové skupiny proteinů, cysteinu, koenzymu A a regenerovat tokoferol a askorbát. Jedním z příznaků oxidačního stresu tkáně je pokles hladiny redukovaného GSH v buňkách. (12)

Melatonin

Melatonin je hormon produkovaný hlavně v epifýze, ale i v retině i jiných tkáních. Působí jako scavenger nitroxidového, peroxylového a hydroxylového radikálu, blokuje účinek

singletového kyslíku a chrání před lipoperoxidací, je scavengerem kyseliny chlorné. Vazba melatoninu na buněčné jádro chrání DNA před oxidačním poškozením. (11)

Kyselina močová (urát)

Je konečným produktem odbourávání purinů. Antioxidační schopnosti spočívají ve vylučování $RO\cdot$ a $HClO$ a ve vazbě železa a mědi do formy, která nepodporuje radikálové reakce. Po reakci s $HO\cdot$ a s perferoxylovými radikály (komplexy železa s aktivním kyslíkem) se urát mění v radikály, které mohou biologicky škodit. (12)

Bilirubin

Jde o degradační metabolit hemu. Antioxidační význam má jak volný, tak vázaný na albumin a jiné proteiny. Obě formy pigmentu inhibují peroxidaci lipidů. Bilirubin vázaný na albumin se mění na biliverdin, který je rozpustný ve vodě. Bilirubin tak přenáší radikálovou reakci z LDL do vodné fáze. Zháší též singletový kyslík. (12)

Polyfenolické antioxidanty

Kromě různých kyselin (skořicová, kávová, ferulová, aj.) připadá hlavní podíl mezi polyfenolickými látkami na flavonoidy, resp. jejich deriváty volně se vyskytující v přírodě – bioflavonoidy. Jsou to látky odvozené od heterocyklu flavanu.

Antioxidační účinek bioflavonoidů závisí na jejich struktuře – poloze hydroxylových skupin a dvojných vazeb heterocyklického jádra. (11) Hlavními prvky ve stavbě flavonoidů ovlivňující antioxidační působení jsou hydroxylová skupina na C3 kruhu C, dvojná vazba mezi C2 a C3 kruhu C a karbonylová skupina na C4 kruhu C. K aktivitě dále přispívají hydroxyly na C5 a C7 kruhu A a na C3' a C4' kruhu B. Kvercetin i rutin, flavonoidy, které jsou v pohance nejvíce zastoupené, vykazují všechny tyto strukturální znaky. Avšak cukerná složka rutinu sterickým bráněním redukuje antioxidační aktivitu sousedního hydroxyly. (3) Ke snížení aktivity může dojít např. i substitucí hydroxyly na C3 – např. methoxylací. (1)

S volnými radikály reagují flavonoidy za tvorby dostatečně stabilních fenolických radikálů. Přestože většina z nich má hydrofilní charakter, jsou schopny procházet buněčnými membránami a uplatňují se snad i v antioxidační ochraně nervové tkáně.

Antioxidační účinek je dán například:

- schopností přímo vázat peroxylové, hydroxylové a superoxidové radikály i peroxid vodíku.

- schopností podílet se na regeneraci vitaminů E a C.

- vazbou přechodných kovů v pevné cheláty.

- inhibicí enzymů, katalyzujících vznik volných radikálů. (11)

3.4 Antioxidační aktivita rodu *Fagopyrum*

Metody k určení antioxidační aktivity bývají obecně založeny na inhibici určitých reakcí v přítomnosti antioxidantu. Antioxidanty reagují s volnými radikály nebo peroxidy.

Metodou lipidové peroxidace byly zkoumány extrakty semen tří druhů rodu *Fagopyrum*. Antioxidační aktivita pak klesala v pořadí *F. tataricum* > *F. homotropicum* > *F. esculentum*. (3)

Metodou zhášení superoxidu byla stanovována antioxidační aktivita výhonků *F. tataricum* (22, 24) i *F. esculentum* (22). Výsledná aktivita byla nižší než aktivita kyseliny askorbové, použité jako standard. (22, 24)

Porovnáním aktivit extraktů výhonků metodou zhášení DPPH byla u *F. tataricum* stanovena vyšší účinnost než u extraktů *F. esculentum*. Stejných výsledků bylo dosaženo i použitím superoxidu. (22)

Metodou zhášení DPPH byla stanovena také antioxidační aktivita jednotlivých složek extraktu oddenku *F. dibotrys*. Antioxidační aktivita přítomných flavonoidů, kvercetin a jeho derivátů, klesala v pořadí: kvercetin > 3,5-dimethylkvercetin > 3-methylkvercetin > 3-methylgossypetin 8-O- β -D-glukopyranosid > rutin. Stejným způsobem byla ohodnocena aktivita hlavních obsahových látek *F. dibotrys*, derivátů flavan-3-olů. Antioxidační aktivita těchto látek byla vyšší než aktivita kyseliny askorbové, která byla používána jako kontrola. Do této skupiny se řadí i 3,3'-di-O-galloyl-procyanidin B-2 a 3'-O-galloyl-procyanidin B-2, které vykazovaly mezi látkami obsaženými v extraktu nejvyšší aktivity. (1)

Metodou zhášení DPPH byly také porovnány extrakty *F. esculentum* s různými rozpouštědly. V koncentraci 0,1 mg/ml klesala aktivita v pořadí rozpouštědel: aceton > ethanol = methanol > butanol = ethylacetát. (10)

Protože vysoké teploty při případném zpracování pohanky jako potraviny mohou způsobovat chemické změny, byla metoda DPPH použita pro stanovení antioxidační aktivity pohankové mouky po vystavení vysoké teplotě (200°C po 10 minut). Vlivem vysoké teploty dochází k destrukci flavonoidů, antioxidační aktivita klesá. (14)

Výsledky tepelného zpracování byly zkoumány také metodou zhášení ABTS^{•+} (diamonné soli kyseliny 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové) (vyjádřeno jako TEAC – Trolox equivalent antioxidant capacity). Roztok ABTS^{•+} byl inkubován s extraktem pohanky a následně se měřila absorbance. Jako standard antioxidantu se používal roztok troloxu.

Antioxidační aktivita celých tepelně opracovaných nažek byla o 70% nižší než aktivita nepražených nažek. Nejnižší aktivita byla zjištěna u pražených krup. Aktivita opražených slupek byla vyšší než aktivita celých pražených nažek. Z pozorování vyplývá, že většina antioxidačně působících látek je obsažena ve slupkách a pouze malé množství se nachází v kroupách. Stejných výsledků bylo dosaženo i meto-dou zhášení DPPH. (17)

Podmínky zpracovávání potravin musí být proto takové, aby co nejméně ovlivnily vlastnosti suroviny. (14)

Antioxidační aktivita se liší i mezi jednotlivými částmi rostliny. U *Fagopyrum esculentum* klesá aktivita v pořadí: listy › loupané nažky › nažky › slupky › stonky. (5)

Z výsledků porovnání extraktů *F. esculentum* metodou zhášení DPPH vyplývá, že existuje výrazná korelace mezi antioxidační aktivitou a obsahem fenolických látek, resp. obsahem rutinu. (3, 10) Avšak při použití jiných metod nebyl potvrzen žádný vztah mezi obsahem fenolů a antioxidačními účinky. (10) Tento vztah je nejednoznačný z několika důvodů:

A) Celkové fenoly nezahrnují všechny antioxidanty, jako je např. kyselina askorbová, karotenoid a tokoferol.

B) Antioxidační účinek je dán synergismem antioxidantů, nezávisí pouze na koncentraci, ale také na struktuře a interakcích mezi sloučeninami.

C) Rozdílné metody stanovení antioxidační aktivity různými mechanismy mohou vést k různým výsledkům. (10)

3.5 Metody použité ke stanovení antioxidační aktivity – teoretický základ

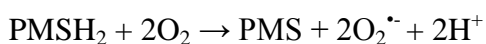
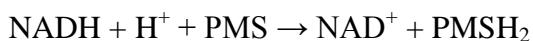
3.5.1 Zhášení DPPH

Antioxidačně působící látky reagují s methanolovým roztokem stabilního radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH•). Redukce DPPH• je doprovázena poklesem absorbance při charakteristické vlnové délce. Ve formě radikálu absorbuje DPPH• při 515 nm, ale po redukci antioxidantem absorpce mizí. Reakce radikálu s antioxidantem probíhá podle schématu:



3.5.2 Zhášení superoxidu generovaného neenzymaticky

Superoxidový radikál je generován systémem NADH/PMS (β-nikotinamidadenin dinukleotid/ 5-methylfenazinium-methylsulfát). PMS je redukován pomocí NADH a superoxidový radikál vzniká reakcí s kyslíkem:



Superoxid redukuje NBT (nitrotetrazolinovou modř) na modrý formazan, který vykazuje maximální absorbanci při 560 nm.

