

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOSIE

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Antiradikálová aktivita extraktů drog s obsahem tříslovin - Rubi idaei folium, Rubi fruticosi folium, Fragariae folium a Agrimoniae herba

Vypracovala: Mgr. Zuzana Neckářová
Konzultant: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.
Oponent:
Datum obhajoby:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Děkuji paní Doc. RNDr. Jiřině Spilkové za odborné vedení a podporu při řešení této práce. Dále děkuji PharmDr. Tomášovi Siatkovi CSc. za provedení lyofylizace a laborantce Markétě Šimůnkové.

Obsah

1. Úvod a cíl práce.....	6
2. Metody užívané v hodnocení antioxidační aktivity.....	10
2.1. Metody založené na eliminaci radikálů.....	10
2.1.1. Metoda DPPH.....	10
2.1.2. Metoda ABTS-TROLOX.....	11
2.1.3. Galvinoxyllová metoda.....	12
2.1.4. Metoda DCI (2,6-dichlorfenolindofenolová) metoda MEBAK.....	12
2.1.5. Metoda ORAC.....	12
2.1.6. Stanovení redukční síly 2,2'-bipyridylem.....	12
2.1.7. Metody založené na vychytávání OH-radikálů.....	13
2.1.8. Metody založené na vychytávání superoxidového anion-radikálu.....	13
2.1.9. Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace.....	13
2.2. Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek.....	13
2.2.1. Metoda FRAP.....	13
2.2.2. Cyklická voltametrie.....	14
2.2.3. HPLC metoda s elektrochemickou detekcí.....	14
2.3. Metody užívané v hodnocení antioxidační aktivity tříslovin.....	14
3. Třísloviny.....	15
3.1. Hydrolyzovatelné třísloviny.....	15
3.1.1. Struktura hydrolyzovatelných tříslovin.....	15
3.1.2. Rozdělení.....	16
3.1.2.1. <i>Monomerní hydrolyzovatelné třísloviny</i>	16
3.1.2.2. <i>Oligomerní hydrolyzovatelné třísloviny</i>	16
3.2. Kondenzované třísloviny.....	17
3.2.1. Struktura kondenzovaných tříslovin.....	17
3.2.2. Rozdělení.....	17
3.2.2.1. <i>Proantokyanidiny typu B (B-1, B-2, B-3 a B-4)</i>	17
3.2.2.2. <i>Proantokyanidiny typu A</i>	18
3.2.2.3. <i>Oligomery</i>	18
3.2.2.4. <i>Polymery</i>	19
3.3. Fyzikálně-chemické vlastnosti.....	19
3.4. Biologické vlastnosti tříslovin.....	19

4. Druhy rodu <i>Rubus</i>, obsahové látky a využití.....	21
5. <i>Fragaria vesca</i> L., obsahové látky a využití.....	32
6. <i>Agrimonia eupatoria</i> L., obsahové látky a využití.....	37
7. Experimentální část.....	39
7.1. Rostlinný materiál.....	39
7.2. Chemikálie.....	39
7.3. Standardy.....	39
7.4. Přístrojové vybavení.....	39
7.5. Příprava výluhu z drogy.....	39
7.6. Zhášení superoxidového radikálu.....	40
7.6.1. Příprava činidel pro stanovení antioxidační aktivity.....	40
7.6.2. Vzorek hodnocené drogy.....	40
7.6.3. Roztoky standardů.....	41
7.6.4. Měření antioxidační aktivity.....	41
7.6.4.1. Antioxidační aktivita kontrolního vzorku.....	41
7.6.4.2. Antioxidační aktivita vzorků.....	41
7.7. Testování antiradikálové aktivity s DPPH.....	43
7.7.1. Příprava základního roztoku DPPH.....	43
7.7.2. Vlastní vzorek.....	43
7.7.3. Roztoky standardů.....	43
7.7.4. Stanovení antiradikálové aktivity.....	43
8. Výsledky.....	45
8.1. Zhášení superoxidového radikálu.....	45
8.1.1. Aktivita vzorku <i>Rubi idaei folium</i>	45
8.1.2. Aktivita vzorku <i>Rubi fruticosi folium</i>	46
8.1.3. Aktivita vzorku <i>Fragariae folium</i>	47
8.1.4. Aktivita vzorku <i>Agrimoniae herba</i>	48
8.1.5. Aktivita epigalokatechin galátu.....	49
8.1.6. Aktivita (-)-epikatechinu.....	50
8.1.7. Aktivita (+)-katechinu.....	51
8.2. Zhášení DPPH radikálu.....	52
8.2.1. Aktivita vzorku <i>Rubi idaei folium</i>	52
8.2.2. Aktivita vzorku <i>Rubi fruticosus folium</i>	53

8.2.3. Aktivita vzorku <i>Fragariae folium</i>	54
8.2.4. Aktivita vzorku <i>Agrimoniae herba</i>	55
8.2.5. Aktivita epigalokatechin galátu.....	56
8.2.6. Aktivita (-)-epikatechinu.....	57
8.2.7. Aktivita (+)-katechinu.....	58
9. Diskuze.....	59
10. Závěr.....	63
11. Literatura.....	64
12. Abstrakt.....	68

1. Úvod a cíl práce

Do popředí se v posledních letech dostává úloha reaktivních forem kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species) a dusíku (RNS, z angl. reactive nitrogen species) při oxidačním stresu u živých organismů. Mezi nejčastější formy ROS patří hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$), superoxidový radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydroperoxydový radikál (H O_2^{\cdot}), alkoxylový radikál ($\text{RO}\cdot$), peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná (HOCl), ozón (O_3) a singlet kyslíku ($^1\text{O}_2$). Mezi RNS se řadí oxid dusnatý $\text{NO}\cdot$, peroxyinitrit ONOO^- , nitroxid NO^- , nitrosyl NO^+ , kyselina dusitá HNO_2 , oxid dusný N_2O_3 a nitronium NO_2^+ (1).

Volné radikály jsou atomy, molekuly nebo ionty, které jsou schopné samostatné existence a mají ve svém elektronovém obalu jeden nepárový elektron, event. více nepárových elektronů. Proto se snaží získat další elektron a vytvořit tak stabilní konfiguraci. Výsledkem je velká reaktivita a omezená doba existence. Volné radikály reagují nejen mezi sebou, ale i s inaktivními molekulami a tím vytvářejí další volný radikál. Tento děj má tendenci pokračovat formou řetězové reakce. Může tak docházet k poškození lipidů v lipoproteinech a buněčných membrán, nukleových kyselin, sacharidů i bílkovin včetně enzymů. Výsledkem pak může být těžké poškození tkání a celých orgánů (2).

Mezi nejvíce prostudované volné radikály patří superoxid, který vzniká z molekulárního kyslíku přijmutím jednoho elektronu. Sám molekulární kyslík je volným radikálem. Ze superoxidového radikálu se tvoří další volné radikály, včetně radikálu hydroxylového, hydroperoxidového a peroxidu vodíku. Hydroxylový radikál je potenciálně nejsilnější oxidant vyskytující se v biologických systémech, snadno reaguje s různými molekulami a vzniká rozkladem peroxidu vodíku Fentonovou reakcí (katalyzátorem reakce je Fe^{2+}), interakcí superoxidu s peroxidem vodíku HaberWeissovou reakcí, nebo také při reakci peroxidu vodíku s ionty přechodných kovů (3).

ROS a RNS hrají v organismech dvojí roli, pozitivní a negativní. Negativní roli, které je v současné době věnována velká pozornost, je nadprodukce ROS (vyplývající buď z řetězce mitochondriálního transportu nebo nadměrné stimulace NAD(P)H), která má za následek oxidační stres. Tak nazýváme škodlivý proces, který bývá často příčinou poškození buněčné struktury, včetně lipidů a membrán, proteinů a DNA (4). Výsledkem může být mutagenese, karcinogenese, či zánik buňky (1). Naproti tomu prospěšné efekty ROS/RNS se vyskytují pouze v nízkých koncentracích a zahrnují fyziologickou roli v buněčných odpovědích, jako například v obraně proti infekčním agens (účast

v protizánětlivých reakcích), účast v procesu fagocytózy, zprostředkovávají buněčnou signalizaci nebo indukci mitogenní odpovědi. ROS bez buněk působí jako sekundární posel v intracelulárních signálních kaskádách, které způsobují buněčný růst rakovinotvorných buněk. ROS však může navozovat i buněčné stárnutí a apoptózu a může proto fungovat jako protinádorový druh.

Pozornost se soustřeďuje na souvislost mezi ROS/RNS, jejich vznikem a vývojem rakoviny, kardiovaskulárním onemocněním, aterosklerózou, hypertenzí, ischemickým a reperfučním poškozením, *diabetem mellitus*, neurodegenerativním poškozením (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba), revmatoidní artritidou a stárnutím. Aktuálním tématem diskuzí je otázka, zda nadměrná tvorba volných radikálů je primární příčinou nebo následkem poškození tkáně (4).

Mezi zdroje přispívající k oxidačnímu stresu patří fotosyntéza, respirační řetězec mitochondrií, expozice buněk atmosférickému kyslíku, sluneční záření, změna teploty, patogeny, vzdušné polutanty (ozón, SO₂), kovy aj. Aktivní formy kyslíku se vytvářejí hlavně v chloroplastech (3), v nichž dochází k redukci kyslíku za vzniku superoxidového radikálu (1) a v mitochondriích (3), kde taktéž vzniká superoxidový radikál redukcí jedné molekuly kyslíku. Peroxisomy jsou zodpovědné za tvorbu peroxidového a superoxidového radikálu. Dalšími zdroji superoxidového radikálu jsou endoplazmatické retikulum, plazmatická membrána, CytP450, neutrofilů (1), superoxid se také tvoří ve fagocytujících buňkách, kde pomáhá ničit viry a bakterie, nebo vzniká při chemických haváriích. Dalším možným zdrojem ROS je reakce katalyzovaná lipoxygenázou, při které dochází k peroxidaci polynenasycených mastných kyselin. Vzniklé peroxidderiváty podléhají autokatalytické degradaci, při které dochází k tvorbě radikálů iniciujících řetězové reakce peroxidace lipidů (5).

Oxidační stres vede k tvorbě kyslíkových radikálů a dochází tak k oxidačnímu poškození. Pokud intenzita působení stresoru nepřekročí letální úroveň, dochází k mobilizaci ochranných mechanismů, které směřují ke zvýšení odolnosti organismu vůči působícím faktorům. Tyto ochranné systémy jsou složeny z hydrofilních a lipofilních metabolitů s antioxidačními vlastnostmi (askorbát, glutathion, α -tokoferol, karotenoidy, polyfenoly, β -karoten, koenzym Q₁₀, stopové prvky (Se, Zn), kyselina močová, melatonin), z enzymů, které se setkávají přímo s toxickými oxidanty (superoxiddismutáza, katalázy, peroxidázy, glutathionperoxidáza) a z enzymů, které udržují zásobu antioxidantů v redukovaném stavu (dehydroaskorbátreduktáza, glutathionreduktáza). K nejdůležitějším enzymům ochranného systému patří superoxid-dismutáza (SOD). SOD je metaloenzym,

který urychluje dismutaci superoxidu o 4 řády za vzniku peroxidu vodíku, který je dále redukován (2).

Oxidační stres však nevzniká pouze následkem nadprodukce ROS/RNS, ale může být vyvolán i nadprodukcí antioxidantů, nebo naopak snížením jejich koncentrace či kombinací těchto stavů.

Počet civilizačních onemocnění, které souvisí s působením volných radikálů, v moderní společnosti stoupá. Vyrůstá tak zájem o zjišťování antioxidačních vlastností jak čistých přírodních látek, tak i rostlinných extraktů, což má za následek vytváření spolehlivých metod pro stanovení jejich antioxidační aktivity. Většinu přírodních antioxidantů navíc přijímáme jako součást složitých směsí, jejichž složky mohou reagovat s různými radikály různými mechanismy a mohou též na sebe vzájemně působit synergicky i inhibičně (1).

Cíl práce

V poslední době se velký význam přikládá přírodním látkám, zejména polyfenolickým sloučeninám, jež jsou nejrozšířenějšími sloučeninami s redukčními účinky v naší stravě. Jejich zdrojem jsou např. zelenina, ovoce, čaj, víno, aromatické a léčivé rostliny. *Rubus fruticosus L.*, *Rubus idaeus L.*, *Fragaria vesca L.* a *Agrimonia eupatoria L.* jsou rostliny, jejichž hlavní složkou jsou právě polyfenolické sloučeniny. V této práci jsem se zaměřila na stanovení jejich antiradikálové aktivity vůči radikálu DPPH a superoxidovému radikálu.

2. Metody užívané v hodnocení antioxidační aktivity

Metody pro stanovení antioxidační aktivity přírodních látek lze rozdělit do dvou skupin. Na metody chemické a metody fyzikální (1).

Chemické metody spočívají nejčastěji v použití činidel poskytujících s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty. Pokud vzorek obsahuje antioxidanty, ke vzniku barevných produktů nedochází. Intenzita zbarvení se nejčastěji měří spektrofotometricky.

Fyzikální metody se zabývají změnou fyzikálních vlastností, které doprovázejí chemické procesy. Příkladem je stanovení redox potenciálu, chemiluminiscence nebo stanovení oxidačních změn pomocí ^{18}O (6, 7).

Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí je používán pojem celková antioxidační aktivita (total antioxidant activity TAA). TAA je parametrem, který kvantifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály a charakterizuje tak počáteční dynamiku průběhu antioxidačního procesu při určité koncentraci antioxidantu (1, 8).

2.1. Metody založené na eliminaci radikálů

Metody spočívají v hodnocení schopnosti vzorku vychytávat volné radikály, jako např. kyslíkové radikály (hydroxyl, peroxy, superoxidový anion-radikál) nebo syntetické stabilní radikály (DPPH, ABTS^{•+}, galvinoxyl) (1).

2.1.1. Metoda DPPH

Tato metoda je považována za jednu ze základních metodik a spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem difenylpikrylhydrazylem (DPPH[•], 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl), který díky své struktuře může přejít do redukované formy DPPH-H, difenylpikrylhydrazinu. Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky v absorpčním maximu 517 nm a projevuje se fialovým zbarvením. Působením antioxidantů se intenzita fialového zbarvení DPPH[•] postupně mění na žluté. Tato změna je způsobena pikrylovou skupinou vyskytující se v tomto radikálu. Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku.

Měření se provádí po uplynutí určitého konstantního času nebo se pracuje v kinetickém režimu (1, 6).

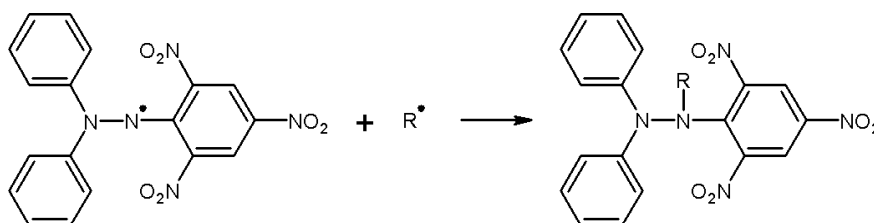
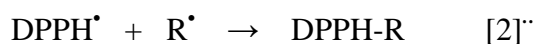


DPPH \cdot ... DPPH radikál

AH ... donor elektronů

DPPH-H ... redukovaná forma

A \cdot ... volný radikál



2.1.2.. Metoda ABTS-TROLOX

Je jednou z nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity (TAA). Výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylovou kyselina), a proto je tato metoda také označována jako metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

Reakcí diamonné soli a peroxidisíranu v poměru 2:1 vzniká radikálový kationt ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazolin-6-sulfonát)), který vytváří roztok zelenomodré barvy. Po přidání vzorku se měří absorbance při 734 nm. Antioxidační aktivita vzorku je přímo úměrná ubývajícím intenzitě zabarvení zelenomodrého roztoku.

Pro čisté látky je TEAC definována jako milimolární koncentrace Troloxu vykazující stejnou antioxidační aktivitu jako testovaná látka při koncentraci 1 mmol.l⁻¹. Pro směsi TEAC udává koncentraci Troloxu (mmol.l⁻¹), která je rovná antioxidační aktivitě vzorku (1, 7).

$$\text{TEAC (mM)} = \left(\frac{A_{\text{vzorku}} - A_{\text{slep}}}{A_{\text{s tan dard}} - A_{\text{slep}}} \right) \times C_{\text{s tan dard}} \quad [3]$$

2.1.3. Galvinoxyllová metoda

Galvinoxyl (2,6-di-*terc*-butyl-4-[(3,5-di-*terc*-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dien-1-yliden)methyl]fenoxyl) je stabilní radikál, který vykazuje světle žluté zbarvení při vlnové délce 428 nm. Princip metody spočívá v redukci radikálu galvinoxylu (odbarvení roztoku) látkami poskytujícími vodík. Odbarvení roztoku je přímo úměrné aktivitě antioxidantu (1).

2.1.4. Metoda DCI (2,6-dichlorfenolindofenolová), metoda MEBAK

Tato metoda je standardní metodou doporučovanou MEBAK (Mittleeuropäische Brautechnische Analysenkommission). Principem je reakce 2,6-dichlorfenolinfenolu s endiolovou skupinou polyfenolů za vzniku bezbarvých dioxosloučenin. Změna zbarvení se stanovuje spektrofotometricky nebo se používá kombinace s voltametrickou detekcí v případech, kdy není možno použít optických metod (tmavé roztoky). Výsledky jsou vyjadřovány jako ekvivalenty množství kyseliny L-askorbové, která slouží jako standard (6).

2.1.5. Metoda ORAC

Metoda ORAC (oxygen radical absorbance capacity) hodnotí schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Detekce je založena na úbytku fluorescenčního činidla, β -fykoerytrinu (β -PE) po reakci s hydroxylovými radikály.