Reakce probíhá při pH 7,4.

Molekula, která je schopná zhášet superoxid způsobí pokles rychlosti redukce NBT. (26)

4 Experimentální část

4.1 Použitý materiál a přístrojové vybavení

4.1.1 Rostlinný materiál

Sušená nať *Fagopyrum esculentum* – prášková droga.

4.1.2 Použité chemikálie

Stanovení flavonoidů

Methenamin R (5 g/l)

Aceton R

Kyselina chlorovodíková RS

Voda R

Ethyl-acetát R

Síran sodný bezvodý R

Chlorid hlinitý RS

Kyselina octová ledová R 5% (V/V)

Methanol R

Stanovení antioxidační aktivity

Destilovaná voda

β -nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) (Sigma (St.Louis, MO, USA))

Nitrotetrazolinová modř (NBT) (Sigma (St. Louis, MO, USA))

5-methylfenazinium-methylsulfát (PMS) (St. Louis, MO, USA))

KH_2PO_4

KOH

L(+)-askorbová kyselina p.a. (Sigma)

6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina, 97% (trolox) (Sigma)

Rutin (Roth)

2,2-diphenyl-1-picryl-hydrosyl (DPPH) (Sigma (St.Louis, MO, USA))

Methanol

4.1.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy Kern

Ultrazvuková lázeň Bendelin Sonorex

Mikrodávkoč BIOHIT

Dvoupaprskový spektrofotometr Shimadzu

Lyofilizátor MLW-LGA O5, Medizintechnik Leipzig, GDR

Třepačka LT2, Fisher Scientific

Blokový termostat Stuart, Fisher Scientific

4.2 Stanovení obsahu flavonoidů dle ČL 2005

Zkouška byla provedena dle článku *Betulae folium*, zkouška Stanovení obsahu.

Základní roztok. 0,200 g práškové drogy se ve 100 ml baňce smíchalo s 1 ml roztoku methenaminu R (5 g/l), 20 ml acetonu R a 2 ml kyseliny chlorovodíkové RS a vařilo se 30 min pod zpětným chladičem. Směs se zfiltrovala přes chomáček vaty do 100 ml odměrné baňky. Droga i chomáček vaty se vařily 10 min ještě dvakrát s 20 ml acetonu R pod zpětným chladičem. Po ochlazení se směs zfiltrovala filtračním papírem do téže odměrné baňky. Roztok v odměrné baňce se zředil acetonem R předem použitým k promytí baňky a filtru na 100,0 ml. 20,0 ml roztoku se převedlo do dělicí nálevky, přidalo se 20 ml vody R a protřepávalo se nejprve 15 ml a pak třikrát 10 ml ethyl-acetátu R. Spojené horní vrstvy se protřepávaly dvakrát 50 ml vody R a zfiltrovaly se přes 10 g síranu sodného bezvodého R do 50 ml odměrné baňky. Roztok v baňce se zředil ethyl-acetátem R na 50,0 ml.

Zkoušený roztok. 10,0 ml základního roztoku se smíchalo s 1 ml roztoku chloridu hlinitého RS a zředilo se roztokem kyseliny octové ledové R 5% (V/V) v methanolu R na 25,0 ml.

Kontrolní roztok. 10,0 ml základního roztoku se zředilo roztokem kyseliny octové ledové R 5% (V/V) v methanolu R na 25,0 ml.

Po 30 minutách se měřila absorbance zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako kvercetin-3-galaktosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$), se vypočítal podle vzorce:

$$(A \times 1,25)/m$$

A – absorbance roztoku při 425 nm

m – hmotnost drogy v gramech

(27)

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

4.3 Stanovení antioxidační aktivity

4.3.1 Metoda zhášení superoxidového radikálu generovaného neenzymaticky

Příprava lyofilizátu

5,00 g drogy se přelilo 500 ml vroucí vody a nechalo v uzavřené baňce po dobu 30 minut. Poté se směs zfiltrovala přes Büchnerovu nálevku a doplnila vodou do 500 ml. Z 480 ml takto získaného extraktu se připravilo 0,8963 g lyofilizátu.

Příprava roztoků

Všechny roztoky se připravují čerstvé v den měření. Obalením baněk alobalem se roztoky chrání před světlem.

NADH (β -nikotinamidadenin dinukleotid) – 7 mg NADH se navázilo do kalibrované zkumavky. Doplnilo se pufrem na 10 ml. Zkumavka se na 10 minut umístila do ultrazvukové lázně. Poté se zkumavka uzavřela, obalila alobalem a umístila do ledu.

NBT (nitrotetrazolinová modř) – 3,3 mg NBT se rozpustilo ve 2 ml pufru. Roztok se převedl do 100 ml baňky obalené alobalem a doplnil se 48 ml pufru.

PMS (N-methylphenazonium methylsulfát) – 0,01 g se rozpustil v 1 ml pufru. Dle navážky se vypočítalo množství roztoku, které obsahovalo 0,001 g PMS. Toto množství se převedlo do baňky a doplnilo se pufrem na 1 ml. Z tohoto roztoku se odebralo 250 μ l a převedlo se do alobalem obalené 100 ml baňky se zábrusem a doplnilo se pufrem na 50 ml.

Pufr – KH_2PO_4 19 mM, pH=7,4
2,6 g KH_2PO_4 se rozpustilo v 1000 ml vody. Pomocí pH-metru se přidáním 1M roztoku KOH upravilo pH na 7,4.

Příprava vzorku

0,0200g lyofilizátu se rozpustilo ve 2 ml pufru. Roztok se dále ředil pufrem. Pro každou koncentraci se měřila antioxidační aktivita.

Měření

Nastavení spektrofotometru:
Kinetická funkce, $\lambda=560$ nm, $t=2$ min; měření probíhalo při pokojové teplotě. Rozsah -3,99 až +3,99

Rate time – 90 s

Lag time – 30 s

Složení vzorků

Kontrolní vzorek

slepý kontrolní roztok:

150 µl pufru

150 µl NADH

450 µl NBT

150 µl pufru

kontrolní roztok:

150 µl pufru

150 µl NADH

450 µl NBT

150 µl PMS

Jednotlivé roztoky se přidávaly přímo do kyvety. Ihned se měřila absorbance při 560 nm.

Kontrolní roztok se připravil a změřil ještě dvakrát.

Vzorek

slepý roztok:

150 µl vzorku

150 µl NADH

450 µl NBT

150 µl pufru

roztok vzorku:

150 µl vzorku

150 µl NADH

450 µl NBT

150 µl PMS

Měření probíhalo třikrát pro každou koncentraci vzorku. Roztoky se připravovaly ze tří navážek.

Standardy

Antioxidační aktivita standardů se stanovovala stejným způsobem jako vzorek a sle-pý vzorek.

Byly použity tyto roztoky v pufru:

Trolox – 0,03g/10ml

Kyselina askorbová – 0,01g/10ml

Rutin – 0,008g/10ml

Výsledky

Antioxidační aktivita je vyjádřena jako procento inhibice redukce NBT v porovnání s kontrolním vzorkem. Vypočítá se ze vzorce:

$$\% = (1 - A_v / A_k) \times 100$$

A_v – nárůst absorbance testovaného vzorku v čase 2 min

A_k – nárůst absorbance kontrolního roztoku v čase 2 min

Následně byla určena IC_{50} , tj. koncentrace, která způsobí 50% inhibici redukce NBT.

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 2, 3, 4, 5 a grafech 1, 2 a 3.

4.3.2 Metoda zhášení radikálu DPPH

4.3.2.1 Stanovení antioxidační aktivity methanolového extraktu drogy

Roztok DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl)

0,0500 g DPPH se rozpustilo v 50,0 ml methanolu. K rozpuštění byla využita ultrazvuková lázeň. Hotový roztok se uchovával v chladu a temnu.

Extrakt drogy

K 1,0000 g drogy se přidalo 50,0 ml methanolu. Baňka byla na 30 minut umístěna do ultrazvukové lázně. Následně se směs přefiltrovala a doplnila methanolem do 50,0 ml odměrné baňky. K dalšímu ředění se použil 1 ml roztoku, který se doplnil methanolem do 10,0 ml.

Příprava vzorků

Do kalibrovaných zkumavek se postupně přidávalo rostoucí množství extraktu, 0,2 ml roztoku DPPH a methanol do celkového objemu 5,0 ml. Zkumavky se uzavřely a ne-chaly 30 minut při 37°C ve tmě.

Následně byla měřena absorbance.

Měření absorbance

Absorbance se měřila při 517 nm proti methanolu. Slepý vzorek obsahoval 0,2 ml roztoku DPPH a methanol do 5,0 ml. Jeho absorbance se měřila po 30 minutách inkubace. Z naměřených hodnot se vypočítalo, kolik procent DPPH se redukovalo při různých

koncentracích extraktu drogy. Dále byla určena hodnota IC_{50} , která udává koncentraci extraktu, která způsobí redukci 50% DPPH.

Měření bylo provedeno ze tří navážek.

Vzorec pro výpočet procent inhibice:

$$\% = (1 - A_{vz}/A_{sl}) \times 100$$

A_{vz} - absorbance roztoků z řady extraktu

A_{sl} - absorbance slepého vzorku

Standardy

Roztoky standardů se měřily stejným způsobem. Byl použit roztok rutinu v methanolu o koncentraci 0,1mg/ml a roztok hyperosidu o koncentraci 0,1mg/ml.

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 6, 8, 9 a grafech 4, 6 a 7.

4.3.2.2 Stanovení antioxidační aktivity lyofilizátu vodného extraktu

Pro stanovení byl použit lyofilizát připravený pro metodu zhášení superoxidu.

Příprava vzorků

0,0100 g lyofilizátu bylo rozpuštěno pomocí ultrazvuku v 10,0 ml methanolu. Z tohoto roztoku se postupně odebíraly rostoucí objemy, přidávalo se 0,2 ml roztoku DPPH a doplňoval methanolem na 5,0 ml.

Po 30 minutách ve tmě při 37°C se měřila absorbance při 517 nm proti methanolu. Slepý vzorek obsahoval pouze 0,2 ml roztoku DPPH a methanol do 5,0 ml.

Měření bylo provedeno ze tří navážek.

Výsledky

Ze získaných absorbancí bylo určeno, kolik % DPPH se při daném množství lyofilizátu redukovalo. Následně byla určena hodnota IC_{50} udávající koncentraci, která způsobí redukci 50% DPPH.

Vzorec pro výpočet procent inhibice:

$$\% = (1 - A_{vz}/A_{sl}) \times 100$$

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7 a grafech 5, 6 a 7.

4.4 Výsledky

4.4.1 Tabulky

4.4.1.1 Stanovení obsahu flavonoidů

Tabulka 1 - Stanovení obsahu flavonoidů

vzorek č.	hmotnost drogy (g)	absorbance roztoku	obsah flavonoidů (%)
1.	0,1998	0,234	1,46
2.	0,2011	0,320	1,99
3.	0,2017	0,368	2,28
průměr	0,2009	0,307	1,91

4.4.1.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení superoxidu

Tabulka 2 – Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení superoxidu. Hodnoty drogy *Fagopyri herba*.

koncentrace roztoku (mg/ml)	1. navážka (0,0212g)		2. navážka (0,0201g)		3. navážka (0,0204g)		průměr
	$A_{(kontrola)} = 0,0638$		$A_{(kontrola)} = 0,1122$		$A_{(kontrola)} = 0,1097$		
	A	% inhibice NBT	A	% inhibice NBT	A	% inhibice NBT	% inhibice NBT
0,0448	0,0462	27,59	0,0746	33,51	0,0777	29,17	30,09
0,0895	0,0446	30,09	0,0719	35,92	0,0782	28,71	31,57
0,1790	0,0387	39,34	0,0643	42,69	0,0707	35,55	39,19
0,2795	0,0306	52,04	0,0656	41,53	0,0578	47,31	46,96
0,4493	0,0175	72,57	0,047	58,11	0,0471	57,06	62,58
0,5521	0,0102	84,01	0,0272	75,76	0,0268	75,57	78,45
0,6307	0,0105	83,54	0,0206	90,55	0,0153	86,05	86,71
IC ₅₀ (mg/ml)	0,2633		0,3793		0,3258		0,3169

Tabulka 3 – Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení superoxidu. Hodnoty standardů – rutin.

koncentrace roztoku (mg/ml)	1. navážka (0,0081g/10ml)		2. navážka (0,0080g/10ml)		průměr
	$A_{(kontrola)} = 0,1234$		$A_{(kontrola)} = 0,1387$		
	A	%inhibice NBT	A	%inhibice NBT	%inhibice NBT
0,0097	0,1071	13,21	0,1078	22,28	17,75
0,0195	0,0736	40,36	0,0772	44,34	42,35
0,0250	0,0647	47,57	0,0662	52,27	49,92
0,0583	0,0382	69,04	0,0437	68,49	68,77
0,1361	0,005	95,95	0,0097	93,01	94,48
IC ₅₀ (mg/ml)					0,0242

Tabulka 4 – Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení superoxidu. Hodnoty standardů – trolox.

koncentrace roztoku (mg/ml)	1. navážka (0,0301g/10ml)		2. navážka (0,0301g/10ml)		průměr
	$A_{(kontrola)} = 0,076$		$A_{(kontrola)} = 0,099$		
	A	%inhibice NBT	A	%inhibice NBT	%inhibice NBT
0,0143	0,0565	25,66	0,0797	19,49	22,58
0,0334	0,0492	35,26	0,0681	31,21	33,24
0,0717	0,0446	41,32	0,0595	39,9	40,61
0,1003	0,0401	47,24	0,0563	43,13	45,19
0,1672	0,0319	58,03	0,0408	58,79	58,41
0,5017	0,0062	91,84	0,0101	89,8	90,82
IC ₅₀ (mg/ml)					0,1192

Tabulka 5 – Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení superoxidu. Hodnoty standardů – kyselina askorbová.

koncentrace roztoku (mg/ml)	1. navážka (0,0100g/10ml)		2. navážka (0,0108g/10ml)		průměr
	$A_{(kontrola)} = 0,1488$		$A_{(kontrola)} = 0,1264$		
	A	%inhibice NBT	A	%inhibice NBT	%inhibice NBT
0,0083	0,1203	19,15	0,0932	26,27	22,71
0,0183	0,1099	26,14	0,086	31,96	29,05
0,0417	0,0879	40,93	0,0693	45,17	43,05
0,0550	0,0859	42,27	0,064	49,37	45,82
0,0833	0,0723	51,41	0,0579	54,19	52,80
0,1667	0,0625	58,00	0,0489	61,31	59,66
IC ₅₀ (mg/ml)					0,0692

4.4.1.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení radikálu DPPH

Tabulka 6 – Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení radikálu DPPH. Hodnoty methanolového výluh drogy *Fagopyri herba*.

koncentrace roztoku (mg/ml)	1. navážka (0,9975g)		2. navážka (0,9997g)		3. navážka (0,9997g)		průměr
	$A_{(DPPH)} = 0,731$		$A_{(DPPH)} = 0,783$		$A_{(DPPH)} = 1,027$		
	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	A	%inhibice DPPH	%inhibice DPPH
0,032	0,645	11,77	0,662	15,45	0,979	4,67	10,63
0,04	0,577	21,07	0,551	29,63	0,903	12,07	20,92
0,08	0,414	43,37	0,375	52,11	0,744	27,56	41,01
0,1	0,356	51,3	0,318	59,39	0,675	34,28	48,32
0,12	0,306	58,14	0,274	65,01	0,598	41,77	54,97
0,14	0,248	66,07	0,213	72,80	0,462	55,02	64,63
0,16	0,189	74,15	0,167	78,67	0,387	62,32	71,71
0,2	0,093	87,28	0,15	80,84	0,292	71,57	79,9
0,24	0,078	89,33	0,087	88,89	0,167	83,74	87,32
0,28	0,074	89,88	0,084	89,27	0,092	91,04	90,06
IC ₅₀ (mg/ml)	0,096		0,076		0,132		0,105

Tabulka 7 – Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení radikálu DPPH. Hodnoty lyofilizátu vodného extraktu drogy *Fagopyri herba*.

koncentrace roztoku (mg/ml)	1. navážka (0,0102g)		2. navážka (0,0103g)		3. navážka (0,0102g)		průměr
	A _(DPPH) = 1,017		A _(DPPH) = 1,021		A _(DPPH) = 0,913		
	A	% inhibice DPPH	A	% inhibice DPPH	A	% inhibice DPPH	% inhibice DPPH
0,1178	0,852	16,22	0,753	26,25	0,821	10,08	17,52
0,1714	0,751	26,16	0,733	28,21	0,69	24,43	26,27
0,2142	0,669	34,22	0,629	38,39	0,638	30,12	34,24
0,2571	0,588	42,18	0,521	48,97	0,611	33,08	41,41
0,2999	0,476	53,2	0,471	53,87	0,493	46,00	51,02
0,3213	0,398	60,87	0,452	55,73	0,455	50,16	55,59
0,3642	0,324	68,14	0,385	62,29	0,381	58,27	62,9
0,4284	0,229	77,48	0,305	70,13	0,292	68,02	71,88
0,4713	0,183	82,01	0,233	77,18	0,28	69,33	76,17
0,5355	0,166	83,68	0,112	89,03	0,173	81,05	84,59
IC ₅₀ (mg/ml)	0,2892		0,2624		0,3213		0,2945