Při stanovení antioxidační kapacity polyfenolů však β -PE vykazuje jistá omezení. Fykoerytrin se získává z *Porphyridium cruentum*, a proto se jeho vlastnosti často liší v závislosti na šarži, což vede k nepřesnosti výsledků. Fykoerytrin je navíc odbarvován i po vystavení světla určité vlnové délky a některé látky, např. polyfenoly, váží β -PE nescifickou vazbou. Oba tyto faktory mohou snižovat ORAC hodnotu. Zavedením jiného typu fluorescenční sondy, fluoresceinu (FL), se metoda zpřesňuje (1, 9).

2.1.6. Stanovení redukční síly 2,2'-bipyridylem

Tato metoda je založena na reakci železitých iontů s 2, 2'-bipyridylem, kdy vzniklý komplex reaguje se širokou skupinou redukujících látek a mění se z bezbarvé oxidované formy na červenou, redukovanou. Tuto změnu lze měřit spektrofotometricky při 510 nm (6).

2.1.7. Metody založené na vychytávání OH-radikálů

Při těchto metodách jsou OH-radikály generovány různými postupy (Fentonovou reakcí, UV fotolýzou peroxidu vodíku, fotolýzou syntetických derivátů).

Detekce je založena na vychytávání radikálů látkami (např. kyselina salicylová, 2,2-dimethyl-2*H*-pyrrol-1-oxidu (DMPO), deoxyribóza), jejichž reakční produkty lze snadno stanovit. Antioxidanty vychytávající OH[•] snižují tvorbu těchto produktů. Výhodou tohoto postupu je možnost stanovit jak antioxidační, tak i prooxidační vlastnosti látek (1).

2.1.8. Metody založené na vychytávání superoxidového anion-radikálu

Metoda spočívá v redukci nitrotetrazoliové modři s radikálem vytvořeným např. reakcí PMS/NADH (5-metylfenaziniummethylsulfátu a β – nikotinamidadeninukleotidu) nebo systém xanthin/xanthinoxidasa. Detekce se provádí spektrofotometricky při 550-560 nm. Nitrotetrazoliová modř může být nahrazena syntetickým formazanovým barvivem WST-1 (2-(4-Iodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2*H*-tetrazolium) (1).

2.1.9. Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace

Lipidová peroxidace vyvolaná volnými radikály je jedním z nejvýznamnějších patologických pochodů v organismu.

Tato metoda spočívá v hodnocení schopnosti látek eliminovat lipidovou peroxidaci. Pro testování lipidové peroxidace byla vyvinuta celá řada více či méně složitých metod. Nejjednodušší metody pracují s jednoduchými lipidy, nejsložitější využívají biologické membrány jako matrici (1, 6).

2.2. Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

Neenzymové antioxidanty mohou být charakterizovány jako redukční činidla, která reagují s oxidanty, redukují je a tím je inaktivují .

2.2.1. Metoda FRAP

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential) je založena na redukci komplexu Fe³⁺- (2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) (Fe³⁺-TPTZ) antioxidanty ze vzorku za vzniku fialových barevných produktů Fe²⁺. Mírou antioxidační aktivity vzorku je nárůst absorbance při 593 nm odpovídající množství komplexu Fe²⁺-TPTZ (1, 7).

2.2.2. Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie indukuje schopnost látek odštěpovat elektrony. Zjišťuje se, jak snadno je látka schopna poskytovat elektrony a čím je ochotněji poskytuje, tím může být lepším antioxidantem. Poté je možné určit metodu na stanovení antioxidační kapacity. Je prokázáno, že v řadě případů korelují např. s lipoperoxidací nebo s metodou DPPH (1).

2.2.3. HPLC metoda s elektrochemickou detekcí

Metoda HPLC umožňuje analyzovat komplexní směsi a identifikovat v nich jednotlivé účinné antioxidační komponenty na základě hodnoty potenciálu aplikovaného na elektrodu. Hodnocení antioxidačních vlastností látek pomocí této metody koreluje např. s metodou DPPH (1).

2.3. Metody užívané v hodnocení antioxidační aktivity tříslovin

Metody aplikované pro testování antioxidační aktivity extraktů vybraných tříslovinných drog *Rubi idaei folium*, *Rubi fruticosi folium*, *Fragariae folium* a *Agrimoniae herba* shrnuje tab. č. 1.

Tab.č.1: Přehled metod stanovení antioxidační aktivity

Metody	Citace literatury
DPPH	17, 76, 90, 93, 97, 102, 105, 106, 107, 108
ORAC	16, 26, 65, 69, 74, 77, 84, 101
FRAP	14, 70, 73, 76, 101, 108
TEAC	17, 93, 98, 101, 103, 105, 106, 108
Lipidová peroxidace	72, 76, 103, 104
Metoda založena na vychytávání OH [•]	15

3. Třísloviny

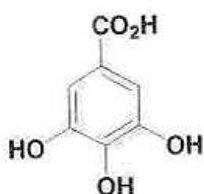
Třísloviny jsou rostlinné polyfenoly trpké, svíravé chuti, ve vodě rozpustné, slabě kyselé, s molekulovou hmotností 500-3000 D. Jsou rozlišovány dvě hlavní skupiny, kondenzované třísloviny a hydrolyzovatelné třísloviny, které se liší strukturou a biogenetickým původem (10, 11).

3.1. Hydrolyzovatelné třísloviny

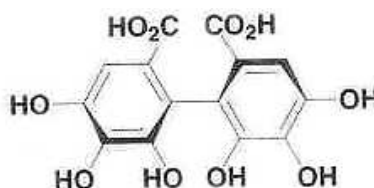
Hydrolyzovatelné třísloviny jsou estery cukrů (nejčastěji D-glukóza) a fenolických kyselin.

Pokud je glukóza esterifikována kyselinou galovou, vznikají *galotaniny*, pokud kyselinou hexahydroxydifenovou, jde o *elagotaniny*. Do této skupiny dále zahrnujeme *flavanoly*, *prokyanidiny* a *flavonoly*, které se označují jako modifikované elagotaniny vznikající navázáním derivátu fenylchromanu na základní strukturu.

Charakteristické jsou pro krytosemenné dvouděložné rostliny, zejména pro podtřídy *Rosidae*, *Dileniidae* a *Hammamelidae* (10).



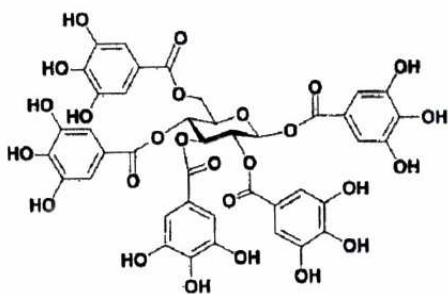
kyselina galová



kyselina hexahydroxydifenová

3.1.1. Struktura hydrolyzovatelných tříslovin

Kyselina galová vzniká šikimátovou cestou, přímou dehydrogenací kyseliny 3-dehydrošikimové nebo oxidací kyseliny protokatechové. Glukosylace se účastní uridinofosfátglukóza (UDP-Glc) za vzniku β -1-*O*-galoyl-D-glukózy a dalšími kroky vzniká 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoyl- β -D-glukóza, která je základní sloučeninou hydrolyzovatelných tříslovin (10).

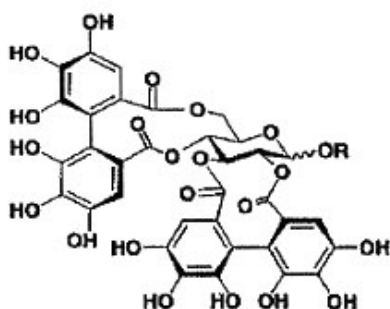


1,2,3,4,6-penta-*O*-galoyl- β -D-glukóza

3.1.2. Rozdělení

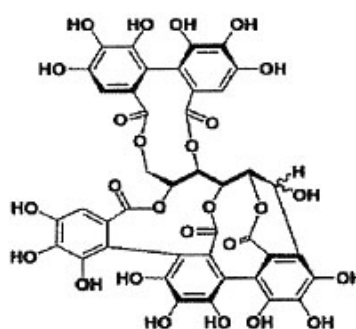
3.1.2.1. Monomerní hydrolyzovatelné třísloviny

Nejběžnější tříslovinou je pentaester 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoyl- β -D-glukózy, který hraje klíčovou roli v metabolismu tříslovin, jelikož většina rostlin tento ester snadno dále metabolizuje. Bočním řetězením, spojováním galoylových jednotek (tvorba elagotaninů), oxidací, otevřením nebo přeskupením cyklů vznikají monomerní třísloviny jako např. pedunkulagin, kasuariktin, potentilin nebo geraniin vyskytující se v čeledích *Fagaceae*, *Rosaceae*, *Myrtaceae* a *Theaceae* (10).



R = H; Pedunkulagin

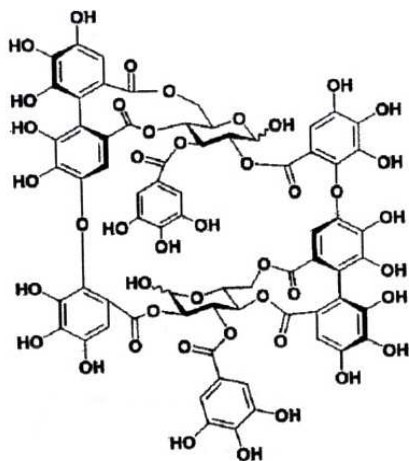
R = G, α ; Potentilin



Kastalagin

3.1.2.2. Oligomerní hydrolyzovatelné třísloviny

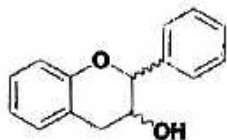
Tato velmi strukturálně rozmanitá skupina tříslovin o molekulové hmotnosti 2000-5000 D vzniká intermolekulárním oxidativním spojováním vazeb (C-C nebo C-O-C). Nacházejí se v dvouděložných rostlinách a jako první dimer byl popsán agrimoniin z čeledi *Rosaceae*. Mezi další oligomerní třísloviny patří např. oenothin (*Oenotheraceae*) nebo sanguin (*Rosaceae*) (10).



Oenothin B

3.2. Kondenzované třísloviny

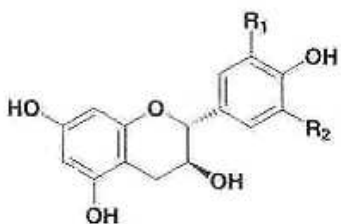
Kondenzované třísloviny se rozdělují na oligomení a polymerní proantokyanidiny a jsou tvořeny jednotkami flavan-3-olu spojené C-C vazbami. Vyskytují se ve všech skupinách rostlin, včetně nahosemenných rostlin a kaprad'orostech (10, 11).



Flavan-3-ol

3.2.1. Struktura kondenzovaných tříslovin

Základní strukturální jednotkou těchto polymerů je flavan-3-ol: katechin a epikatechin, galokatechin a epigalokatechin nebo fisetidin a méně běžné afzelechin a epiafzelechin. Flavan-3-oly vznikají v metabolismu flavonoidů 3-hydroxylací flavanonu za vzniku 2,3-dihydroflavon-3-olu a následnou redukcí až na flavan-3-ol (10).



2*R*, 3*S* řada: $R_1 = R_2 = H$; Afzelechin

$R_1 = OH$, $R_2 = H$; Katechin

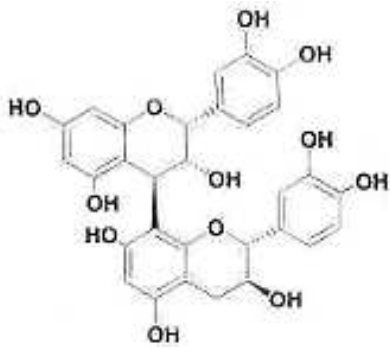
$R_1 = R_2 = OH$; Galokatechin

2*R*, 3*R* řada: (OH-3- α): Epiafzelechin, Epikatechin, Epigalokatechin

3.2.2. Rozdělení

3.2.2.1. Proantokyanidiny typu B (B-1, B-2, B-3 a B-4)

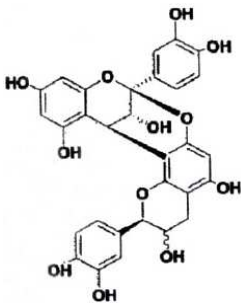
Tato skupina tříslovin patří mezi nejjednodušší dimery tvořené spojením jednotek (2*R*,3*S*)-(+)-katechinu a (2*R*,3*R*)-(-)-epikatechinu vazbou $C_4 \rightarrow C_8$ nebo spojením vždy jedné jednotky v α nebo β konfiguraci. Tyto protoantokyanidiny se vyskytují volně a jsou široce rozšířeny, např. v čeledích *Rosaceae*, *Theaceae*, *Hippocastanaceae* a *Lauraceae* (10).



Procyanidin B-1

3.2.2.2. Proantokyanidiny typu A

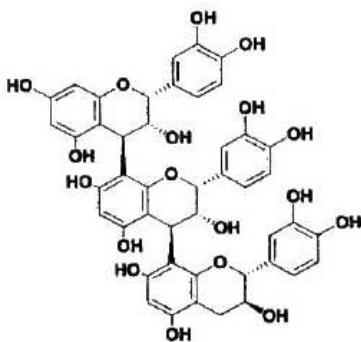
Tato skupina se skládá z dimerů s dvěma interflavanoidními vazbami ($C_4 \rightarrow C_8$ a $C_2 \rightarrow O \rightarrow C_7$). Nejznámější jsou aeskulitaniny nacházející se v osemení *Aesculus sp.* a v kůře skořicovníku čínského. Známé jsou také prokyanidin *O*- a *C*-glukosidy vyskytující se v *Rhei radix* a *Theae folium* (10).



Prokyanidin A

3.2.2.3. Oligomery

Oligomery jsou tvořeny postupným spojováním jednotek flavanu. Ve skupině B jsou známy např. C-1 trimery (tři molekuly epikatechinu spojené vazbami $4\beta \rightarrow 8$) a C-2 trimery (tři molekuly katechinu spojené vazbami $4\beta \rightarrow 8$) a odpovídající oligomery. Skupina A zahrnuje trimery a oligomery tvořené dimerem a 2 vazbami připojený monomer (10).



Epikatechin-($4\beta \rightarrow 8$)-epikatechin- ($4\beta \rightarrow 8$)-katechin (trimer)

3.2.2.4. Polymery

Polymery mohou obsahovat až 50 monomerních jednotek. Nejrozšířenější jsou polyepikatechiny a kopolymery prokyanidin-prodelphinidinu. Interflavanoidní vazba typu $C_4 \rightarrow C_8$ je vždy v poloze *trans*- k 3-hydroxylové skupině (10).

3.3. Fyzikálně-chemické vlastnosti

Podle míry polymerizace jsou třísloviny rozpustné ve vodě, v alkoholu a acetonu za tvorby koloidních roztoků. S těžkými kovy, bílkovinami a alkaloidy tvoří nerozpustné sloučeniny, odtud jejich použití jako antidota při otravách. Reakcí s železitými ionty vznikají sraženiny u hydrolyzovatelných tříslovin modročerného zbarvení, u kondenzovaných tříslovin zelenohnědého zbarvení. Třísloviny jsou látky velmi nestabilní, elagotaniny se při zahřátí s anorganickou kyselinou v organickém rozpouštědle přeměňují na sraženinu červené barvy.

Při kyselé hydrolyze hydrolyzovatelné třísloviny uvoňují cukr a kyselinu galovou nebo kyselinu hexahydroxydifenovou nebo obě. Kyselina hexahydroxydifenová se později přeměňuje na kyselinu elagovou. Hydrolyza oligomerů vede ke tvorbě sloučenin s třemi nebo čtyřmi aromatickými kruhy. U kondenzovaných tříslovin dochází ke štěpení vazeb mezi flavany.

Skládáním se kondenzované třísloviny oxidují na vysokomolekulární, biologicky neúčinné, hnědočerné produkty tzv. flobafeny (10, 11).

3.4. Biologické vlastnosti tříslovin

Základem farmaceutického využití tříslovin je jejich adstringentní působení, které vyplývá ze schopnosti tříslovin precipitovat bílkoviny za vzniku sloučenin odolných proti proteolytickým enzymům. Třísloviny a drogy je obsahující se tak používají při povrchových zraněních a popáleninách. Vzniklý ochranný povlak povrchově izoluje poškozenou tkáň, zmírňuje podráždění a zánět, vasokonstrikcí malých povrchových cév brzdí sekreci a urychluje tak regeneraci tkáně. V případě velkoplošných popálenin se třísloviny nesmějí používat pro jejich toxický účinek na jaterní buňky. Třísloviny jsou také účinné při zánětlivých onemocnění kůže, zánětech ústní dutiny a jícnu, hemoroidech, inhibují vznik zubního plaku a vnitřně působí proti nespecifickým průjmům. Bez ohledu na způsob podávání byly prokázány antibakteriální (G^- bakterie) a antimykotické účinky.

K dalším vlastnostem patří antioxidační účinky. Velké množství tříslovin působí jako vychytávače radikálů (zejm. superoxidového, hydroxylového a peroxylového radikálu),

které přeměňují reaktivní kyslík na stabilnější radikál. Příkladem toho je inhibice lipidové peroxidace, enzymů xantinoxidázy a 5-lipoxygenázy (geraniin, corylalin). Antihypertenzní účinek proantokyanidinů a elagotaninů se zakládá na inhibici angiotensin konvertázy (ACE). Inaktivací glukosyltransferázy bakterie *Streptococcus mutans* dochází k inhibici vzniku zubního plaku. Tento enzym katalyzuje tvorbu dextranů, které se usazují na zubech, a tím umožňují přichycení bakterie na hladký povrch zubu. Testy *in vitro* bylo prokázáno, že hydrolyzovatelné třísloviny a prokyanidiny inhibují reverzní transkriptázu, a tím replikaci viru *Herpes simplex* a jeho adsorpci na cílové místo. Tellimagrandin, agrimoniin a epigalokatechin galát prokázaly antimutagenní účinky inhibicí proteinkinázy C.