Tabulka 8 – Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení radikálu DPPH. Hodnoty standardů – rutin.

koncentrace základního roztoku rutinu – 0,1mg/ml

A_(DPPH)= 1,027

koncentrace roztoku (mg/ml)	A	% inhibice DPPH
0,002	0,858	16,46
0,003	0,719	29,99
0,004	0,615	40,12
0,005	0,484	52,87
0,006	0,428	58,33
0,007	0,236	77,02
0,008	0,17	83,45
0,009	0,105	89,78
0,01	0,075	92,70
IC ₅₀ (mg/ml)	0,005	

Tabulka 9 – Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení radikálu DPPH. Hodnoty standardů – hyperosid.

koncentrace základního roztoku hyperosidu – 0,1mg/ml

$A_{(DPPH)} = 1,002$

koncentrace roztoku (mg/ml)	A	% inhibice DPPH
0,002	0,771	23,05
0,003	0,652	34,93
0,004	0,499	50,2
0,005	0,378	62,28
0,006	0,263	73,75
0,007	0,18	82,04
0,008	0,063	93,71
0,009	0,063	93,71
0,01	0,053	94,71
IC ₅₀ (mg/ml)	0,004	

4.4.1.4 Porovnání hodnot IC₅₀

Tabulka 10 – Porovnání hodnot IC₅₀

	pohanka			standardy				
	lyofilizát (superoxid)	lyofilizát (DPPH)	extrakt (DPPH)	rutin (superoxid)	trolox (superoxid)	kyselin askorbová (superoxid)	rutin (DPPH)	hyperosid (DPPH)
IC ₅₀ (mg/ml)	0,3169	0,2945	0,105	0,0242	0,1192	0,0692	0,005	0,004

Poznámka:

1) V tabulkách 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 a 9 jsou A absorbance vzorků, jde o průměr ze tří měření.

2) Hodnoty koncentrací roztoků (v mg/ml) obsahujících lyofilizát vodného extraktu drogy (např. v tabulkách 2, 7 a 10) vyjadřují množství drogy v mg, ze kterého bylo připraveno používané množství lyofilizátu. Z 1 g drogy *Fagopyri herba* bylo připraveno 0,1867 g lyofilizátu. Konečná hodnota vyjadřuje koncentraci v květě při měření absorbance.

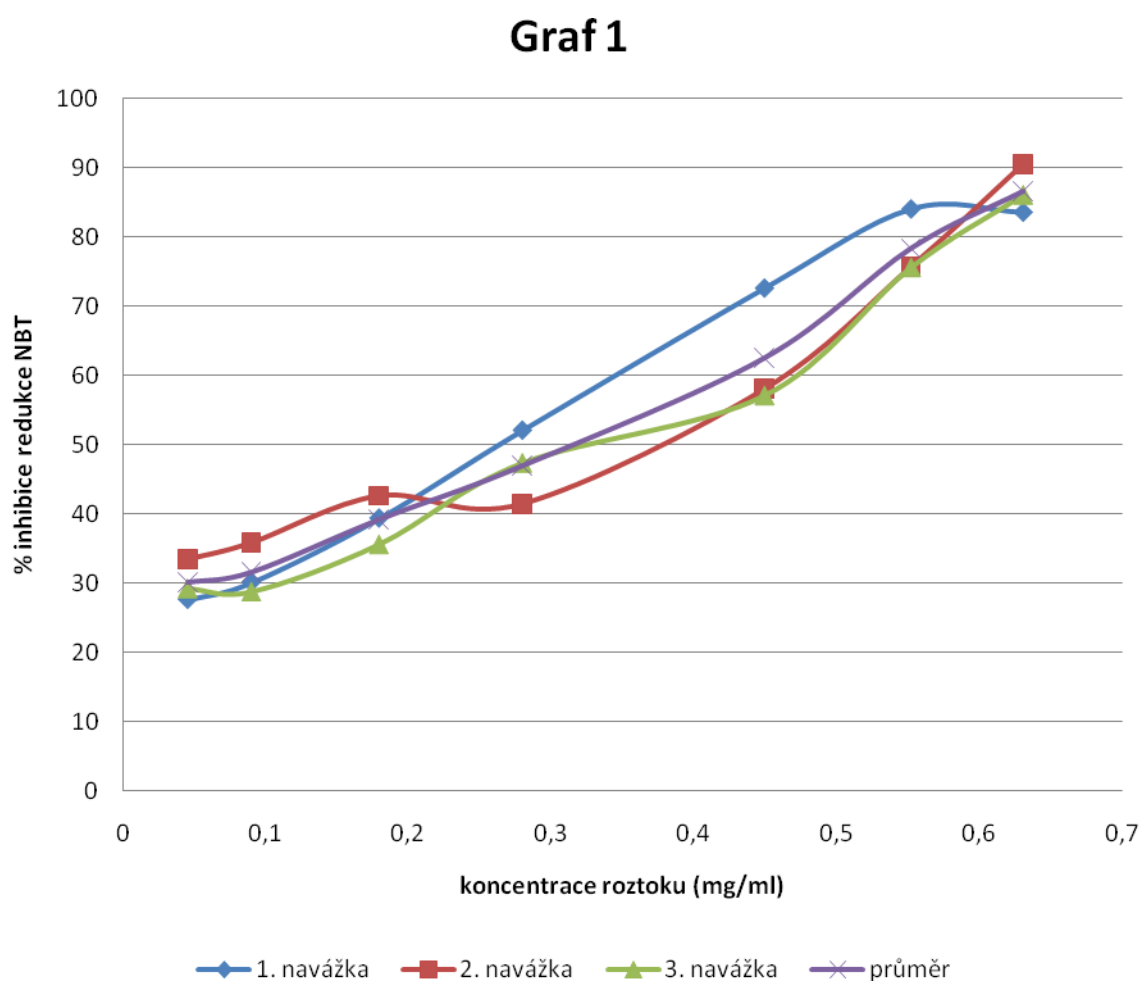
3) Hodnoty koncentrací roztoků methanolových extraktů drogy *Fagopyri herba* vyjadřují množství drogy v mg, ze kterého vznikne používané množství extraktu. Konečná hodnota vyjadřuje koncentraci v květě při měření absorbance.

4.4.2 Grafy

4.4.2.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení superoxidu

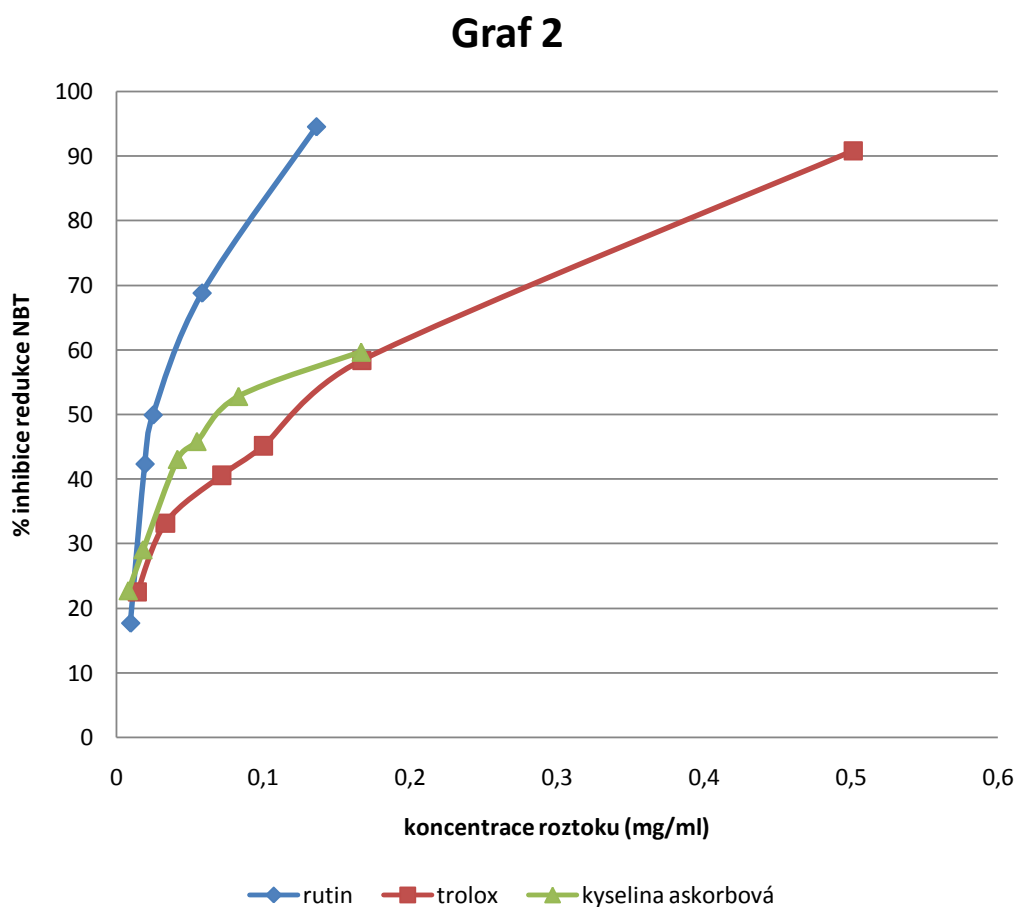
Graf 1 – Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení superoxidu. Hodnoty drogy *Fagopyri herba*.

Hodnoty grafu vychází z tabulky 2. Graf zobrazuje zjištěný vývoj inhibice redukce NBT pro tři navážky a hodnoty průměru.



Graf 2 – Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení superoxidu. Hodnoty standardů.

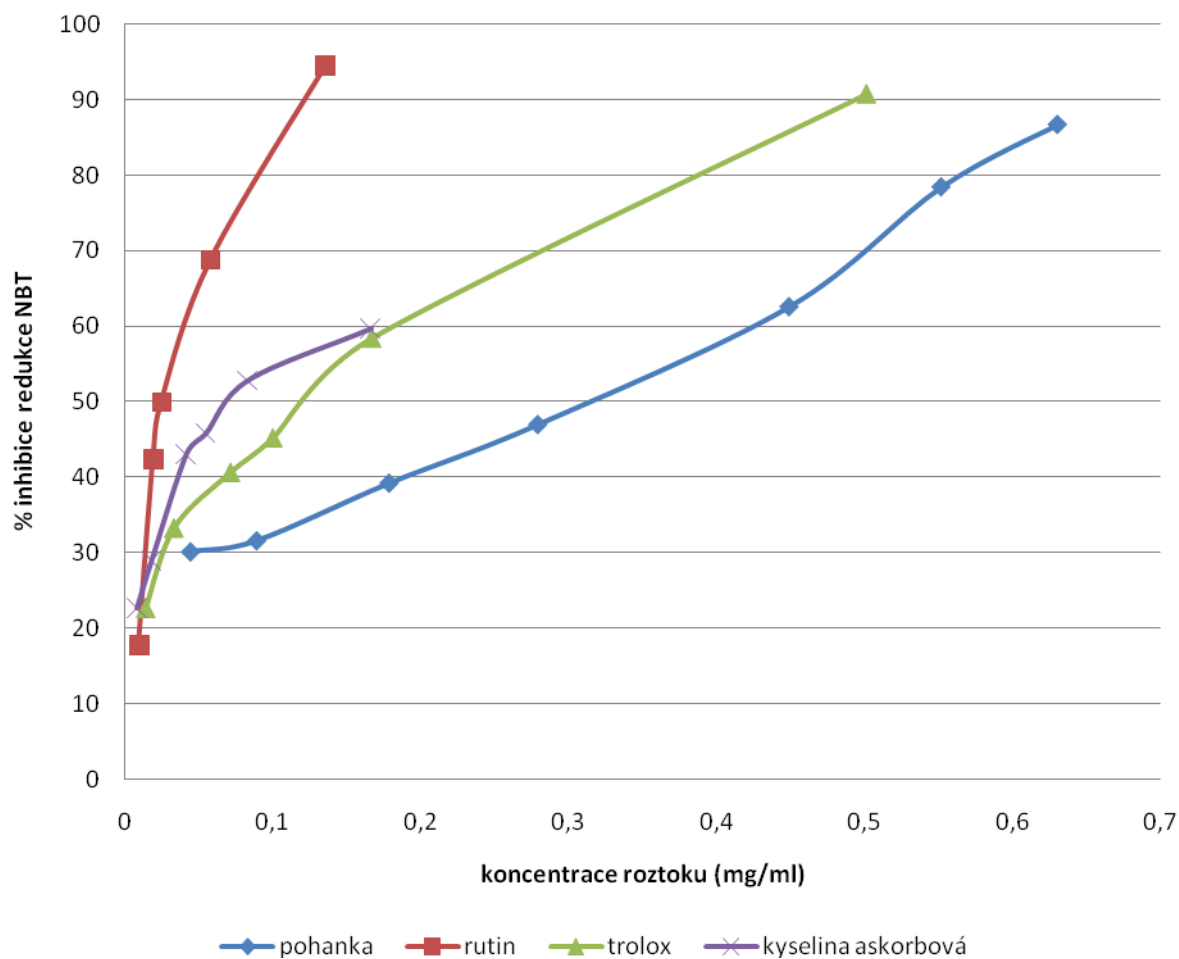
Hodnoty grafu vychází z tabulek 3, 4 a 5. Zobrazuje průměrné hodnoty inhibice redukce NBT pro každý standard.



Graf 3 – Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení superoxidu. Hodnoty drogy *Fagopyri herba* a standardů.

Hodnoty grafu vychází z tabulek 2, 3, 4 a 5. Graf zobrazuje průměrné hodnoty inhibice redukce NBT pohanky v porovnání s průměrnými hodnotami jednotlivých standardů.