Toxické účinky po p.o. podání tříslovin nebyly prokázány (10, 11).

4. Druhy rodu *Rubus*, obsahové látky a využití

Tento rod zahrnující okolo 700 druhů je široce rozšířený po celém světě, obzvláště v mírných oblastech Severní polokoule. Některé druhy rodu *Rubus* jsou ceněné pro své plody a tradičně se využívají v terapii. Obsahovým látkám a účinkům je věnováno mnoho experimentálních studií.

Tradičním využitím tohoto rodu je léčba zánětů. Užívá se také při poraněních, popáleninách, vředových onemocnění, při léčbě průjmu, kolikové bolesti nebo *diabetes mellitus*. Byly prokázány antibakteriální, antimykotické a antioxidační účinky. Některé druhy rodu *Rubus* jsou základní součástí tradičních orientálních léků a používají se jako spasmolytika, antikonvulziva, myorelaxancia, analgetika a sedativa u symptomů spojených s nervovými poruchami (12).

Pro druhy rodu *Rubus* je typická schopnost syntetizovat a hromadit třísloviny, zejména dimerní elagotaniny. Obsahují minimálně 5% tříslovin. Hlavní skupina v *Rubus sp.* jsou hydrolyzovatelné třísloviny (galo- a elagotaniny) a antokyany. Z dalších látek byly identifikovány organické kyseliny, flavonoidy a triterpeny (10).

Vybrané druhy rodu *Rubus*

Rubus idaeus L., ostružiník malinový, maliník obecný, Rosaceae

Charakteristika rostliny

Maliník obecný je trvalý keř s plazivým kořenem, ze kterého vyrůstají dvouleté prýty, které jsou v prvním roce zpravidla nevětvené, řídce chlupaté nebo tence plsnaté. Ostny jsou roztroušené až shloučené nebo zcela chybějící rozmístěné po celém obvodu prýtu. Listy jsou opadavé, na řapíku mají slabé ostny. Rub listu je šedobíle plsnatý. Souplodí je kulovité, vejčité až mírně kuželovité, vyduté s četnými peckovičkami snadno se oddělující od lůžka (13).

Kvete v květnu a červnu a sbíranou částí je list (*Folium rubi idaei*) a plod (*Fructus rubi idaei*) (14).

Obsahové látky

Listy obsahují značné množství tříslovin, flavonoidy, antokyany, organické kyseliny a poměrně velké množství vitamínu C (15). Obsah kyseliny askorbové v listech *R. idaeus* se uvádí v rozmezí 16,8 - 39,8 mg/100 g (15, 16).

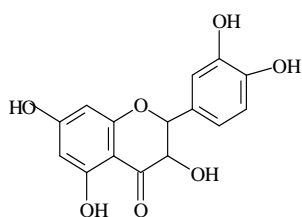
Fenolické kyseliny

V extraktu z plodů *R. idaeus* (100 g) byly identifikovány tyto fenolické kyseliny. Kyselina kávová (35 μg), kyselina chlorgenová (24,9 μg), kyselina p-kumarová (3676,7 μg), kyselina ferulová (55,6 μg), kyselina gentisová (136,8 μg), kyselina sinapová (24,9 μg), kyselina galová (1126,0 μg) a kyselina elagová a její konjugáty. Kyselina elagová prokázala vysokou karcinogenní aktivitu (17, 18).

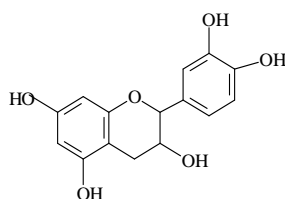
Flavonoidy

V extraktu z plodů *R. idaeus* (100 g) byly identifikovány tyto flavonoidy: chrysin (104,0 μg), galangin (7,2 μg), hesperetin (212,1 μg), kempferol (98,3 μg), naringenin (252,5 μg) a kvercetin (87,5 μg) (17).

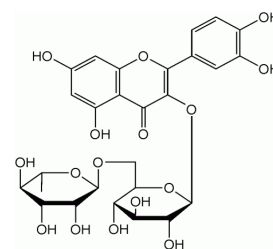
Z listů *R. idaeus* byly izolovány kvercetin, kempferol a jejich konjugáty a rutin v množství 0,11 mg/1 g suchých listů (18, 19, 20).



kvercetin



kemferol



rutin

Anthokyany

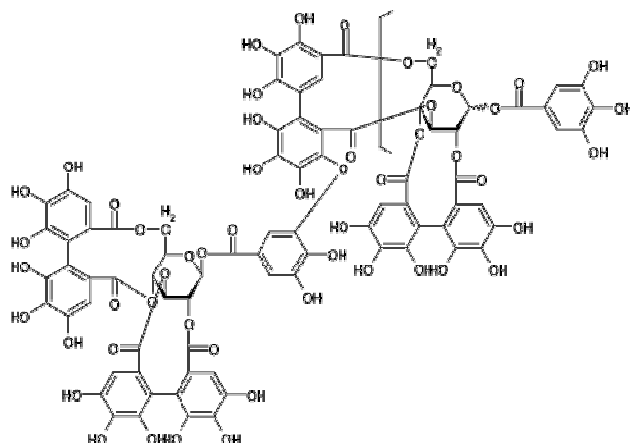
1 g čerstvých plodů obsahoval $0,65 \pm 0,03$ mg antokyanů, z toho 89,25% kyanidin-3,5-diglukosidu a 10,75% kyanidin-3-glukosidu (20).

Hlavními antokyaniny, které byly izolovány z extraktu z plodů *R. idaeus*, byly kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-soforosidy, kyanidin-3-(2^G-glukosyl-rutinosid), kyanidin-3-rutosid, pelargonidin a jeho glykosidy (21).

Extrakty z plodů pěstovaných kultur *R. idaeus* obsahovaly kyanidin-3-glukosid v rozmezí od 1,3 mg do 49,1 mg/100 g plodů (15).

Třísloviny

V plodech maliníku bylo identifikováno velké množství tříslovin. Majoritní tříslovinou byl sanguin H-6, zodpovědný za 30 % antioxidační aktivitu, dále byly identifikovány sanguin H-10, lambertianin C, nobotanin A a sanguisorboyl (18).



sanguin H-6

Ostatní látky

Semena maliníku, žluté barvy s nepatrným rybím zápachem, obsahují přibližně 10,7 % oleje tvořeného z 93,7 % neutrálními lipidy, 3,5 % fosfolipidy a 2,7 % volnými mastnými kyselinami. Dále bylo identifikováno 0,73 - 1,10 % fytosterolu a různé množství tokoferolů, která uvádí tabulka č. 2. Hlavním tokoferolem byl γ -tokoferol, který je důležitý stejně jako α -tokoferol v prevenci degenerativních onemocnění (22).

Tab.č.2: Obsah vitamínu E (mg/100 g) v oleji ze semen *R.idaeus* (22)

	α -tokoferol	γ -tokoferol	δ -tokoferol
Olej extrahovaný hexanem	71 \pm 0,5	272 \pm 2,6	17,4 \pm 0,5
Olej za studena lisovaný	46,1 \pm 2,2	144 \pm 11,7	7,1 \pm 0,7

Jak je vidět z následujícího přehledu (Tab.č. 3), je zajímavé také složení mastných kyselin v oleji ze semen maliníku (23).

Tab.č.3: Složení a množství mastných kyselin v oleji z maliníkových semen

Mastné kyseliny	Surový olej	Neutrální lipidy	Volné mastné kyseliny	Fosfolipidy
Frakce (%)		93,7 \pm 2,0	3,5 \pm 1,13	3,5 \pm 1,13
C16:0	2,69 \pm 0,14	2,68	1,46	10,92
C18:0	0,97 \pm 0,01	1,02	1,26	-
C18:1	11,99 \pm 0,01	12,11	26,62	19,24
C18:2	54,52 \pm 0,1	55,12	47,28	63,55
C18:3	29,11 \pm 0,05	28,74	14,353	6,29

Použití:

Maliník je hospodářsky nejvýznamnější druh *Rubus sp.* u nás. Jeho plody se konzumují jako pochutina, dále se z nich vyrábí marmelády, džemy, kompoty, limonády a malinová šťáva, která se využívá mimo jiné ve farmaceutickém průmyslu (13). Plody byly doporučovány pro své potopudné účinky při horečkách (24).

Mladé sušené listy maliníku se užívají samostatně nebo ve směsi s listy jiných rostlin jako čajovina. Pro své adstringentní účinky se vodný nálev z maliníkových listů používal v lidové medicíně jako kloktadlo při zánětech ústní dutiny, průjmech, hemeroidech, zánětlivých stavech žaludku a střev. Je součástí žlučopudných a močopudných čajových směsí, jako spazmolytikum tlumí křeče, kolikové a menstruační bolesti a způsobuje relaxaci hladkého svalstva dělohy. Má antibakteriální účinky a využíval se k „čištění krve“ i jako antidiabetikum. (10, 23, 24)

Olej ze semen může být použit do kosmetických přípravků, zubních past, krémů pro prevenci podráždění pleti, olejových koupelí, do krémů po holení, antiperspirantů, šampónů a pomád na rty díky svým protizánětlivým účinkům (22).

Rubus fruticosus L., ostružiník křovitý, Rosaceae

Charakteristika rostliny

Ostružina je dvouletá nebo víceletá rostlina s poléhavými lodyhami, které jsou květonosné. Lodyhy mají obvykle ostny, listy jsou na lici krátce chlupaté, na rubu běloplstnaté, řapíky má rovněž ostnitě. Plodem je ostružina, složená z malých peckoviček, v době zralosti černá.

Kvete v červnu a červenci a sbíranou částí je list (*Folium rubi fruticosi*) (14).

Obsahové látky

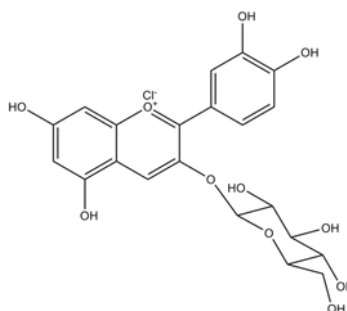
Listy obsahují zejména třísloviny (10 % galotaninů, katechin, epikatechin), dále flavonoidy (glykosidy kvercetinu) (25), antokyany, stopy silice a organické kyseliny (13, 14).

Celkové množství fenolů v plodech ostružiníku je 9,8 mg/g (26).

Kyanidin-3-glukosid byl primárním antokyanem získaným z plodů ostružiníku (87,5 %), dalšími antokyany byly kyanidin-3-xylosid, kyanidin-3-(600-malonyl) glukosid, kyanidin-3-dioxaloylglukosid, kyanidin-3-rutosid a malvidin-3-glukosid (26). Pěstované kultury *R. fruticosus* (100 g plodů) obsahovaly jako hlavní antokyanin kyanidin-3-glukosid v rozmezí od 125,6 mg do 152,2 mg (15).

Množství kyseliny askorbové v plodech *R.fruticosus* se udává v rozmezí 14,3 – 36,0 mg/100 g (15, 16).

Plody *R.fruticosus* obsahují cukry: 55-61 % glukózy, 22-29 % arabinózy, 13,8-15 % manózy, 0,65-1,2 % fruktózy, 0,5-0,8 % galaktózy, 0,5-0,8 % xylózy a 0,5 % rhamnózy (27).



kyanidin-3-glukosid

Použití:

Listy *R.fruticosus* mají adstringentní, diuretické a hypoglykémické účinky. Nálev připravený z listů ostružiníku se užíval při průjmech, žaludečních obtížích a také jako prostředek proti kašli. Zevně se používal jako kloktadlo při zánětech v ústní dutině, k přípravě koupelí při ekzémech a kožních nemocech nebo k obkladům při hemoroidech (10, 14).

Plody jsou pochutinou a mají povzbuzující a posilující účinek na organismus (24).

Rubus chamaemorus L., ostružiník moruška, Rosaceae

Ostružiník moruška je vytrvalá bylina bez ostnů s dlouhým plazivým rozvětveným oddenkem. Nevětvené lodyhy jsou hustě krátce pýřité. Souplodí peckoviček je kulovité, vyduté, za zralosti se dobře uvolňující od plodního lůžka. Peckovičky jsou nejdříve světle červené, pak žlutavě nebo červenavě oranžové až hnědavé, šťavnaté, příjemně nakyslé a aromatické. Nachází se hojně v zemích Severní Evropy, Asie a Ameriky, ale také i v Čechách, v Krkonoších (13).

Sbíranou částí je plod (*Fructus R. chamaemori*)

Plody mají antibakteriální účinky a jsou běžně konzumovány jako bohatý zdroj stopových prvků. Nálev z listů se užíval při průjmech (24).

Rubus ulmifolius Schott., ostružiník střeozemní, Rosaceae

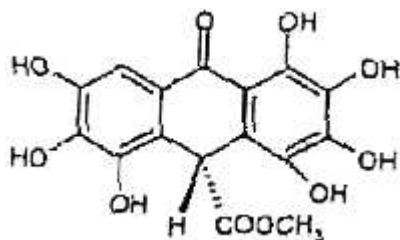
Ostružiník střeozemní se řadí mezi trvalé keře rostoucí v Africe a v Evropě od 1100 m n. m. Vysokoobloukovité prýty jsou ostře hranaté, žlábkované, fialově červené,

posléze stříbřitě šupinkaté, hustě hvězdčovitě chlupaté. Květenství je velmi ostnitě, plodní lůžko hustě chlupaté a souplodí je drobné, málo šťavnaté (13).

Sbíranou částí je plod (*Fructus R. ulmifolii*)

Čerstvé podrcené listy se používají jako lidový lék v Itálii při abscesech a vředech. Odvary z listů se používaly zevně na zčervenalé oči, afty, vaginální výplachy a vnitřně při průjmech, hemoroidech a střevních zánětech. V Chilské medicíně se uplatňoval při hypoglykémických stavech (24).

Z nadzemních částí tohoto keře byly izolované tři nové anthrony, rubanthron A, B a C. Rubanthron A působil proti *Staphylococcus aureus* (28). Dále byly izolovány kvercetin-3-O- β -D-glukuronid, kaempferol-3-O- β -D-glukuronid, kyselina galová, ferulová a tilirosid (29).



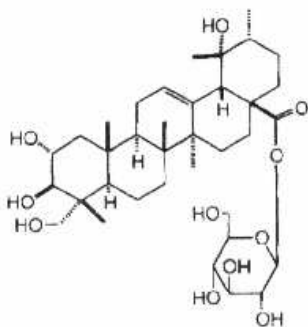
Rubanthron A

Rubus allegheniensis Port., ostružiník aleghenský, Rosaceae

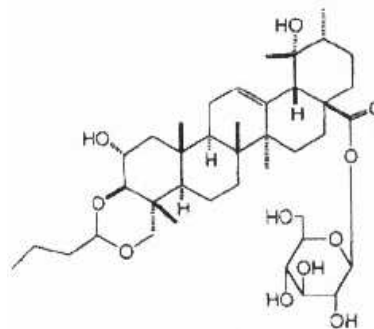
Prýty jsou vzpřímené, hranaté se žlábkovanými stranami, ostny jsou řídké roztroušené. Listy jsou na rubu sametově měkce chlupaté. Souplodí je jehlancovité nebo podlouhle válcovité, leskle černé, chutné, složené z četných peckoviček. Tento druh je rozšířen i u nás (13).

Sbíranou částí je plod (*Fructus R. allegheniensis*).

Z plodů byl identifikován nový triterpen, rubussid A, spolu s niga-ichigosidem F₁ (30).



Niga-ichigosid F₁



Rubussid A

Rubus laciniatus Willd., ostružiník dřípený, Rosaceae

Tento ostružiník má obloukovité prýty, hranaté, se stranami plochými nebo žlábkovanými, řídce odstále chlupaté a ostnitě. Rub listu je měkce chlupatý, souplodí podlouhlé, černé. Tento druh je rozšířen i u nás (13).

Sbíranou částí je plod (*Fructus R. laciniatii*).

V plodech *R. laciniatus* byl nalezen antokyanin, kyanidin-3-dioxalyl-glukosid (21).

Rubus occidentalis L., ostružiník ojíňený, Rosaceae

Prýty tohoto keře jsou vzpřímené, nebo vysokoobloukovité, lysé, voskovým povlakem bíle ojíňené, později často červenohnědě naběhlé. Ostny jsou řídké, krátké, na bázi rozšířené a strany smáčklé. Souplodí je ploše polokulovité, tmavě nachové až černé a velmi chutné (14).

Sbíranou částí je plod (*Fructus R. occidentalii*).

V plodech ostružiníku ojíňeném byly nalezeny kyanidin a jeho konjugáty a pelargonidin-3-rutinosid (31).

Další druhy rodu Rubus

Rubus imperialis Cham. & Schltdl., Rosaceae

Rubus imperialis rostoucí hojně v jižní Brazílii je často používán jako tradiční lék při *diabetes mellitus* a bolesti (24).

Z plodů byl izolován nigaichigosid F₁ (32).

Rubus apelatus Poir., Rosaceae

V jižní Ugandě je používán proti průjmům a žaludečním bolestem (24).

Rubus coreanus Miquel., ostružiník korejský, Rosaceae

V Korei a Číně jsou nezralé plody tradičně využívány při léčbě impotence, samovolné ejakulaci (poluce), pomočování, astmatu, alergických onemocnění, také se používá jako stomachikum, tonikum a při léčbě *diabetes mellitus* (24).

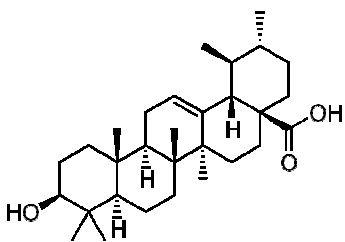
Z plodů *R. coreanus* byly izolovány nigaichigosid F₁ a 23-hydroxytormentilová kyselina (33).