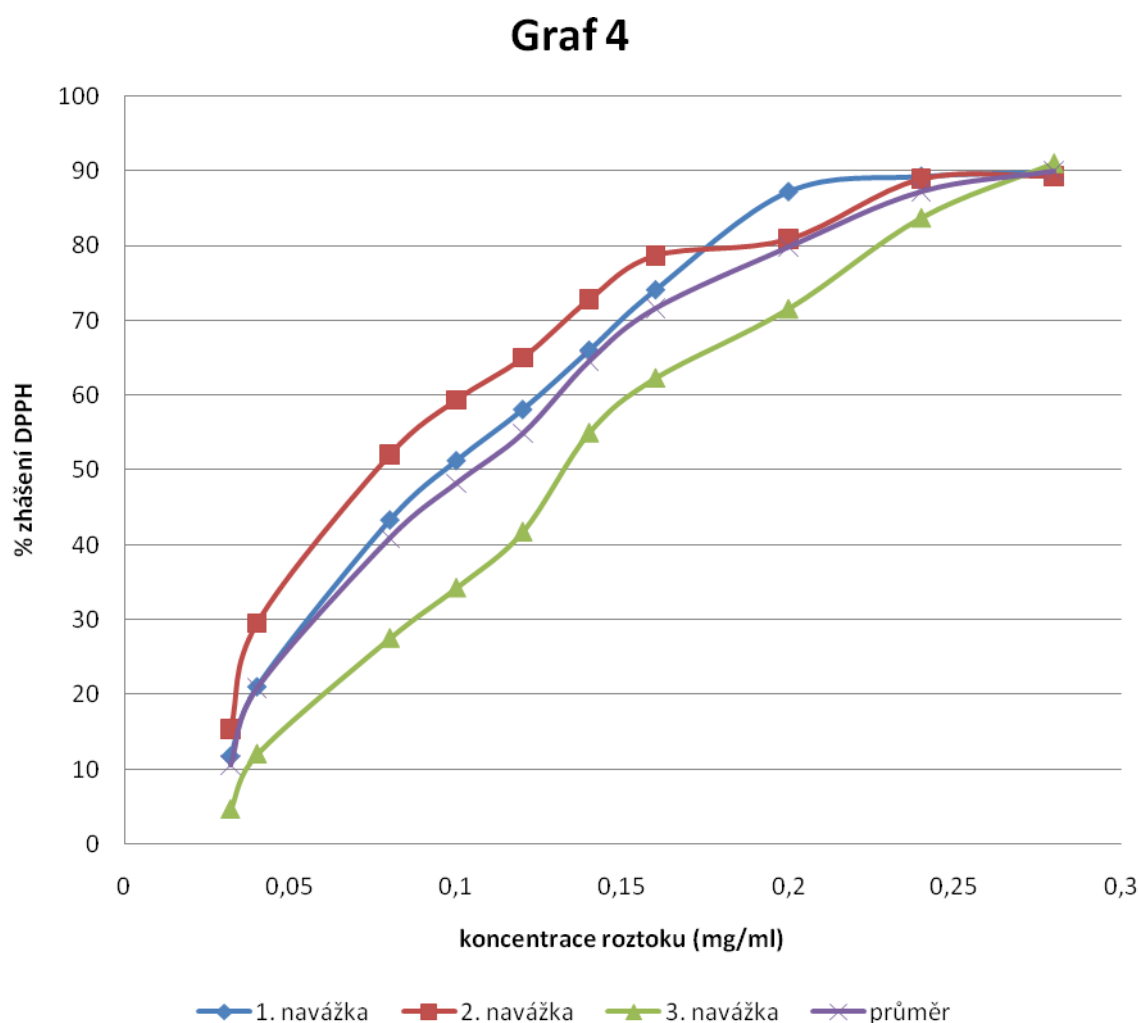
Graf 3



4.4.2.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení radikálu DPPH

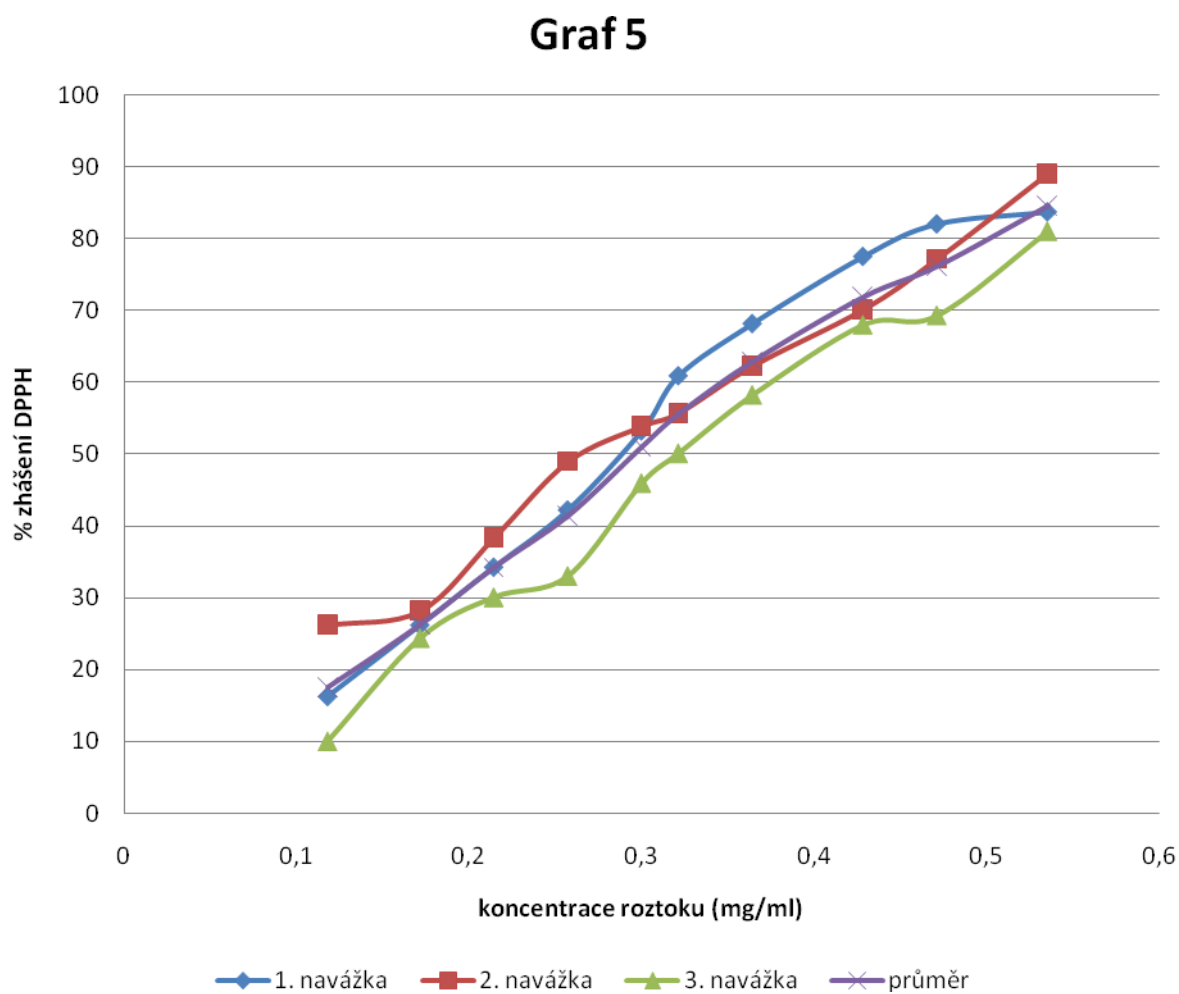
Graf 4 – Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení radikálu DPPH. Hodnoty methanolového extraktu drogy *Fagopyri herba*.

Hodnoty grafu vychází z tabulky 6. Graf zobrazuje hodnoty zhášení DPPH pro tři měření a hodnoty průměrné.



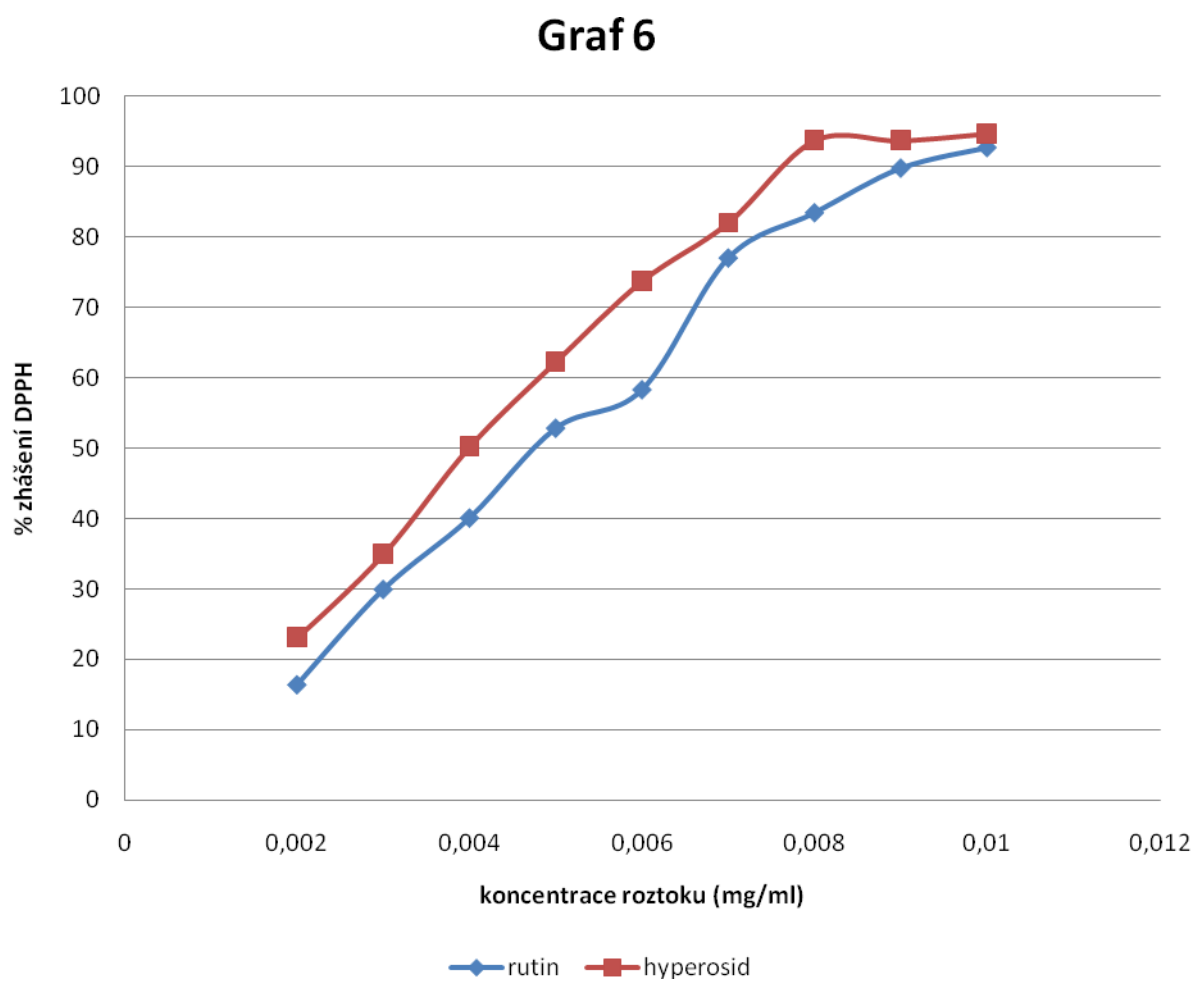
Graf 5 – Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení radikálu DPPH. Hodnoty lyofilizátu vodného extraktu drogy *Fagopyri herba*.

Hodnoty grafu vychází z tabulky 7. Graf zobrazuje hodnoty zhášení DPPH pro tři navážky a hodnoty průměrné.