Rubus chingii Hu., Rosaceae

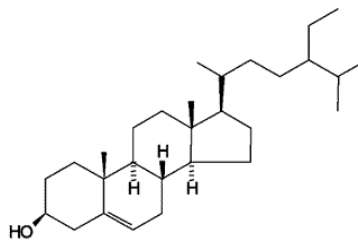
“*Wu-zi-yan-zong-wan*”, vícesložkový tradiční čínský lék s dlouhou historií používající se jako tonikum, obsahuje plody *R. chingii*. Tradičně je indikován při ledvinové

nedostatečnosti, zpomaluje proces stárnutí a snižuje alkoholem indukovanou hepatotoxicitu.

Z plodů byly izolovány kyseliny ursolová, 2 α -hydroxyursolová a β -sitosterol (24).



kyselina ursolová



β -sitosterol

Rubus suavissimus S. Lee, Rosaceae

Tento jednoletý keř je široce rozšířený v jihozápadní Číně. Listy jsou hojně používány v horských oblastech Guangxi jako čaj (sladký listový čaj). Studie ukazují, že obyvatelé zde žijící jsou zdravější a méně se u nich vyskytuje rakovina a jiná vážná onemocnění (24).

Rubus sanctus Schreb., Rosaceae

Nadzemní části tohoto druhu rostoucí divoce v Egyptě obsahují doposud neznámý přírodní elagotanin, 2,3-*O*-hexahydroxydifenoyl-4,6-*O*-sanguisorboyl-(α,β)-glukosid (34).

R.aleaefolius Poir., Rosaceae

Z tohoto druhu byly izolovány dva nové elagotaniny: rubuphenol a sanguin H-2 ethyl ester, spolu s kyselinou elagovou, ethyl galátem, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoyl- β -D-glucopyranózou a 1,2,3,6-tetra-*O*-galoyl- β -D-glucopyranózou (35).

Rubus lambertianus Ser., Rosaceae

V listech *R.lambertianii* byly nalezeny nové elagotaniny, dimery lambertianinu A a B, trimer lambertianinu C a tetramer lambertianinu D (12).

Z nadzemních částí **Rubus coriifolius Focke** byly izolovány (-)-epikatechin, (+)-katechin, hyperin, nigaichigosid F₁, β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranosid a kyseliny galová a elagová (36).

Nově byly izolovány triterpenoidy, stigmasta-5,22-dien-3-ol, β -sitosterol a β -sitosterol-3 β -D-glukosid z **Rubus ursinus L.** (37).

Z kořenů **Rubus crataegifolius Bunge** byl izolován crataegiosid (ilexosapogenin A ester 28-*O*- β -D-glucopyranosylu) (38).

V **Rubus sieboldii Blume** byla identifikována kyselina tormentilová a euskafiková (39).

Farmakologická aktivita

Antioxidační aktivita

Plody *R. idaeus*, *R. occidentalis*, *R. fruticosus*, hybridní kultura maliníku a ostružiníku, *R. laciniatus* a *R. ursinus* ukázaly významnou antioxidační aktivitu, zejména díky vysokému obsahu fenolických sloučenin a antokyanům. Nejvyšší aktivitu měl ostružiník ojíňený (40).

Vysokou antioxidační aktivitu proti superoxidu, peroxidu vodíku, hydroxylovému radikálu a singletového kyslíku prokázaly plody *R. idaeus* a *R. occidentalis* (41).

Extrakt z plodů *R. chingii* bránil působení terc-butyl hydroperoxidu, který indukuje oxidativní poškození a byl také schopný zmírňovat cytotoxicitu dalších oxidantů (42).

Působením fenolických sloučenin nacházejících se v rodu *Rubus*, se zvyšuje ochrana proti lipidové a proteinové oxidaci. Např. elagotanin sanguin H-6 byl hlavní sloučeninou zvyšující antioxidační kapacitu plodů *R. idaeus*. Ostružníková šťáva z plodů *R. fruticosus* obsahovala kyanidin-3-O-glukosid a „vychytávač“ peroxydusitanu, které měly ochranný efekt proti endoteliární dysfunkci a cévním poruchám indukovaných peroxydusitanem (43).

Protizánětlivá aktivita

Extrakty z plodů *R. idaeus* inhibovaly enzymy s elastázovou aktivitou ovlivňující zánětlivé procesy aktivované neutrofilními granulocyty (41). Protizánětlivá aktivita oleje ze semen *R. idaeus* byla patrná při prevenci gingivitid, ekzémů a dalších kožních problémech (23).

Etanolvý extrakt z plodů *R. coreanus* byl zkoumán *in vitro* pro jeho účinek na osteoblastické MC3T3-E1 buňky a ukázalo se, že osteoblastické působení u *R. coreanus* může vést k prevenci osteoporózy a zánětlivých onemocnění kostí (44). Extrakt také potlačoval produkci oxidu dusnatého a prostaglandinu E₂ v lipopolysacharidy stimulovaných RAW 264,7 myších makrofázích a byl potenciálním induktorem hemové oxygenasy-1 (45). Také redukoval faktor revmatoidní artritidy a faktor C-reaktivního proteinu v *in vivo* zkouškách (33).

Z rostliny *R. sieboldii* byly izolovány triterpenoidy kyselina tormentilová a euskafiková s protizánětlivou aktivitou (39).

Protinádorová aktivita

Současné studie ukazují potenciální chemopreventivní aktivitu rodu *Rubus*.

Vodný extrakt z plodů *R. coreanus* inhiboval buněčnou proliferaci a stimuloval apoptózu HT-29 buněk (46). Metanolový extrakt z čerstvé rostliny *R. coreanus* významně inhiboval faktor cévního endoteliálního růstu (47). Plody *R. idaeus* bohaté na polyfenoly vykazovaly cytotoxickou aktivitu proti citlivé leukemické HL 60 buněčné linii (48) a inhibovaly proliferaci lidských buněk způsobující rakovinu děložního čípku (HeLa) v *in vitro* testech (21). Plody *R. chingii* významně inhibovaly růst hormon-senzitivních a hormon-dependentních nádorů prostaty a metanolový extrakt z kořenů *R. crataegifolius* byl silným induktorem proliferace buněk způsobujících nádor prsu (49, 52).

Studiemi *in vitro* bylo zjištěno, že extrakt z plodů *R. occidentalis* má antiangiogenetické vlastnosti v nově vzniklé fibrinové sraženině. Extrakt kompletně inhiboval angiogenetický cévní růst (52). Vodné extrakty z listů *R. suavissimus* inhibovaly iniciaci angiogeneze i následný růst nových cév u vzorků, které již měly zahájenou angiogenetickou odpověď (51).

Elagotaniny, rubufenol a sanguinin H-2 ethyl ester, izolované z *R. aleaefolius*, inhibovaly buněčnou progresi tumorových buněk v G₀/G₁ fázi s hodnotou MIC 7,9 μM a 6,6 μM (36). Antitumorové účinky také ukázaly triterpenoidy, stigmasta-5,22-dien-3-ol, β-sitosterol a β-sitosterol-3β-D-glukosid izolované z plodů *R. ursinus* a *R. fruticosus* (37, 38).

Protiinfekční aktivita

Extrakt z plodů *R. idaeus* vykazoval významnou antibakteriální aktivitu proti *Bacillus subtilis* a jen nepatrnou proti *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *E. coli* a *Candida albicans*. Proti *Aspergillus niger* byl neúčinný (53).

Extrakt z plodů *R. chamaemorus* měl antibakteriální aktivitu proti *S. epidermidis* a *Bacillus subtilis*, nepatrnou aktivitu proti *S. aureus*, *Micrococcus luteus* a *E. coli*. Antimykotická aktivita tohoto extraktu proti *Candida albicans* nebyla prokázána, avšak proti tomuto druhu kvasinky aktivitu vykazoval extrakt z listů *R. chamaemorus*, který působil také proti gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím (53, 54) a vykazoval amebostatickou aktivitu proti rodu *Acanthamoeba* (akantaméba) způsobující granulomatózní zánět mozku, akantamébovou keratitidu a zánět plic (55).

Biologická aktivita proti lidským patogenům *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* a *Candida albicans* byla nalezena u extraktu z rostliny *R. apellatus* (56).

Metanolový extrakt z *R. rigidus* (Afrika) inhiboval aktivitu enzymu HIV-1 reverzní transkriptázy (57) a vodný extrakt z *R. coreanus* byl aktivní proti viru hepatitidy B (58).

Giardia lamblia je střevní parazit způsobující prudké zapáchající průjmy u člověka. Proti tomuto parazitu působil extrakt z nadzemních částí *R. coriifolius* a dále také vykazoval aktivitu proti *Entamoeba histolyca* způsobující náhlé krvavé průjmy. Zodpovědný za tyto účinky je pravděpodobně (-)-epikatechin (36, 59).

Hypoglykémické účinky

Mezi rozšířené užití některých druhů rodu *Rubus* patří hypoglykémický účinek, který zkoumali Jouad et al. u vodných extraktů z listů *R. fruticosus* na zdravých potkanech a na potkanů s *diabetes mellitus*. U obou skupin potkanů mělo jednorázové i opakované p.o. podání extraktu za následek významný pokles hladiny glukózy v krvi (60).

Hypoglykémický účinek měly také metanolové extrakty z nadzemních částí *R. imperialis* (61).

Spasmolytické účinky

Jak je již známo, v tradičním léčitelství se maliník obecný používal pro své spasmolytické účinky jako relaxant dělohy, tlumil kolikové a menstruační bolesti. Tento účinek byl testován na střevě pokusného králíka. V metanolovém extraktu z listů *R. idaeus* byly identifikovány triterpenické glykosidy a sitosterol s touto aktivitou (22, 62, 63).

5. *Fragaria vesca* L., obsahové látky a využití

Fragaria vesca L., jahodník obecný, Rosaceae

Charakteristika rostliny

Lodyha jahodníku je přímá, bezlistá, v dolní části hustě chlupatá, listy trojčetné, v přízemní růžici. Květní stopky jsou přitiskle chlupaté. Souplodí (jahoda) je kulovité až kuželovité, krvavě červené, aromatické, snadno opadavé a lysé. Nažky jsou na vrcholu protažené ve zřetelný zobánek, rovnoměrně rozložené na povrchu jahody (13).

Tato vytrvalá bylina kvete v květnu a září a sbíranou částí je list (*Folium fragariae*) (14).

Obsahové látky

Jahodník je světově rozšířený a jeho plody jsou významným zdrojem minerálních prvků a vysokého množství antioxidantů. Jejich obsah úzce souvisí se zráním ovoce (64). 1 g plodů *Fragaria vesca* obsahoval 5,32 mg fenolických sloučenin, pěstované jahody obsahovaly 3,5 mg fenolů v 1g plodů (65). Ve 100 g jahodového džemu bylo nalezeno 58-136 mg celkových fenolů (66). Jahodové pyré připravené z dužiny obsahovalo významné množství antokyanů, p-kumaroyl glykosidů a kyseliny askorbové. Obohacením pyré o nažky vzrostlo množství derivátů kyseliny elagové, proantokyanů a celkových fenolů. Po skladování při teplotě 6°C a 22°C po 8 a 16 týdnech množství kyseliny askorbové a antokyanů rapidně kleslo. Antioxidační aktivita se příliš neměnila (73).

Fenolické kyseliny

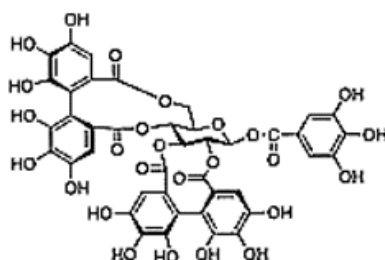
V plodech *Fragaria vesca* byly identifikovány kyselina elagová a p-kumarová a jejich konjugáty (67, 68). Kyselina elagová a její konjugáty byly také izolovány z nažek jahod *Fragaria ananassa* (69).

100 g jahodového džemu obsahovalo 0,4-2,9 mg volné kyseliny elagové a 0,17-29,5 mg kyseliny elagové a její konjugáty (66).

Třísloviny

Třísloviny patří k hlavním obsahovým látkám jahodníku. Listová droga obsahuje minimálně 8 % tříslovin. V kořenu se nachází převážně kondenzované třísloviny a v listech hydrolyzovatelné třísloviny (pedunkulagin a agrimoniin) (10).

Plody *Fragaria ananassa* a jeho nažky obsahují elagotaniny a galotaniny (69, 70). Po požití 250 g čerstvých jahod bylo detekováno 2,8 % metabolitů elagotaninů v moči dobrovolníků (71).



pedunkulagin

Antokyany

V 1 g čerstvých plodů jahodníku bylo nalezeno 5,32 mg antokyanů na 1 g čerstvých plodů (65) a mezi hlavní patřily kyanidin a pelargonidin a jejich konjugáty (67, 68, 70, 72). Hlavním antokyanem v plodech *Fragaria ananassa* byl pelargonidin-3-glukosid, zatímco nažky obsahovaly téměř stejné množství kyanidin-3-glukosidu a pelargonidin-3-glukosidu (69).

V jahodovém džemu byly antokyany detekovány jen ve velmi malém množství (66).

Flavonoidy

V plodech a listech *Fragaria vesca* byly identifikovány převážně flavonoidy kvercetin a kempferol (67, 68). Glykosidy kempferolu byly hlavním flavonoidem zastoupeným v 100 g jahodového džemu v množství 0,38-1,05 mg a glykosidy kvercetinu byly přítomny v množství 0,14-1,2 mg (66).

Tradiční použití:

List jahodníku má mírně svíravé a protizánětlivé účinky, proto se používal vnitřně jako dezinficiens a roborans při zánětech střešní sliznice spojených s průjmy a při chorobách ledvin a ledvinových kamencích. Zevně se jahodníková droga užívala jako dermatologikum v obkladech při krvácivých hemoroidech, mokvajících ranách, ke kloktání při zánětech ústní dutiny a při zápachu z úst. List jahodníku je také vhodný do čajových směsí, avšak jeho používání v lékařství je považováno za zastaralé (10, 14).

Plody jahodníku jsou potenciálním zdrojem přírodních antioxidantů. Pro velký obsah antokyanů se ukazuje jejich prospěšný efekt v prevenci kardiovaskulárních onemocnění, zánětlivých a různých degenerativních onemocnění (74).

Farmakologická aktivita:

Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivitu plodů jahodníku (*Fragaria ananassa*) významně ovlivňují polyfenoly (fenolické kyseliny, flavonoidy, antokyany a třísloviny) a kyselina askorbová přispívající k antioxidační aktivitě z 24 %, zatímco elagotaniny a antokyany se podílejí z 19 % a 13 % (67). Zejména antokyany obsažené v plodech jahodníku významně snižují oxidačním stresem indukovanou neurotoxicitu (75). Nažky z *Fragaria ananassa*, které tvořily 1% hmotnosti plodů, obsahovaly 11 % fenolických sloučenin a jejich podíl na antioxidační aktivitě jahod byl 14 % (69).

Antioxidační aktivita vůči DPPH^{*} v 100 g plodů jahodníku (*Fragaria veirginia* var. *camarosa*) byla ekvivalentní 183 mg vitaminu C a 483 mg vitaminu E (76).

Antioxidační kapacita jahodových džemů vyjádřená v mmol BHT (butylhydroxytoluen) se měnila od 0,55 do 0,76 mmol BHT/g (66).

Zhang et al. studovali antioxidační aktivitu pomocí metody TEAC, jak plodů jahodníku, tak i polyfenolů z nich izolovaných. Byly zjištěny tyto hodnoty: antioxidační aktivita plodů jahodníku byla 62,9 mM Troloxu/mg, kyanidin-3-glukosidu 7,156 mM Troloxu/mg, pelargonidinu 4,922 mM Troloxu/mg a pelargonidin-3-rutosidu 5,514 mM Troloxu/mg (68).

Wang SY et al. použili metodu ORAC pro stanovení antioxidační aktivity u *R. fruticosus*, *Fragaria X ananassa*, *R. idaeus* a *R. occidentalis*. Ostružiník a jahodník měly nejvyšší antioxidační aktivitu během růstové fáze, zatímco nejvyšší antioxidační aktivitu u maliníku měly zralé plody. Se stářím listů se celkový obsah fenolických látek snižoval, u plodů mělo jejich stáří vliv na snižující se množství antokyanů. U čerstvých plodů se antioxidační aktivita pohybovala v rozmezí 7,8 - 33,7 μM (TE)/g, u suchých plodů 35,0-162,1 μM (TE)/g. U čerstvých listů byla naměřena antioxidační aktivita v rozmezí 69,7 - 182,2 μM (TE)/g a u suchých listů v rozmezí 205,0-728,8 μM (TE)/g (77).

Ukázalo se, že vlastnosti a antioxidační aktivita plodů jahodníku jsou také z velké míry ovlivněny jeho genetickým původem (78).

Antiproliferativní aktivita

Extrakty z plodů osmi různých odrůd jahodníku (Earliglow, Annapolis, Evangeline, Allstar, Sable, Sparkle, Jewel a Mesabi) významně inhibovaly proliferaci HepG(2)

lidských jaterních rakovinových buněk. Nejvyšší antiproliferativní aktivitu a obsah antioxidantů měla kultura Earliglow (79).

Extrakty z čerstvých plodů jahodníku a sloučeniny z nich izolované (polyfenoly) inhibovaly růst lidských rakovinových buněk ústní dutiny (CAL-27, KB), střev (HT-29, HCT-116), žaludku, prsu (MCF-7) a prostaty (LNCaP, DU145) s rozdílnou citlivostí pozorovanou mezi buněčnými liniemi a také byla prokázána jejich protizánětlivá aktivita inhibicí COX-2 (68, 70, 80). Plody pěti odrůd jahodníku prokázaly inhibiční efekt na rakovinné buňky HT-29 v rozmezí 41-63% (průměr 53%) a 26-56% (průměr 43%) na rakovinné buňky MCF-7 (81).

Extrakty z listů maliníku (*Rubus idaeus*) a jahodníku (*Fragaria ananassa*) vykazovaly vysokou cytotoxickou aktivitu jak proti senzitivní linii leukémických buněk HL60, tak i proti jeho MDR sublinii (82).

Extrakty z plodů *Fragaria ananassa* inhibovaly proliferaci lidských rakovinových buněk plicního epitelu buněčné linie A549 a snížily TPA-indukovanou neoplastickou transformaci myších epidermálních buněk JB6 P+ (83).

Cévní endoteliální růstový faktor (VEGF) hraje hlavní roli ve vaskularizaci tumoru. Extrakty ze semen maliníku a jahodníku významně inhibovaly jak H₂O₂, tak i TNF α indukovanou expresi VEGF lidských keratinocytů a působily tak antiangiogeneticky. Tento účinek byl způsobený flavonoidy (84).

Ateroskleróza

Extrakty z plodů variet jahod (Nohime, Kumure IH-1, Kumure 58) ukázaly významný antitrombotický efekt *in vitro* i po podání *in vivo*. Variety Kumure IH-1 a Kumure 58 významně působily snížení rizika vzniku endoteliální dysfunkce (fáze aterosklerózy) (85).

Plody jahod obsahující významné množství fenolických látek pomáhaly snižovat riziko kardiovaskulárních onemocnění inhibicí oxidace LDL-cholesterolu, podporovaly stabilitu krevních destiček, zlepšovaly vaskulární endoteliární funkci, snižovaly tendenci vzniku trombóz a také ovlivňovaly průběh zánětlivé reakce (72).

Vazodilatační účinky

Vazodilatační potenciál vodných extraktů listů jahodníku (*Fragaria vesca*) byl srovnáván s vazodilatační aktivitou vodného extraktu listů s květy hlohu (*Crataegus oxyacantha* L.) na izolovaných aortálních kroužcích krys. Oba extrakty vyvolaly obdobnou vazodilataci. Extrakt z listů jahodníku vyvolal 72,2 \pm 4,4 % relaxaci, extrakt z listů hlohu

81,3 ± 4,5 % relaxaci. Dalšími experimenty bylo zjištěno, že vodný extrakt z listů *Fragaria vesca* je přímým, na endotelium působícím vazodilatátorem, jehož působení je zprostředkováno NO a produkty COX a jehož účinek je podobný účinku vodného extraktu hlohu (86).

Protiinfekční aktivita:

Lyofylizáty získané z plodů *Fragaria ananassa* prokázaly účinek proti *Staphylococcus aureus* a *Salmonella enterica*. Na inhibici těchto G+ a G- bakterií se zvláště podílely elagotaniny (87).

Další vlastnosti

Mnoho prací je věnováno podmínkám skladování a zajištění kvality čerstvých plodů. Jak se ukazuje, ovlivněny jsou nejen senzorycké vlastnosti, ale také obsahové látky.

Plody odrůd jahodníku (Northeast a Earliglow) byly skladovány při teplotě 3°C po dobu 20 dní v běžných podmínkách a v ovzduší obsahující 20 % CO₂. V normálním ovzduší byla koncentrace fenolických sloučenin a antioxidační aktivita vyšší, zatímco koncentrace kyseliny dehydroaskorbové vzrostla v podmínkách s vyšším CO₂ (88).

Při zpracování plodů jahodníku na džus a pyré došlo jak k poklesu množství fenolických sloučenin obsažených v plodech, tak i k poklesu antioxidační aktivity, s výjimkou tepelného ošetření, kdy došlo k nárůstu antioxidační aktivity vlivem tvorby vedlejších produktů s antioxidační aktivitou (89).

Působením látek thymolu, eugenolu a mentholu, obsažených v silicích rostlin byla prodloužena doba skladování plodů *Fragaria ananassa*. Thymol významně ovlivňoval kvalitu jahod, menthol a eugenol potlačovaly fungální růst. Ošetřené jahody měly vyšší obsah cukrů, organických kyselin, fenolů, antokyanů a flavonoidů. Silice také zvýšily antioxidační a antiproliferační aktivitu (inhibice HT-29 buněčné proliferace) (90).

Ošetřením plodů jahod *Fragaria vesca* 2-nonanem (antifungální nestálá sloučenina přirozeně se vyskytující v jahodách) během skladování ve stálém prostředí při teplotě 10°C a 22°C bylo zabráněno růstu plísně *Botrytis cinerea* a také ztrátě obsahu antokyanů (91).

6. Agrimonia eupatoria L., obsahové látky a využití

Agrimonia eupatoria L., řepík lékařský, Rosaceae

Charakteristika rostliny

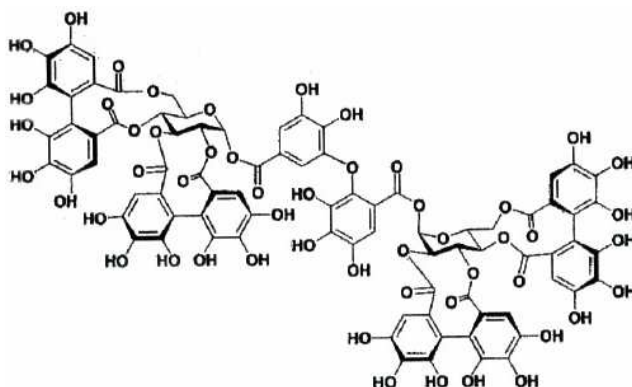
Řepík lékařský je vytrvalá bylina s přímou, jednoduchou nebo chudě větvenou lodyhou, na které jsou listy zejména v dolní části. Listy jsou lichozpeřené, na rubu šedo- až běloplstnaté a lístky hlavních jařem jsou ostře špičaté a pilovité. Zlatožluté květy jsou uspořádány v konečných klasovitých hroznech, které jsou většinou 50květé. Zralé češule jsou obráceně kuželovité, přitiskle chlupaté s háčky (13).

Kvete od června do září a sbíranou částí je nať (*Herba Agrimoniae*) (14).

Obsahové látky:

Nať obsahuje převážně třísloviny (min. 5%) a flavonoidy. Charakteristický je výskyt agrimoniinu (10).

V 1 g extraktu bylo nalezeno 2,3 - 8,3 mg fenolů (92). Celkový obsah tříslovin v nati *Agrimonia eupatoria* může dosáhnout až 10,08 %, množství flavonoidů 0,33 % a fenolických kyselin až 2,26 %. Mezi dominantní fenolické kyseliny patří p-hydroxybenzoová, protokatechová, vanilová a chlorogenová kyselina. Mezi hlavní flavonoidy patří luteolin a jeho glykosidy, apigenin glukosid, akacetin glukosid, kvercetin, kempferol a jejich glykosidy (10, 93, 94, 95). V *Agrimonia eupatoria* byly dále identifikovány flavan-3-oly (katechin, prokyanidiny a epikatechin-epikatechin-katechin) (93).



Agrimoniin

Farmakologická aktivita

Řepík lékařský má adstringentní, protizánětlivé a diuretické účinky, působí protiprůjmově a dezinfekčně při infekcích močových cest a jater. Vnitřně se užíval jako

stomachikum a cholagogum, při poruchách trávení a látkové výměny, zevně se používá jako adstringens při silné rýmě k výplachu nosu, ke kloktání při zánětech dutiny ústní, k obkladům při kožních odřeninách, hemoroidech, žilní nedostatečnosti (pocitu těžkých nohou) a jako přísada do koupele při kožních onemocněních (10, 14, 96).

Antioxidační aktivita

Flavonoidy a fenolické kyseliny obsažené v extraktu z nati řepíku lékařského ukázaly významnou antioxidační aktivitu. Extrakt velmi rychle reagoval s radikálem DPPH, superoxidovým, peroxylovým, hydroxylovým, hydroxyperoxidovým radikálem, kyselinou chlornou a peroxyinitrem (97, 98).

Protizánětlivá aktivita

U prokyanidinů, kemferol-3-O-(6"-O-p-kumaroyl)-glukosidu a kvercetin glykosidů byla prokázána protizánětlivá aktivita (93).

Antivirová aktivita

Vodný výluh nati *Agrimonia eupatoria* inhiboval povrchový antigen viru hepatitidy typu B. Výluh připravovaný při teplotě 60°C vykazoval nejvyšší aktivitu. Inhibiční aktivita extraktu se také měnila v závislosti na době sběru nati, nejvyšší byla v červenci. Inhibice byla zjištěna i u *Agrimonia pilosa* a *Agrimonia coreana pilosella* (99).

Hypoglykémická aktivita

Účinky extraktu nati *Agrimonia eupatoria* na glukózovou homeostázu byly studovány u zdravých a nemocných myších. Podání řepíku lékařského vedlo ke snížení stupně hyperglykémie u krys s diabetem (100).

7. Experimentální část

7.1. Rostlinný materiál

List ostružiníku, list maliníku, list jahodníku a nať řepíku byly zakoupeny v prodejně léčivých rostlin, dodavatel Natura Děčín.

7.2. Chemikálie

Chemikálie použité pro stanovení superoxidu:

Hydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema, ČR

Hydroxid draselný p.a., Lachema, ČR

5-methylfenaziniummethylsulfát Sigma Aldrich (St. Luis, MO, USA)

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

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

Chemikálie použité pro stanovení DPPH*

2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl Sigma Aldrich (St. Luis, MO, USA)

Methanol p.a, Penta, ČR

7.3. Standardy

Epigallokatechingalát - EGCG (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Německo)

(-)-epikatechin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Německo)

(+)-katechin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Německo)

7.4. Přístrojové vybavení

Analytické váhy KERN, Německo

Laboratorní váhy KERN, Německo

Ultrazvuková lázeň Bendelin Sonorex, Fisher Scientific, ČR

Mikrodávkoč BIOHIT, Fisher Scientific, ČR

Dvoupaprskový UV-VIS spektrofotometr UV 1601 Shimadzu, Japonsko

Lyofilizátor MLW – LGA 05, Medizintechnik Leipzig, Německo

7.5. Příprava výluhu z drogy

3,0 g drogy *Rubus idaeus* jsem v baňce přelila 500 ml vroucí vody. Baňku jsem přikryla hodinovým sklíčkem a nechala 30 min vyluhovat, poté jsem výluh zfiltrovala.

Výluh byl vysušen lyofilizací a nadále uchováván v exikátoru. Stejný postup jsem použila u extraktů z drog *Rubus fruticosus*, *Fragaria vesca* a *Agrimonia eupatoria*.

7.6 Zhášení superoxidového radikálu

Superoxidový radikál byl generován reakcí 5-methylfenaziniummethylsulfátu (PMS) a nikotinamidadeninudinukleotidu (NADH).

7.6.1. Příprava činidel pro stanovení antioxidační aktivity

Všechna činidla byla připravena v den měření.

Pufr KH_2PO_4 19 mM, pH 7,4:

2,6 g KH_2PO_4 jsem rozpustila ve vodě a doplnila do objemu 1000,0 ml. pH 7,4 jsem upravila na pHmetru postupným přidáváním 1M roztoku hydroxidu draselného.

Roztok NADH 166 μM :

Navázila jsem 7,0 mg NADH do 10,0 ml kalibrované zkumavky, doplnila puforem a roztok jsem nechala 10 minut rozpouštět v ultrazvukové lázni. Poté jsem zkumavku zabalila do alobalu a dala do ledu.

Roztok NBT 43 μM (Nitrotetrazolová modř):

3,3 mg látky jsem rozpustila v 50,0 ml pufru. Roztok jsem uchovávala v alobalu obalené Erlenmayerově baňce.

Roztok PMS 2,7 μM (N-methylphenazonium methylsulfát):

Navázila jsem 0,01 g látky a rozpustila v 1,0 ml pufru. Poté jsem vypočítala, v jakém množství tohoto roztoku je obsažen 1,0 mg PMS a odpovídající objem roztoku jsem převedla do ependorfky a doplnila do 1,0 ml pufru. Z tohoto roztoku jsem odměřila 250 μl , převedla do alobalu obalené Erlenmayerovy baňky a doplnila ho puforem do objemu 50,0 ml.

7.6.2. Vzorek hodnocené drogy

Ve 4 ml pufru KH_2PO_4 jsem rozpustila 0,0202 g lyofylizátu *Rubi idaei folium*. Ve stejném množství pufru jsem rozpustila 0,010 g lyofylizátu *Agrimoniae herba*. Pro rozpuštění 0,0040 g lyofylizátu *Rubi fruticosi folium* a pro 0,0080 g lyofylizátu *Fragariae folium* jsem použila 10 ml pufru KH_2PO_4 . Roztoky jsem vždy přefiltrovala a pro následné měření je ředila.

7.6.3. Roztoky standardů

Jednotlivě jsem v 10 ml pufru rozpustila 0,002 g EGCG, 0,012 g (-)-epikatechinu a 0,012 g (+)-katechinu. Pro další měření jsem roztoky dále ředila.

7.6.4. Měření antioxidační aktivity

7.6.4.1. Antioxidační aktivita kontrolního vzorku

Nejprve jsem zjišťovala aktivitu kontrolního vzorku. Do kyvety jsem postupně odměřovala roztoky v následujícím pořadí:

Slepý kontrolní vzorek:

150 μ l roztoku pufru KH_2PO_4 19 mM, pH 7,4

150 μ l roztoku NADH 166 μ M

450 μ l roztoku NBT 43 μ M

150 μ l roztoku pufru KH_2PO_4 19 mM, pH 7,4

Kontrolní vzorek:

150 μ l roztoku pufru KH_2PO_4 19 mM, pH 7,4

150 μ l roztoku NADH 166 μ M

450 μ l roztoku NBT 43 μ M

150 μ l roztoku PMS 2,7 μ M

Měření jsem prováděla vždy třikrát, a to ihned po přidání PMS u kontrolního vzorku.

Absorbanci jsem změřila po 2 minutách ve dvoupráskovém spektrofotometru nastaveném na kinetickou funkci, při vlnové délce 560 nm, při pokojové teplotě.

7.6.4.2. Antioxidační aktivita vzorků

Následně jsem měřila aktivitu vzorků. Odměření roztoků do kyvet jsem připravila slepý vzorek a vzorek stanovené drogy dle uvedeného pořadí:

Slepý vzorek:

150 μ l roztoku vzorku

150 μ l roztoku NADH 166 μ M

450 μ l roztoku NBT 43 μ M

150 μ l roztoku pufru KH_2PO_4 19 mM, pH 7,4

Vzorek:

150 µl roztoku vzorku

150 µl roztoku NADH 166 µM

450 µl roztoku NBT 43 µM

150 µl roztoku PMS 2,7 µM

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

Aktivitu standardů jsem měřila za stejných podmínek jako aktivitu vzorku.

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

Inhibici redukce NBT jsem vypočítala podle vzorce:

$$\% \text{ inhibice redukce NBT} = \left(1 - \frac{A_v}{A_k} \right) \cdot 100$$

kde:

A_v ... nárůst absorbance vzorku v čase $t = 2$ min

A_k ... nárůst absorbance kontrolního vzorku v čase $t = 2$ min

Výsledky měření aktivity pro drogu *Rubii idaei folium* jsou uvedeny v tabulkách č. 20, 21, 22 a grafu č. 1.

Výsledky měření aktivity pro drogu *Rubii fruticosii folium* jsou uvedeny v tabulkách č. 23, 24, 25 a grafu č. 2.

Výsledky měření aktivity pro drogu *Fragariae folium* jsou uvedeny v tabulkách č. 26, 27, 28 a grafu č. 3.

Výsledky měření aktivity pro drogu *Agrimoniae herba* jsou uvedeny v tabulkách č. 29, 30, 31 grafu č. 4.

Jako porovnávací látky byly použity EGCG, (-)-epikatechin a (+)-katechin. Výsledky uvádí tabulky č. 32 – 40 a grafy č. 5 - 7.

Hodnotu IC_{25} u jednotlivých vzorků jsem odečetla z grafu.

7.7. Zhášení radikálu DPPH

7.7.1. Příprava základního roztoku DPPH

0,05 g DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) 90% jsem rozpustila v 25,0 ml methanolu a pro úplné rozpuštění jsem roztok nechala 5 minut v ultrazvukové lázni. Po ochlazení jsem doplnila objem do 25,0 ml methanolem a takto připravený roztok jsem uchovávala v lednici.

V každém dni měření jsem změřila absorbanci (při $\lambda = 517$ nm) kontrolního vzorku proti methanolu. Kontrolní vzorek byl tvořen 0,2 ml základního roztoku DPPH a 4,8 ml methanolu. Vzorek jsem nechala 30 min stát ve tmě a poté jsem změřila jeho absorbanci.

7.7.2. Vlastní vzorek

0,005 g lyofylovaného vzorku (*Rubii idaei folium*, *Rubii fruticosii folium*, *Fragariae folium*, *Agrimoniae herba*) jsem rozpustila v 10,0 ml methanolu, roztok jsem přefiltrovala a vzorek dále ředila.

7.7.3. Roztoky standardů

Jednotlivě 0,005 g EGCG, 0,005 g (-)-epikatechinu a 0,005 g (+)-katechinu jsem rozpustila v 10,0 ml methanolu a pro další měření jsem roztoky dále ředila.

7.7.4. Stanovení antiradikálové aktivity

Do 5,0 ml odměrných baněk jsem odměřila methanолоvé vzorky jednotlivých výluhů drog a standardů v množství od 0,05 do 0,55 ml, přidala jsem 0,2 ml základního roztoku DPPH a doplnila do objemu 5 ml methanolem. Odměrné baňky jsem nechala ve tmě po dobu 30 minut. Poté jsem změřila jejich absorbanci při vlnové délce 517 nm proti slepému vzorku – methanolu.