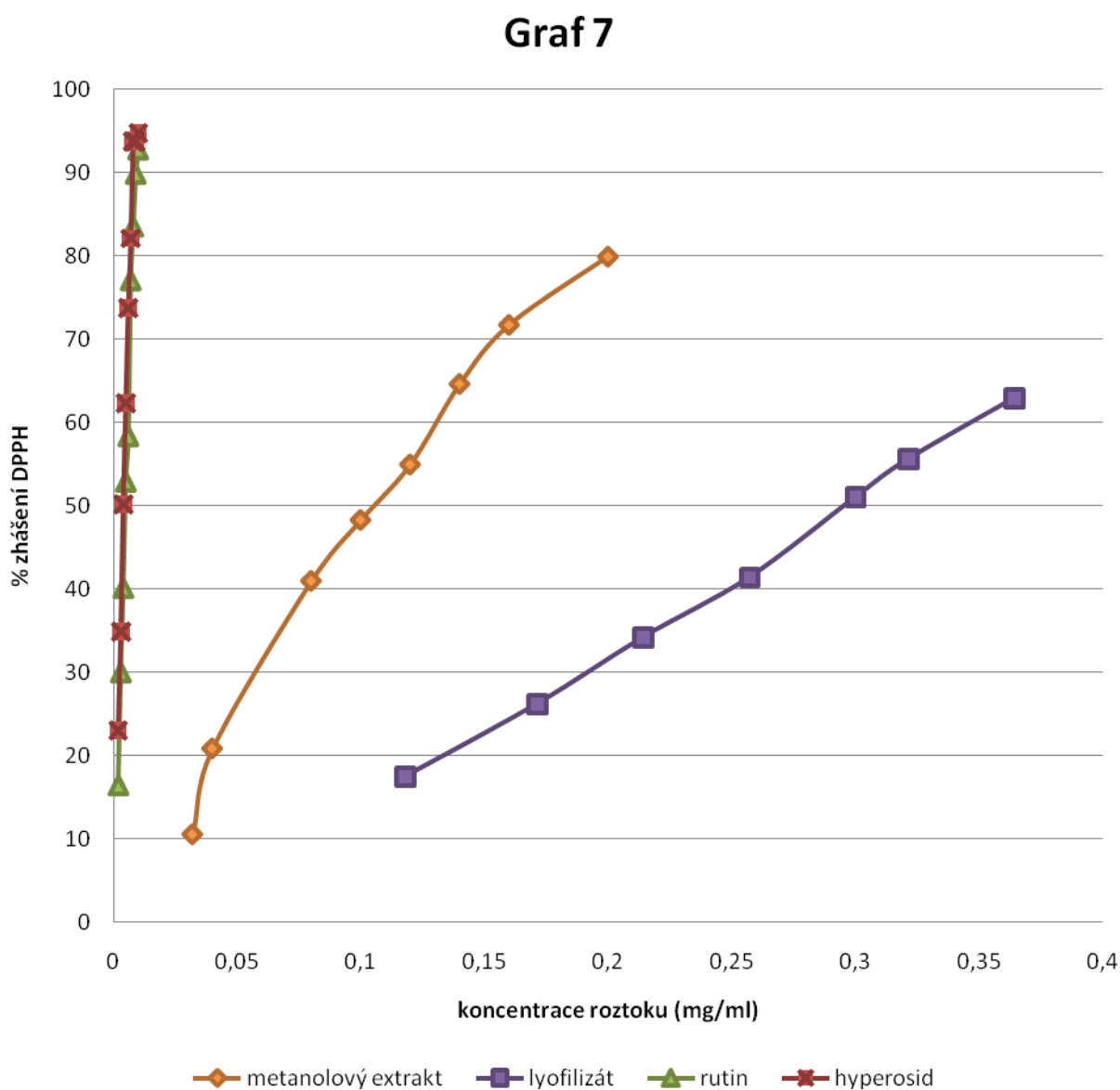
Graf 6 – Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení radikálu DPPH. Hodnoty standardů.

Hodnoty grafu vychází z tabulek 8 a 9.



Graf 7 – Stanovení antioxidační aktivity metodou zhášení radikálu DPPH. Hodnoty methanolového extraktu, lyofilizátu vodného extraktu drogy a standardů.

Hodnoty grafu vychází z tabulek 6, 7, 8 a 9. Graf zobrazuje průměrné hodnoty zhášení DPPH methanolového extraktu, lyofilizátu a standardů.



5 Diskuze

Významnými obsahovými látkami rodu *Fagopyrum* jsou flavonoidy. V terapii se používá nať pohanky – *Fagopyri herba*. Obsah veškerých flavonoidů stanovený spektrofotometricky byl 1,91%, vyjádřeno jako kvercetin-3-galaktosid.

Antioxidační aktivita druhu *Fagopyrum esculentum* byla stanovena dvěma metodami, zhášením superoxidu a zhášením radikálu DPPH.

Metodou zhášení superoxidu byla zjištěna antioxidační aktivita lyofilizátu vodného extraktu pohanky. Průměrná hodnota IC_{50} , koncentrace, která způsobila 50% inhibici redukce NBT, byla na základě tří paralelních měření určena jako 0,0592 mg lyofilizátu/ml, což je přepočteno na navážku drogy 0,3169 mg/ml. Antioxidační aktivita byla porovnána s aktivitou některých významných antioxidantů. Byly použity rutin, trolox a kyselina askorbová. IC_{50} těchto látek byly: rutin 0,0242 mg/ml, trolox 0,1192 mg/ml, kyselina askorbová 0,0692 mg/ml. Při porovnání IC_{50} lyofilizátu extraktu pohanky a standardů klesala antioxidační aktivita v pořadí: rutin > kyselina askorbová > trolox > lyofilizát.

Užitím této metody prokázali vyšší antioxidační aktivitu kyseliny askorbové oproti extraktu výhonků *F. tataricum* například Hsu, C.-K. a kol., 2008 (24) a u *F. esculentum* i *F. tataricum* například Liu, C.-L. a kol., 2008 (22), přičemž extrakt *F. tataricum* vykazoval vyšší aktivitu než *F. esculentum*. (22)

Metoda zhášení radikálu DPPH byla použita pro stanovení antioxidační aktivity methanolového extraktu a lyofilizátu vodného extraktu pohanky. Jako standardy byly použity rutin a hyperosid. Jejich IC_{50} byla touto metodou stanovena jako 0,005 mg/ml pro rutin a 0,004 mg/ml pro hyperosid.

IC_{50} , koncentrace, která způsobila 50% redukci radikálu DPPH, byla u lyofilizátu zjištěna ze tří měření jako 0,055 mg lyofilizátu/ml, což odpovídá 0,2945 mg/ml přepočteno na navážku drogy. Pro methanolový extrakt je tato koncentrace 0,105 mg/ml. Porovnáním se standardy klesá zjištěná antioxidační aktivita v pořadí: hyperosid > rutin > methanolový výluh > lyofilizát.

Metody k určení antioxidační aktivity bývají obecně založeny na inhibici určitých reakcí v přítomnosti antioxidantu. Antioxidanty reagují s volnými radikály nebo peroxidy. Mechanismy měření mohou být děleny na několik typů:

(1) Zpomalení produkce radikálů a schopnost zhaset radikály (např. TRAP – total radical-trapping antioxidant parameter assay nebo fotochemiluminescence (PCL)).

(2) Volný radikál je redukován antioxidantem a absorbance při určité vlnové délce klesá (např. DPPH; ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzotiazoline-6-sulphonic acid), atd.); respektive při FRAP (ferric reducing ability of plasma assay) se měří rostoucí absorbance vzniklých železnatých iontů. (10)

Specifičnost a citlivost jedné metody však nevede ke kompletnímu stanovení aktivity všech fenolických látek v extraktu. Je nutná kombinace metod. (10)

K určení antioxidační aktivity jsou používány například tyto metody:

1. Metoda založená na inhibici peroxidace lipidů. Roztok LDL-cholesterolu s roztokem CuSO_4 se nechává inkubovat s extraktem obsahujícím antioxidanty. Případně vzniklé peroxidy mají strukturu dienů, takže se dají stanovit spektrofotometriky. (3)

2. Metoda založená na redukcí radikálu DPPH antioxidantem. Extrakt s antioxidačními látkami redukuje DPPH, což se dá kvantifikovat spektrofotometriky jako pokles absorbance. (28)

3. Stanovení antioxidační aktivity pomocí zhasení superoxidu. K směsi roztoků NBT, NADH a PMS se přidávají roztoky obsahující antioxidanty. Klesající absorbance směsi indikuje rostoucí antioxidační účinek. (22)

Každá metoda má svá specifika a je proto nutné porovnávat výsledky získané toutéž metodou.