Z naměřených hodnot jsem vypočítala procento redukce DPPH podle vzorce:

$$\% \text{ redukce DPPH} = \left(1 - \frac{A_v}{A_k}\right) \cdot 100 \quad \text{kde, } A_v = \text{absorbance vzorku}$$

A_k = absorbance kontrolního vzorku

Výsledek měření pro drogu *Rubii idaei folium* je uveden v tab. č. 41 a grafu č. 8.

Výsledek měření pro drogu *Rubii fruticosii folium* je uveden v tab. č. 42 a grafu č.9.

Výsledek měření pro drogu *Fragariae folium* je uveden v tab. č. 43 a grafu č. 10.

Výsledek měření pro drogu *Agrimoniae herba* je uveden v tab. č. 44 a grafu č. 11.

Jako porovnávací látky byly použity EGCG, (-)-epikatechin, (+)-katechin. Výsledky uvádí tabulky č. 45 – 47 a grafy č. 12 - 14.

Ze směrnice přímký jsem vypočítala hodnotu IC_{50} u jednotlivých vzorků.

8. Výsledky

8.1. Zhášení superoxidového radikálu

8.1.1. Aktivita vzorku *Rubi idaei folium*

Tab.č.20: Vzorek č.1

I. RUBUS IDEAEUS		navážka m = 0,0202 g				
		Antiradikálová aktivita jednotlivých koncentrací vzorku				
KONTROLA		420µg/ml	230µg/ml	105µg/ml	53µg/ml	26µg/ml
0,244		0,01	0,059	0,113	0,086	0,214
0,244	0,243	0,017	0,057	0,058	0,244	0,216
0,242		0,007	0,055	0,093	0,103	0,194
	průměr	0,011	0,057	0,088	0,144	0,208
	NBT (%)	95,34	76,58	63,84	40,68	14,52

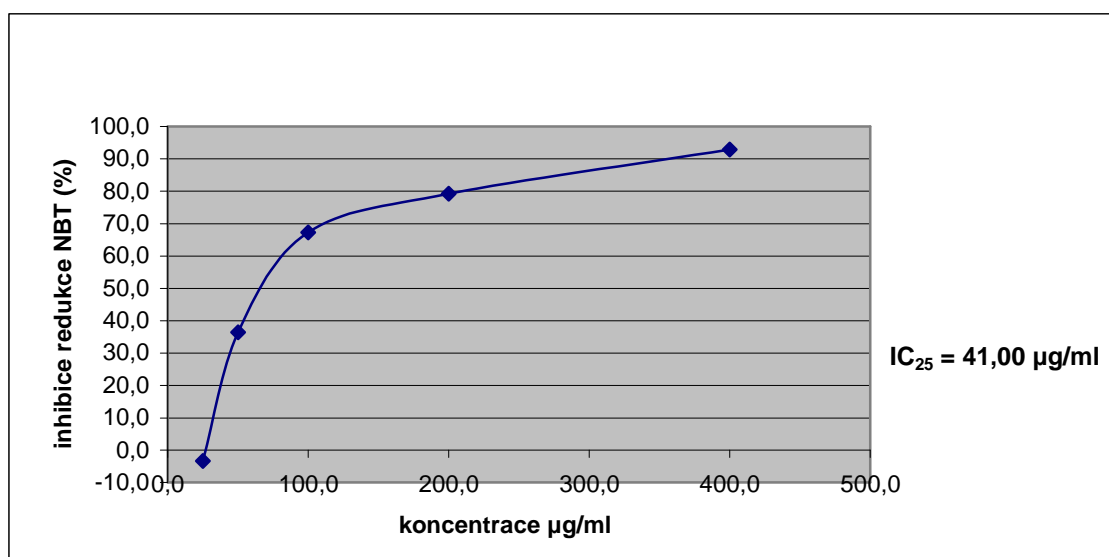
Tab.č.21: Vzorek č.2

II. RUBUS IDEAEUS		navážka m = 0,0202 g				
		Antiradikálová aktivita jednotlivých koncentrací vzorku				
KONTROLA		420µg/ml	230µg/ml	105µg/ml	53µg/ml	26µg/ml
0,172		0,014	0,029	0,044	0,105	0,230
0,161	0,164	0,017	0,032	0,052	0,109	0,194
0,160		0,016	0,028	0,048	0,120	0,174
	průměr	0,016	0,030	0,048	0,111	0,199
	NBT (%)	90,47	81,95	70,79	32,25	-21,30

Tab.č.22: Průměrné hodnoty inhibice redukce NBT

koncentrace µg/ml	420µg/ml	230µg/ml	105µg/ml	53µg/ml	26µg/ml
inhibice redukce NBT %	92,90	79,26	67,31	36,47	-3,389
směrodatná odchylka	2,438	2,686	3,478	4,217	17,909

Graf č.1: Vliv extraktu *Rubi idaei folium* na inhibici redukce NBT



8.1.2. Aktivita vzorku *Rubi fruticosi folium*

Tab.č.23: Vzorek č.1

I. RUBUS FRUTICOSUS		navážka m = 0,004 g				
		Antiradikálová aktivita jednotlivých koncentrací vzorku				
KONTROLA		200µg/ml	100µg/ml	75µg/ml	50µg/ml	37,5µg/ml
0,231		0,027	0,053	0,116	0,118	0,148
0,214	0,214	0,035	0,051	0,106	0,126	0,130
0,198		0,020	0,058	0,104	0,106	0,150
	průměr	0,027	0,054	0,109	0,117	0,143
	NBT (%)	87,25	74,81	49,30	45,57	33,44

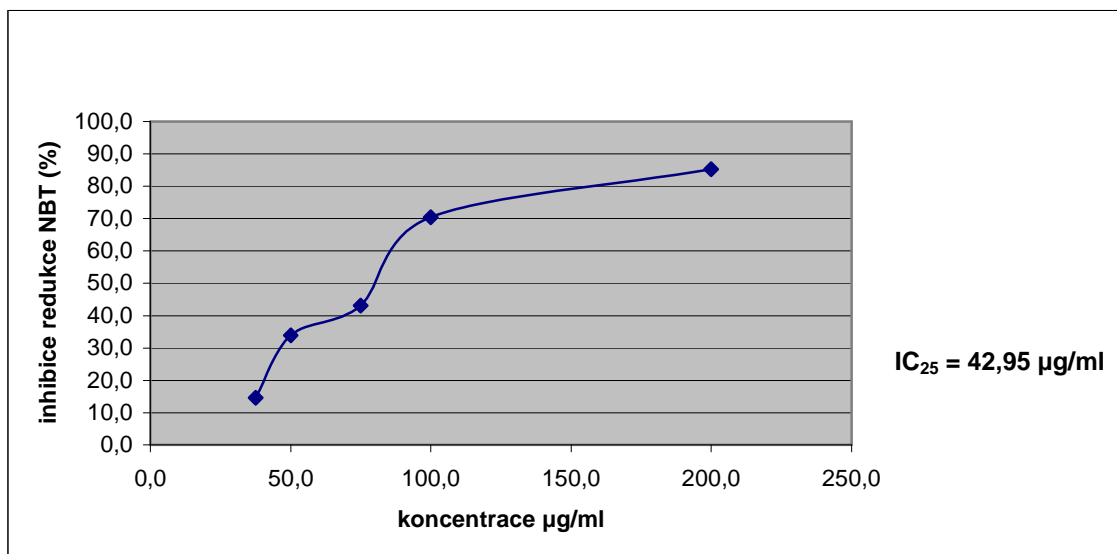
Tab.č.24: Vzorek č.2

II. RUBUS FRUTICOSUS		navážka m = 0,004 g				
		Antiradikálová aktivita jednotlivých koncentrací vzorku				
KONTROLA		200µg/ml	100µg/ml	75µg/ml	50µg/ml	37,5µg/ml
0,178		0,024	0,058	0,134	0,133	0,174
0,168	0,170	0,032	0,053	0,118	0,128	0,158
0,165		0,029	0,063	0,070	0,136	0,200
	průměr	0,028	0,058	0,107	0,132	0,177
	NBT (%)	83,37	65,95	36,99	22,31	-4,11

Tab.č.25: Průměrné hodnoty inhibice redukce NBT

koncentrace µg/ml	200µg/ml	100µg/ml	75µg/ml	50µg/ml	37,5µg/ml
inhibice redukce NBT %	85,31	70,38	43,14	33,94	14,66
směrodatná odchylka	1,941	4,428	6,157	11,629	18,773

Graf č.2 Vliv extraktu *Rubi fruticosi folium* na inhibici redukce NBT



8.1.3. Aktivita vzorku *Fragariae folium*

Tab.č.26: Vzorek č.1

I. FRAGARIA VESCA		navážka m = 0,008 g					
		Antiradikálová aktivita jednotlivých koncentrací vzorku					
KONTROLA		200µg/ml	100µg/ml	70µg/ml	50µg/ml	25µg/ml	10µg/ml
0,253		0,051	0,074	0,103	0,148	0,229	0,230
0,250	0,254	0,053	0,077	0,095	0,137	0,213	0,232
0,258		0,043	0,065	0,110	0,145	0,215	0,227
	průměr	0,049	0,072	0,103	0,143	0,219	0,230
	NBT (%)	80,68	71,62	59,53	43,50	13,67	9,46

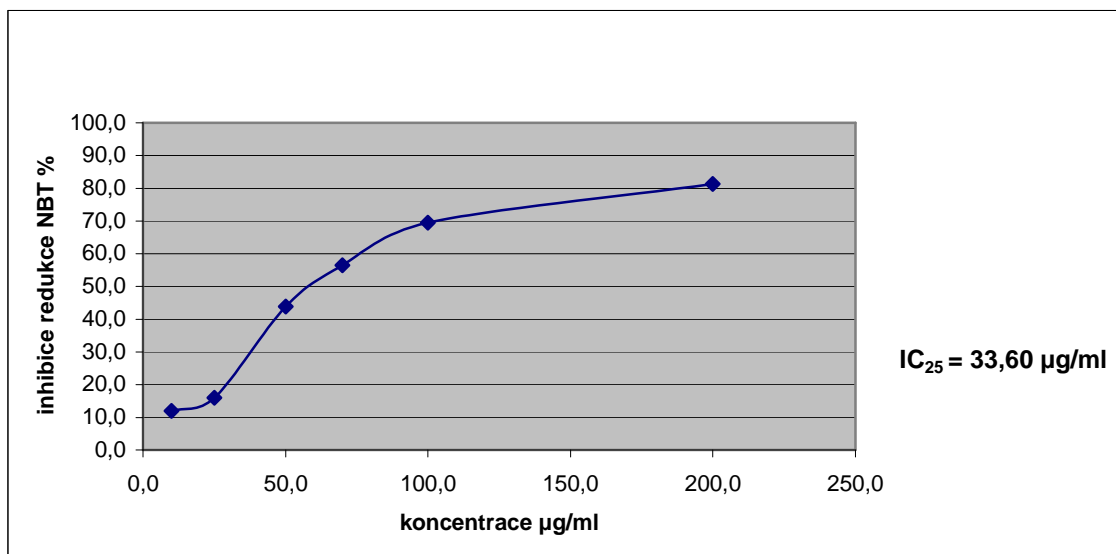
Tab.č.27: Vzorek č.2

II. FRAGARIA VESCA		navážka m = 0,008 g					
		Antiradikálová aktivita jednotlivých koncentrací vzorku					
KONTROLA		200µg/ml	100µg/ml	70µg/ml	50µg/ml	25µg/ml	10µg/ml
0,363		0,060	0,114	0,160	0,209	0,293	0,316
0,347	0,352	0,071	0,116	0,160	0,185	0,298	0,302
0,347		0,060	0,114	0,171	0,195	0,271	0,284
	průměr	0,064	0,115	0,164	0,196	0,287	0,301
	NBT (%)	81,93	67,46	53,55	44,28	18,45	14,66

Tab.č.28: Průměrné hodnoty inhibice redukce NBT

koncentrace µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	70 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml	10 µg/ml
inhibice redukce NBT %	81,31	69,54	56,54	43,89	16,06	12,06
směrodatná odchylka	0,623	2,081	2,990	0,390	2,391	2,601

Graf č.3: Vliv extraktu *Fragariae folium* na inhibici redukce NBT



8.1.4. Aktivita vzorku *Agrimoniae herba*

Tab.č.29: Vzorek č.1

I.AGRIMONIA EUPATORIA		navážka m = 0,0100 g				
		Antiradikálová aktivita jednotlivých koncentrací vzorku				
KONTROLA		625µg/ml	312,5µg/ml	156,3µg/ml	78,13µg/ml	39,1µg/ml
0,158		0,021	0,049	0,053	0,107	0,179
0,184	0,175	0,015	0,048	0,055	0,112	0,180
0,184		0,007	0,049	0,086	0,101	0,224
	průměr	0,014	0,049	0,065	0,107	0,194
	NBT (%)	91,83	72,24	63,12	39,16	-10,84

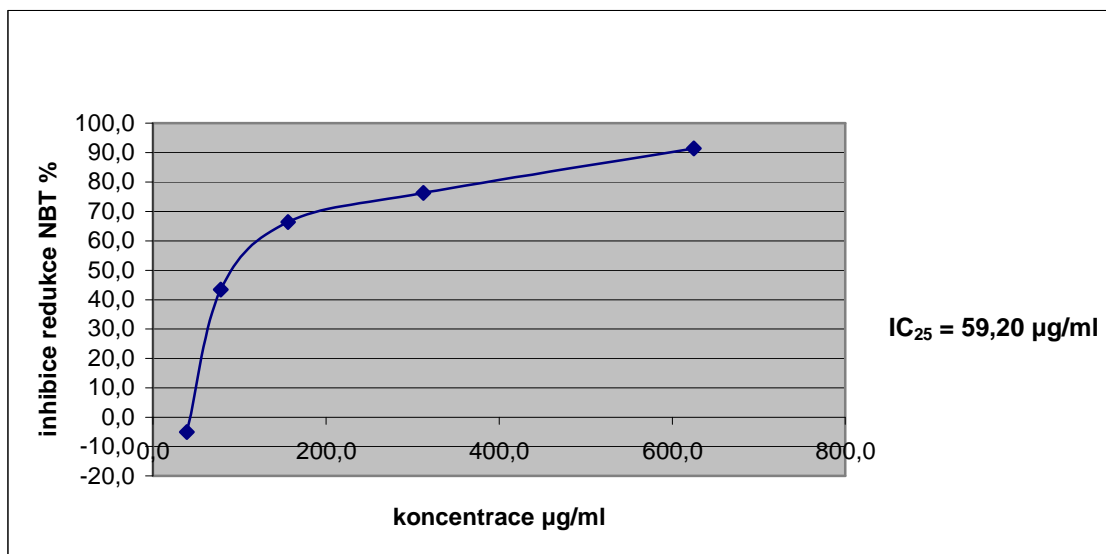
Tab.č.30: Vzorek č.2

II.AGRIMONIA EUPATORIA		navážka m = 0,0100 g				
		Antiradikálová aktivita jednotlivých koncentrací vzorku				
KONTROLA		625µg/ml	312,5µg/ml	156,3µg/ml	78,13µg/ml	39,1µg/ml
0,143		0,022	0,030	0,046	0,097	0,156
0,174	0,166	0,011	0,032	0,049	0,082	0,168
0,182		0,012	0,036	0,056	0,082	0,172
	průměr	0,015	0,033	0,050	0,087	0,165
	NBT (%)	90,98	80,36	69,74	47,70	0,60

Tab.č.31: Průměrné hodnoty inhibice redukce NBT

koncentrace µg/ml	625µg/ml	312,5µg/ml	156,3µg/ml	78,13µg/ml	39,1µg/ml
inhibice redukce NBT %	91,40	76,30	66,43	43,43	-5,12
směrodatná odchylka	0,422	4,059	3,311	4,266	5,719

Graf č.4: Vliv extraktu *Agrimoniae herba* na inhibici redukce NBT



Standardy

8.1.5. Aktivita epigalokatechin galátu

Tab.č.32: Vzorek č.1

I. EPIGALOKATECHIN GALÁT		navážka m = 0,002 g					
		Antiradikálová aktivita jednotlivých koncentrací vzorku					
KONTROLA		100µg/ml	50µg/ml	25µg/ml	12,5µg/ml	6,25µg/ml	3,13µg/ml
0,130		0,027	0,056	0,065	0,103	0,134	0,180
0,158	0,149	0,022	0,046	0,071	0,108	0,123	0,156
0,158		0,013	0,044	0,070	0,084	0,104	
		0,021	0,049	0,069	0,098	0,120	0,168
	NBT (%)	86,10	67,26	53,81	33,86	19,06	-13,00

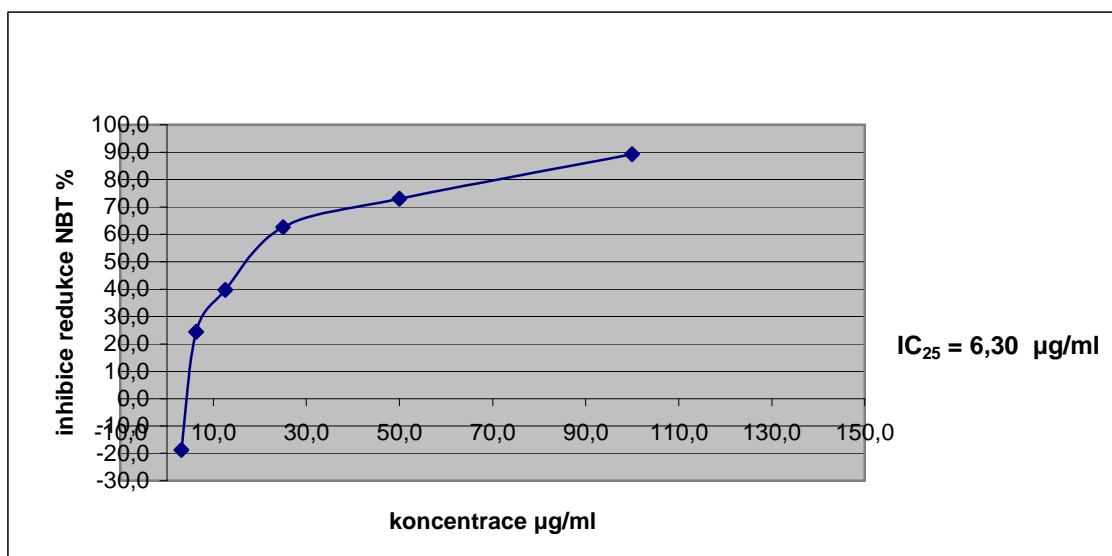
Tab.č.33: Vrozek č.2

II. EPIGALOKATECHIN GALÁT		navážka m = 0,002 g					
		Antiradikálová aktivita jednotlivých koncentrací vzorku					
KONTROLA		100µg/ml	50µg/ml	25µg/ml	12,5µg/ml	6,25µg/ml	3,13µg/ml
0,148		0,023	0,030	0,049	0,079	0,118	0,198
0,183	0,155	0,009	0,032	0,048	0,095	0,099	0,180
0,135		0,003	0,037	0,036	0,080	0,110	0,203
	průměr	0,012	0,033	0,044	0,085	0,109	0,194
	NBT (%)	92,49	78,76	71,46	45,49	29,83	-24,68

Tab.č.34: Průměrné hodnoty inhibice redukce NBT

koncentrace µg/ml	100µg/ml	50µg/ml	25µg/ml	12,5µg/ml	6,25µg/ml	3,13µg/ml
inhibice redukce NBT %	89,29	73,01	62,64	39,68	24,44	-18,84
směrodatná odchylka	3,195	5,745	8,824	5,819	5,385	5,837

Graf č.5: Účinek EGCG na redukcí NBT



8.1.6. Aktivita (-)-epikatechinu

Tab.č.35: Vzorek č.1

I. (-)-EPIKATECHIN		navážka m = 0,012 g					
		Antiradikálová aktivita jednotlivých koncentrací vzorku					
KONTROLA		1200µg/ml	600µg/ml	300µg/ml	150µg/ml	75µg/ml	37,5µg/ml
0,269		0,032	0,055	0,093	0,151	0,155	0,201
0,232	0,249	0,032	0,071	0,119	0,147	0,158	0,216
0,246		0,032	0,052	0,100	0,161	0,164	0,186
	průměr	0,032	0,059	0,104	0,153	0,159	0,201
	NBT (%)	87,15	76,17	58,23	38,55	36,14	19,28

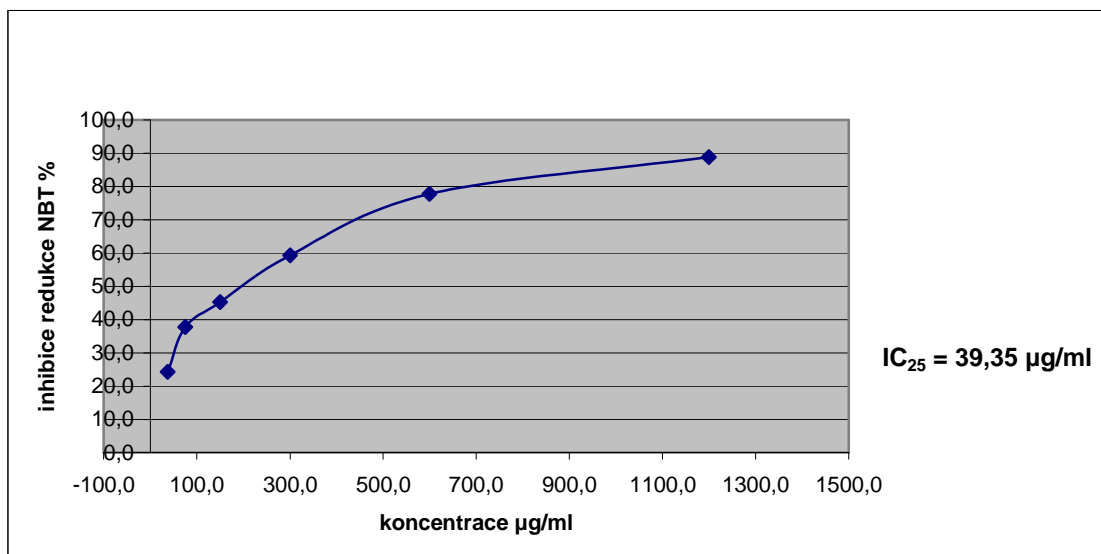
Tab.č.36: Vzorek č.2

II. (-)-EPIKATECHIN		navážka m = 0,012 g					
		Antiradikálová aktivita jednotlivých koncentrací vzorku					
KONTROLA		1200µg/ml	600µg/ml	300µg/ml	150µg/ml	75µg/ml	37,5µg/ml
0,269		0,022	0,049	0,099	0,115	0,155	0,174
0,232	0,249	0,031	0,049	0,095	0,125	0,152	0,186
0,246		0,018	0,056	0,102	0,119	0,146	0,168
	průměr	0,024	0,051	0,099	0,120	0,151	0,176
	NBT (%)	90,50	79,38	60,37	51,94	39,36	29,32

Tab.č.37: Průměrné hodnoty inhibice redukce NBT

koncentrace µg/ml	1200µg/ml	600µg/ml	300µg/ml	150µg/ml	75µg/ml	37,5µg/ml
inhibice redukce NBT %	88,82	77,78	59,30	45,25	37,75	24,30
směrodatná odchylka	1,673	1,606	1,071	6,693	1,606	5,020

Graf č.6: Účinek (-)-epikatechinu na redukci NBT



8.1.7. Aktivita (+)-katechinu

Tab.č.38: Vzorek č.1

I. (+)-KATECHIN		navážka m = 0,012 g					
		Antiradikálová aktivita jednotlivých koncentrací vzorku					
KONTROLA		1200µg/ml	600µg/ml	300µg/ml	150µg/ml	75µg/ml	37,5µg/ml
0,273		0,033	0,067	0,119	0,168	0,218	0,227
0,289	0,281	0,039	0,061	0,109	0,152	0,198	0,240
0,280		0,032	0,067	0,111	0,158	0,192	0,222
		0,035	0,065	0,113	0,159	0,203	0,230
	NBT (%)	87,65	76,84	59,74	43,23	27,79	18,17

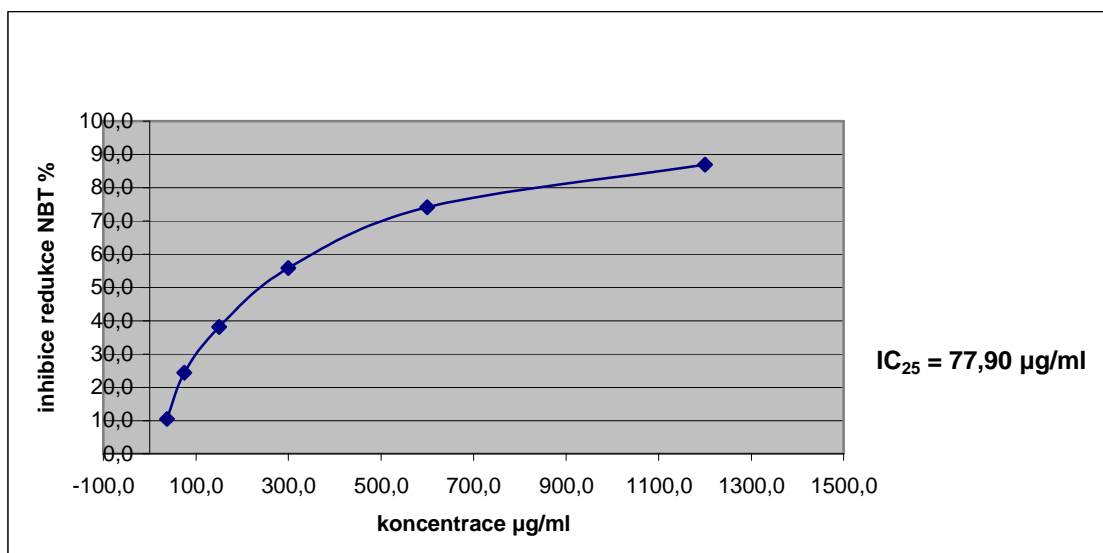
Tab.č.39: Vzorek č.2

I. (+)-KATECHIN		navážka m = 0,012 g					
		Antiradikálová aktivita jednotlivých koncentrací vzorku					
KONTROLA		1200µg/ml	600µg/ml	300µg/ml	150µg/ml	75µg/ml	37,5µg/ml
0,215		0,033	0,072	0,101	0,134	0,169	0,213
0,227	0,221	0,032	0,067	0,101	0,155	0,169	0,219
0,221		0,026	0,051	0,116	0,155	0,186	0,213
	průměr	0,030	0,063	0,106	0,148	0,175	0,215
	NBT (%)	86,27	71,34	52,04	33,03	20,97	2,71

Tab.č.40: Průměrné hodnoty inhibice redukce NBT

koncentrace µg/ml	1200µg/ml	600µg/ml	300µg/ml	150µg/ml	75µg/ml	37,5µg/ml
inhibice redukce NBT %	86,96	74,09	55,89	38,13	24,38	10,44
směrodatná odchylka	0,687	2,749	3,851	5,099	3,413	7,728

Graf č.7: Účinek (+)-katechinu na redukci NBT



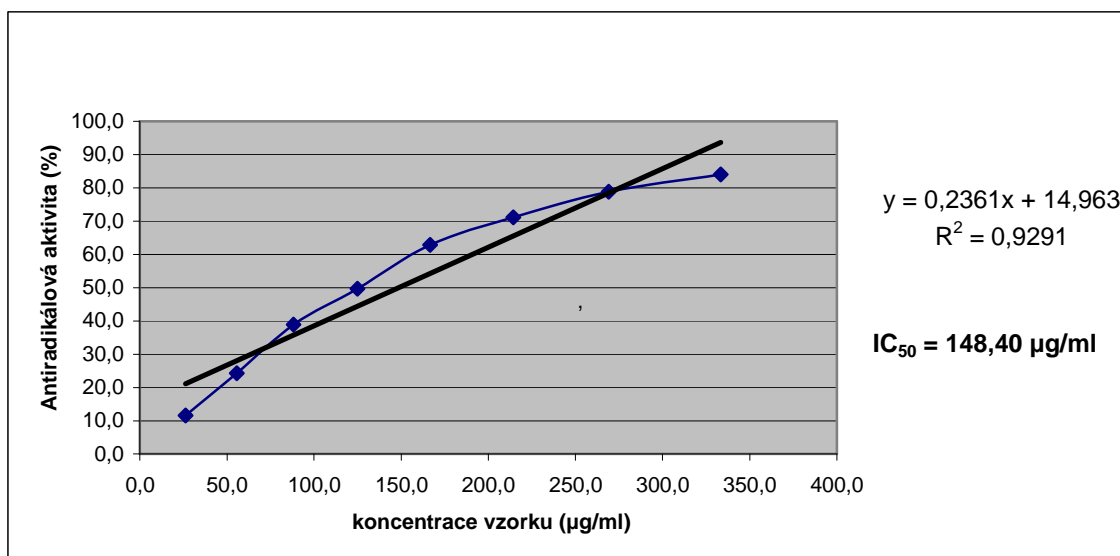
8.2. Zhášení DPPH radikálu

8.2.1. Aktivita vzorku *Rubi idaei folium*

Tab.č.41: Hodnoty antiradikálové aktivity výluhu *Rubi idaei folium*

RUBUS IDEAEUS		navážka m = 0,005 g				
DPPH = 0,9607						
Objem vzorku (ml)	Koncentrace vzorku (µg/ml)	Absorbance vzorku I	Absorbance vzorku II	AA I (%)	AA II (%)	Průměrná AA (%)
0,05	26,32	0,8473	0,8510	11,80	11,42	11,61
0,10	55,56	0,7012	0,7535	27,01	21,57	24,29
0,15	88,24	0,5548	0,6183	42,25	35,64	38,95
0,20	125,00	0,4161	0,5493	56,69	42,82	49,76
0,25	166,67	0,2957	0,4181	69,22	56,48	62,85
0,30	214,29	0,2147	0,3391	77,65	64,70	71,18
0,35	269,23	0,1292	0,2769	86,55	71,18	78,86
0,40	333,33	0,1029	0,2034	89,29	78,83	84,06

Graf č.8: Závislost antiradikálové aktivity na koncentraci výluhu drogy *Rubi idaei folium*

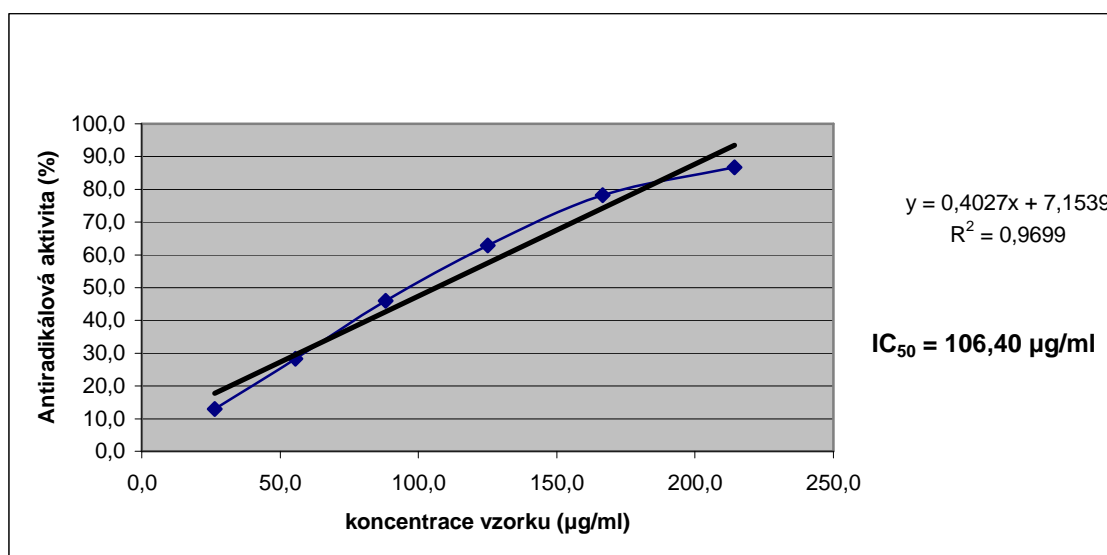


8.2.2. Aktivita vzorku *Rubi fruticosus folium*

Tab.č.42: Hodnoty antiradikálové aktivity výluhu *Rubi fruticosi folium*

RUBUS FRUTICOSUS			navážka m = 0,005 g			
DPPH = 0,9607						
Objem vzorku (ml)	Koncentrace vzorku (µg/ml)	Absorbance vzorku I	Absorbance vzorku II	AA I (%)	AA II (%)	Průměrná AA (%)
0,05	26,32	0,8522	0,8191	11,29	14,74	13,02
0,10	55,56	0,7090	0,6687	26,20	30,39	28,30
0,15	88,24	0,5353	0,5028	44,28	47,66	45,97
0,20	125,00	0,3735	0,3398	61,12	64,63	62,88
0,25	166,67	0,1877	0,2301	80,46	76,05	78,26
0,30	214,29	0,1211	0,1335	87,39	86,10	86,75

Graf č.9: Závislost antiradikálové aktivity na koncentraci výluhu drogy *Rubi fruticosi folium*

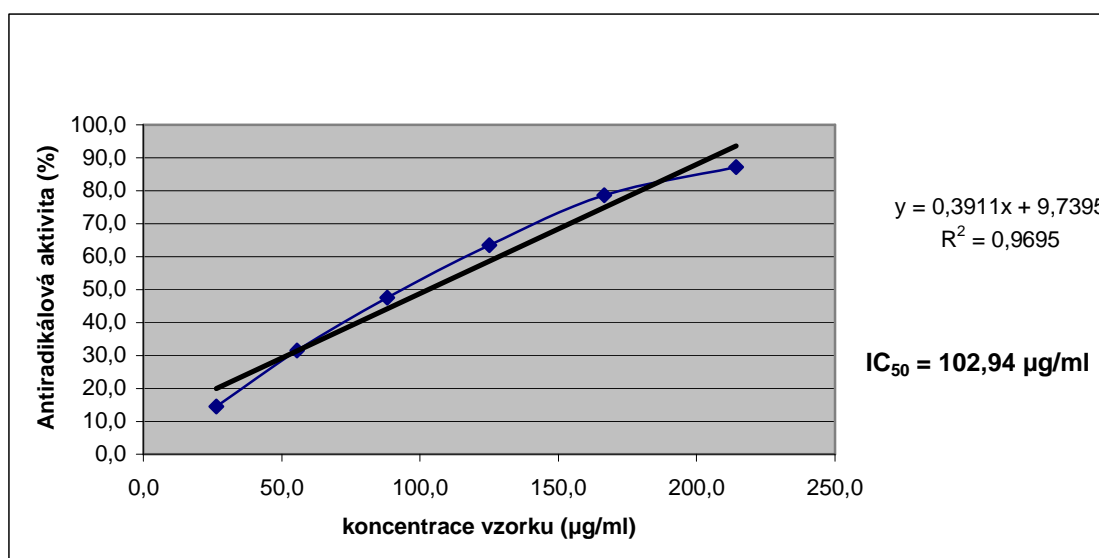


8.2.3. Aktivita vzorku *Fragariae folium*

Tab.č.43: Hodnoty antiradikálové aktivity výluhu *Fragariae folium*

FRAGARIA VESCA			navážka m = 0,005 g			
DPPH = 0,9607						
Objem vzorku (ml)	Koncentrace vzorku (µg/ml)	Absorbance vzorku I	Absorbance vzorku II	AA I (%)	AA II (%)	Průměrná AA (%)
0,05	26,32	0,7556	0,8867	21,35	7,70	14,53
0,10	55,56	0,6235	0,6921	35,10	27,96	31,53
0,15	88,24	0,4651	0,5424	51,59	43,54	47,56
0,20	125,00	0,3077	0,3942	67,97	58,97	63,47
0,25	166,67	0,1180	0,2932	87,72	69,48	78,60
0,30	214,29	0,0992	0,1475	89,67	84,65	87,16