Metodou zhasení radikálu DPPH byly porovnány dva vzorky pohanky. Šlo o methanolový extrakt drogy a lyofilizát vodného extraktu. Oba výsledky se v tomto případě lišily. IC_{50} methanolového extraktu byla 0,105 mg/ml, zatímco pro lyofilizát byla tato hodnota 0,2945 mg/ml. Příčinou těchto výsledků je použití rozdílného rozpouštědla (methanol a voda) a odlišný postup extrakce, kdy do každého z rozpouštědel přechází trochu jiné spektrum obsahových látek. Obdobně byla rozdílná aktivita vůči DPPH zaznamenána i u extraktů různě polárními rozpouštědly. (10) Popsán byl také vliv dalších parametrů extrakce na tuto aktivitu. Sledován byl účinek různé koncentrace rozpouštědla, teploty a doby extrakce. (23)

Vliv teploty na výslednou antioxidační aktivitu, který pozorovali ve své práci také například Zielinska a kol., 2007 (17) a Sensoy a kol., 2006 (14), se v použité metodice eliminoval inkubací v blokovém termostatu při teplotě 37°C po 30 minut.

6 Závěr

Druhy rodu *Fagopyrum* (*Polygonaceae*), především *Fagopyrum esculentum* Moench (pohanka obecná) a *Fagopyrum tataricum* Gaertn. (pohanka tatarská) jsou rostliny používané pro své dobré nutriční vlastnosti jako potravina. Hlavními obsahovými látkami tohoto rodu jsou flavonoidy, polyfenoly, které vykazují řadu významných účinků na živý organismus. Tyto látky působí antikancerogenně, hypotenzivně, snižují lomivost krevních kapilár, normalizují jejich permeabilitu. Inhibují také peroxidaci lipoproteinů a tím ovlivňují vývoj atherosklerózy. Většina těchto vlastností je důsledkem výrazného antioxidačního účinku flavonoidů.

Celkový obsah flavonoidů byl v této práci stanoven spektrofotometricky dle ČL 2005. *Fagopyri herba* obsahuje 1,91% flavonoidů, vyjádřeno jako kvercetin-3-galaktosid.

Antioxidační aktivita drogy *Fagopyri herba* byla stanovena dvěma metodami, metodou zhášení radikálu DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) a metodou zhášení superoxidu generovaného neenzymaticky. Hodnocen byl methanolvý extrakt a lyofili-zovaný vodný extrakt. Aktivita byla porovnáována s antioxidační aktivitou standardů – flavonoidů (rutin a hyperosid), kyseliny askorbové a troloxu.

Vůči radikálu DPPH byl methanolvý extrakt účinnější než lyofilizát vodného extraktu. Antioxidační aktivita klesala v pořadí: hyperosid ($IC_{50} = 0,004$ mg/ml) \geq rutin ($IC_{50} = 0,005$ mg/ml) \succ methanolvý extrakt ($IC_{50} = 0,105$ mg/ml) \succ lyofilizát vodného extraktu ($IC_{50} = 0,2945$ mg/ml).

Zhášením superoxidu byla stanovena antioxidační aktivita lyofilizátu vodného extraktu. Porovnáním se standardy klesala aktivita v pořadí: rutin ($IC_{50} = 0,0242$ mg/ml) \succ kyselina askorbová ($IC_{50} = 0,0692$ mg/ml) \succ trolox ($IC_{50} = 0,1192$ mg/ml) \succ lyofilizát vodného extraktu ($IC_{50} = 0,3169$ mg/ml).

Antiradikálová aktivita nati pohanky zjištěná in vitro je poměrně vysoká a naznačuje možnost využití jako zdroje antioxidantů.

7 Použité zdroje

- (1) Wang, K.-J., Zhang, Y.-J., Yang, C.-R. (2005). Antioxidant phenolic constituents from *Fagopyrum dibotrys*. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 259-264.
- (2) Guo, X., Zhu, K., Zhang, H., Yao, H. (2007). Purification and characterization of the antitumor protein from Chinese tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaerth.) water-soluble extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6958-6961.
- (3) Jiang, P., Burczynski, F., Campbell, C., Pierce, G., Austria, J.A., Briggs, C.J. (2007). Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*, 40, 356-364.
- (4) Danila, A.-M., Kotani, A., Hakamata, H., Kusu, F. (2007). Determination of rutin, catechin, epicatechin, and epicatechin gallate in buckwheat *Fagopyrum esculentum* Moench by micro-high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1139-1143.
- (5) Kalinova, J., Triska, J., Vrchotova, N. (2006). Distribution of vitamin E, squalene, epicatechin, and rutin in common buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5330-5335.
- (6) Aoyagi, Y. (2006). An angiotensin-I converting enzyme inhibitor from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) flour. *Phytochemistry*, 67, 618-621.
- (7) Yang, N., Ren, G. (2008). Determination of d-*chiro*-inositol in tartary buckwheat using high-performance liquid chromatography with an evaporative light-scattering detector. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 757-760.
- (8) Suzuki, T., Watanabe, M., Iki, M., Aoyagi, Y., Kim, S.-J., Mukasa, Y., Yokota, S., Takigawa, S., Hashimoto, N., Noda, T., Yamauchi, H., Matsuura-Endo, C. (2009). Time-course study and effects of drying method on concentrations of γ -aminobutyric acid, flavonoids, anthocyanin, and 2''-hydroxynicotianamine in leaves of buckwheats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 259-264.
- (9) Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J., Šícha, J. (1989). *Obecná farmakognosie – II. Sekundární látky*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
- (10) Sun, T., Ho, C.-T. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, 90, 743-749.
- (11) Racek, J. (2003). *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. Galén. Praha.

- (12) Štípek, S. a kol. (2000). Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Grada Publishing, Praha.
- (13) Ohsako, T., Yamane, K., Ohnishi, O. (2002). Two new *Fagopyrum* (Polygonaceae) species, *F. gracilipedoides* and *F. jinshaense* from Yunnan, China. *Genes Genet. Syst.*, 77, 399-408.
- (14) Sensoy, Í., Rosen, R.T., Ho, C.-T., Karwe, M.V. (2006). Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 99, 388-393.
- (15) Bonafaccia, G., Marocchini, M., Kreft, I. (2003). Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chemistry*, 80, 9-15.
- (16) Choi, I., Seog, H., Park, Y., Kim, Y., Choi, H. (2007). Suppressive effects of germinated buckwheat on development of fatty liver in mice fed with high-fat diet. *Phytomedicine*, 14, 563-567.
- (17) Zielinska, D., Szawara-Nowak, D., Zielinski, H. (2007). Comparison of spectrophotometric and electrochemical methods for the evaluation of the antioxidant capacity of buckwheat products after hydrothermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6124-6131.
- (18) Kim, S.-J., Maeda, T., Sarker, M.Z.I., Takigawa, S., Matsuura-Endo, C., Yamauchi, H., Mukasa, Y., Saito, K., Hashimoto, N., Noda, T., Saito, T., Suzuki, T. (2007). Identification of anthocyanins in the sprouts of buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6314-6318.
- (19) Vodrážka, Z. (2002). *Biochemie*. Academia, Praha.
- (20) Metzger, B.T., Barnes, D.M, Reed, J.D. (2007). Insoluble fraction of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein possessing cholesterol-binding properties that reduce micelle cholesterol solubility and uptake by caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6032-6038.
- (21) Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J. (2005). *Biochemie pro studující medicíny*, II. díl. Karolinum, Praha.
- (22) Liu, C.-L., Chen, Y.-S., Yang, J.-H., Chiang, B.-H. (2008). Antioxidant activity of tartary (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) and common (*Fagopyrum esculentum* Moench) buckwheat sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 173-178.
- (23) Hinneburg, I., Neubert, R.H.H. (2005). Influence of extraction parameters on the phytochemical characteristics of extracts from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) herb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3-7.

- (24) Hsu, C.-K., Chiang, B.-H., Chen, Y.-S., Yang, J.-H., Liu, C.-L. (2008). Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) sprout with trace element water. *Food Chemistry*, 108, 633-641.
- (25) Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol*, 28, 25-30.
- (26) Ribeiro, B., Valentao, P., Baptista, P., Seabra, R.M., Andrade, P.B. (2007). Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1805-1813.
- (27) Český lékopis 2005. Grada Publishing, Praha.
- (28) Vrchovská, V., Sousa, C., Valentao, P., Ferreres, F., Pereira, J.A., Seabra, R.M., Andrade, P.B. (2006). Antioxidative properties of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) external leaves against DPPH, superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Food Chemistry*, 98, 416-425.

internetové stránky:

- (29) PubMed - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=3616>
- (30) <http://botany.cz/cs/fagopyrum-esculentum/>