Graf č.10: Závislost antiradikálové aktivity na koncentraci výluhu drogy *Fragariae folium*

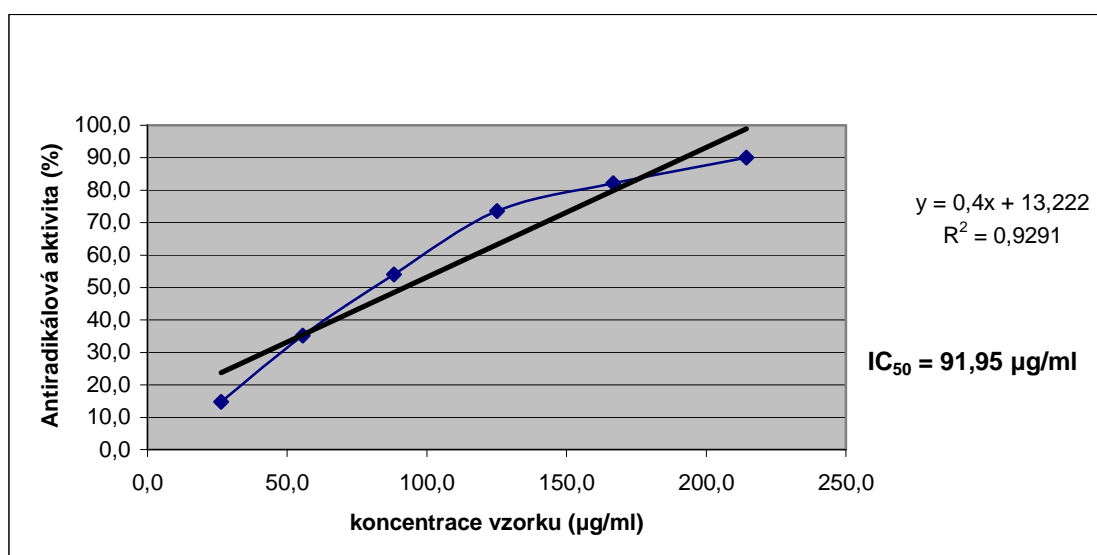


8.2.4. Aktivita vzorku *Agrimoniae herba*

Tab.č.44: Hodnoty antiradikálové aktivity výluhu *Agrimoniae herba*

AGRIMONIA EUPATORIA			navážka m = 0,005 g			
DPPH = 0,9607						
Objem vzorku (ml)	Koncentrace vzorku (µg/ml)	Absorbance vzorku I	Absorbance vzorku II	AA I (%)	AA II (%)	Průměrná AA (%)
0,05	26,32	0,8247	0,8132	14,16	15,35	14,75
0,10	55,56	0,5957	0,6484	37,99	32,51	35,25
0,15	88,24	0,4347	0,4492	54,75	53,24	54,00
0,20	125,00	0,2598	0,2482	72,96	74,16	73,56
0,25	166,67	0,1865	0,1572	80,59	83,64	82,11

Graf č.11: Závislost antiradikálové aktivity na koncentraci výluhu drogy *Agrimoniae herba*



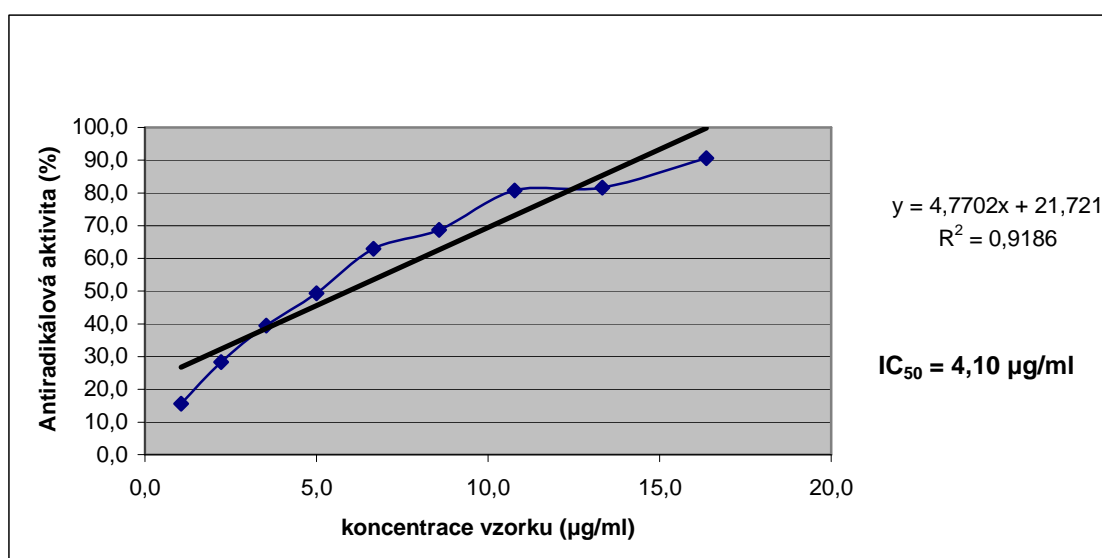
Standardy

8.2.5. Aktivita epigalokatechin galátu (EGCG)

Tab.č.45: Hodnoty antiradikálové aktivity EGCG

EPIGALOKATECHIN GALÁT (EGCG)				navážka m = 0,005 g		
DPPH = 0,9607						
Objem vzorku (ml)	Odpovídající množství (µg)	Absorbance vzorku I	Absorbance vzorku II	AA I (%)	AA II (%)	Průměrná AA (%)
0,05	0,694	0,8776	1,0178	8,65	5,58	7,11
0,10	1,389	0,7683	0,8269	20,03	23,29	21,66
0,15	2,083	0,5995	0,6505	37,60	39,65	38,62
0,20	2,778	0,465	0,5585	51,60	48,19	49,89
0,25	3,472	0,3319	0,4088	65,45	62,07	63,76
0,30	4,167	0,2388	0,3307	75,14	69,32	72,23
0,35	4,861	0,149	0,2505	84,49	76,76	80,63
0,40	5,556	0,0681	0,0933	92,91	91,34	92,13

Graf č.12: Závislost antiradikálové aktivity na koncentraci EGCG

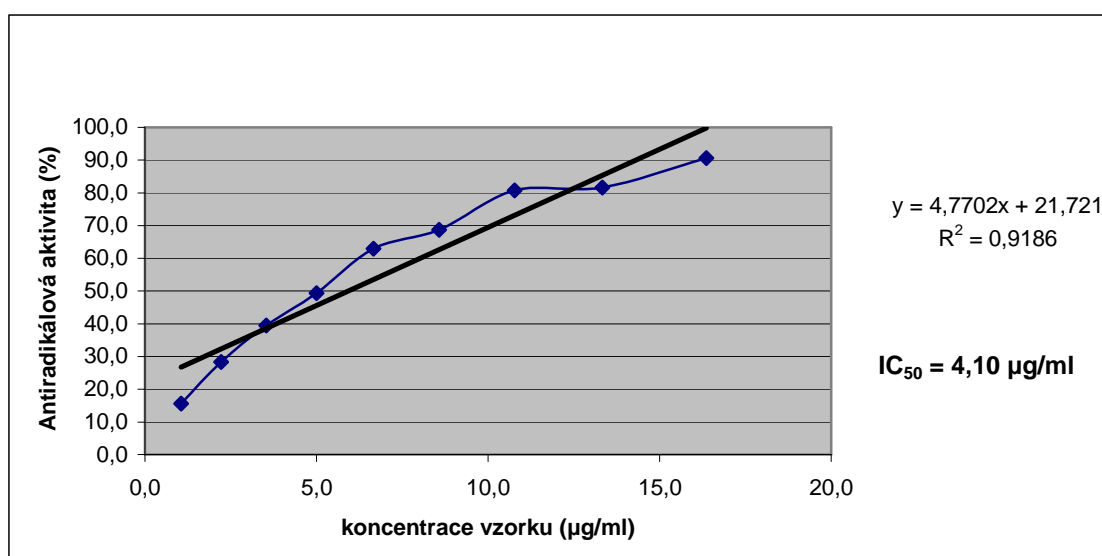


8.2.6. Aktivita (-)-epikatechinu

Tab.č.46: Hodnoty antiradikálové aktivity (-)-Epikatechinu

(-)-EPIKATECHIN		navážka m = 0,005 g				
DPPH = 1,02						
Objem vzorku (ml)	Odpovídající množství (µg)	Absorbance vzorku I	Absorbance vzorku II	AA I (%)	AA II (%)	Průměrná AA (%)
0,05	1,000	0,8611	0,9087	15,58	15,70	15,64
0,10	2,000	0,7318	0,7715	28,25	28,43	28,34
0,15	3,000	0,6074	0,6619	40,45	38,59	39,52
0,20	4,000	0,4989	0,5636	51,09	47,71	49,40
0,25	5,000	0,2954	0,4858	71,04	54,93	62,99
0,30	6,000	0,2897	0,3690	71,60	65,77	68,68
0,35	7,000	0,1774	0,2284	82,61	78,81	80,71
0,40	8,000	0,1687	0,2185	83,46	79,73	81,59
0,45	9,000	0,0651	0,1329	93,62	87,67	90,64

Graf č.13: Závislost antiradikálové aktivity na koncentraci (-)-epikatechinu

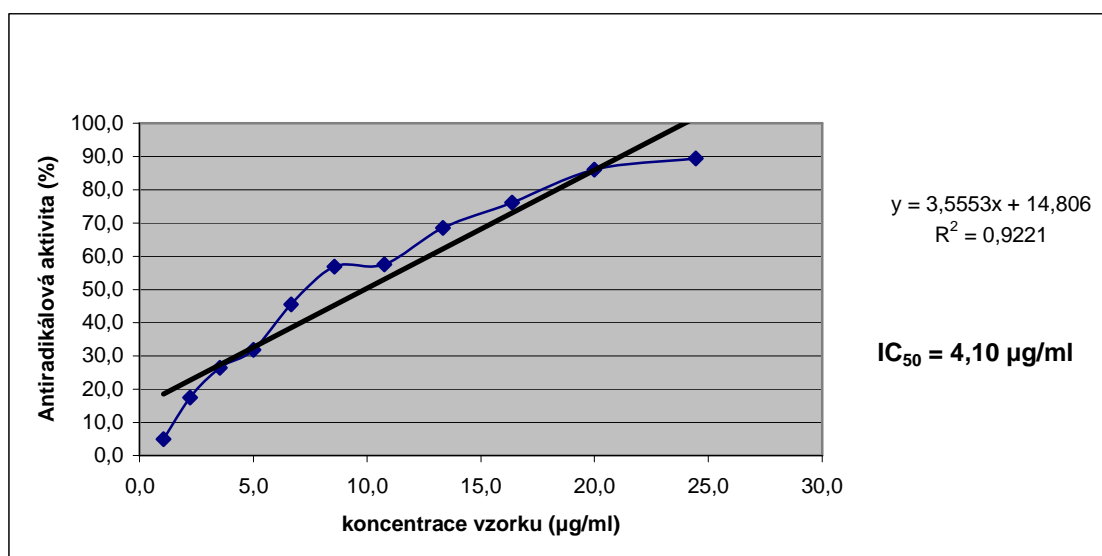


8.2.7. Aktivita (+)-katechinu

Tab.č.47: Hodnoty antiradikálové aktivity (+)-Katechinu

(+)-KATECHIN		navážka m = 0,005 g				
DPPH = 1,0779						
Objem vzorku (ml)	Odpovídající množství (µg)	Absorbance vzorku I	Absorbance vzorku II	AA I (%)	AA II (%)	Průměrná AA (%)
0,05	1,000	0,9983	1,052	7,38	2,40	4,89
0,10	2,000	0,8571	0,9202	20,48	14,63	17,56
0,15	3,000	0,7733	0,8121	28,26	24,66	26,46
0,20	4,000	0,7269	0,7423	32,56	31,13	31,85
0,25	5,000	0,5514	0,6239	48,84	42,12	45,48
0,30	6,000	0,397	0,5317	63,17	50,67	56,92
0,35	7,000	0,4485	0,4656	58,39	56,80	57,60
0,40	8,000	0,3064	0,3718	71,57	65,51	68,54
0,45	9,000	0,2366	0,2778	78,05	74,23	76,14
0,50	10,000	0,1071	0,1934	90,06	82,06	86,06
0,55	11,000	0,1151	0,1135	89,32	89,47	89,40

Graf č.14: Závislost antiradikálové aktivity na koncentraci (+)-katechinu



9. Diskuze

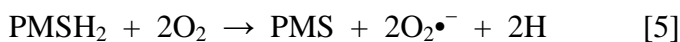
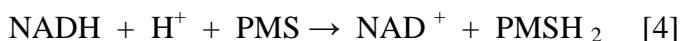
Oxidační stres vznikající nerovnováhou mezi volnými radikály a antioxidanty se stává v dnešní době velkým problémem celé populace. Převaha volných radikálů, ale i antioxidantů může způsobovat vážná poškození organismu, s čímž se zvyšuje i počet civilizačních onemocnění. Volné radikály, které vznikají *in vivo*, mají celou řadu fyziologických funkcí (např. účast v protizánětlivých procesech), přesto jejich hlavním projevem je negativní působení na biologicky významné sloučeniny, kdy pozměňují jejich struktury a tím modifikují jejich funkce. Následkem je pak vážné poškození organismu (1).

Samy reparativní procesy nemohou plně eliminovat poškození biomolekul, a proto příjem antioxidantů hraje významnou roli při ochraně před negativní působením volných radikálů. Jsou-li antioxidanty přítomny v organismu v malých koncentracích, ve srovnání s látkami, jež mají chránit, mohou zabraňovat nebo omezovat oxidativní destrukci těchto látek (1).

Kromě endogenních antioxidantů jako např. enzymy glutathionperoxidáza, superoxidodismutáza, kyselina močová, koenzym Q₁₀ a další, na významu v poslední době nabývají přírodní látky s antioxidačními účinky. Důležité jsou ty, které jsou přijímány společně s potravou. Mezi nejčastější patří vitaminy C, E, karotenoidy a polyfenolické sloučeniny. Zdrojem těchto látek jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaj, víno a aromatické a léčivé rostliny. Vedle hodnocení antioxidačních vlastností čistých látek je proto zájem poznat i antioxidační aktivitu rostlinných extraktů. Antioxidační aktivita látek *in vitro* je pravděpodobně odlišná od antioxidační aktivity *in vivo* po jejich podání do organismu. Výsledná aktivita je ovlivněna změnami, kterými látky v organismu podléhají v průběhu vstřebávání a metabolismu (1).

Ve své práci jsem se zaměřila na studium antiradikálové aktivity třísloviných drog *Rubi idaei folium*, *Rubi fruticosi folium*, *Fragariae folium* a *Agrimoniae herba*. Díky vysokému obsahu tříslovin v těchto drogách je jejich hlavním účinkem adstringentní působení a využívají se proto při poranění a zánětech různého charakteru. V poslední době se také ukázala významná antioxidační aktivita tříslovin. Bylo dokázáno, že inhibují superoxidový radikál a lipoxygenázu ve střevě potkanů a kondenzované třísloviny inhibují lipidovou peroxidaci potkaních jaterních buněk (10). U výše jmenovaných drog byla v této práci antiradikálová aktivita zjišťována s využitím metody zhášení superoxidového radikálu a radikálu DPPH. Pro porovnání antiradikálové aktivity byly použity standardy epigalokatechin galát, (-)-epikatechin a (+)-katechin.

Superoxidový radikál byl generován neenzymaticky, systémem NADH/PMS (nikotinamidadeninukleotid a 5 – methylphenazinium – methyl - sulfát) podle reakce:



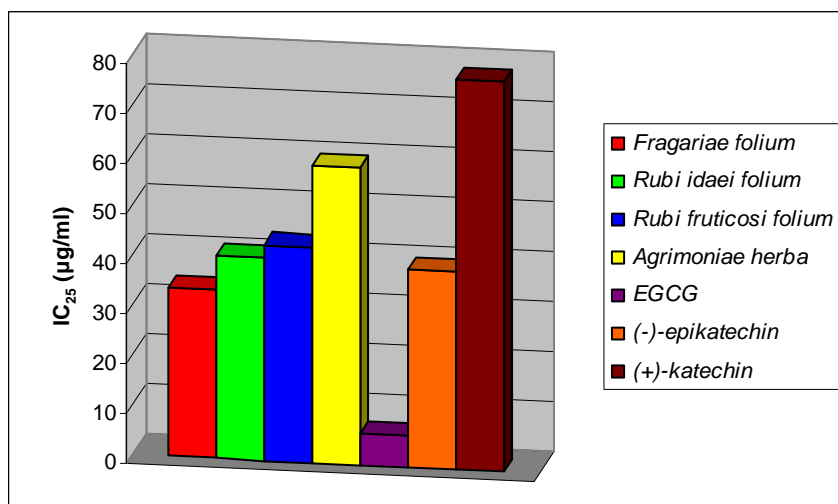
Superoxid dále redukoval nitrotetrazolinovou modř (NBT) na modře zbarvený formazan a tato změna zbarvení byla stanovována spektrofotometricky při vlnové délce 560 nm.

Studované výluhy drog a standardy zhášely superoxidový radikál v závislosti na koncentraci a výsledky měření inhibice superoxidového radikálu jsou uvedeny v tab. č. 20 - 31 a grafech č. 1 - 4. Pro porovnání jednotlivých aktivit byly odečteny hodnoty IC_{25} , které jsou uvedeny v tab. č. 48 a grafu č. 15.

Tab. č. 48: Antiradikálová aktivita vodných extraktů drog a standardů

Vodný extrakt	IC_{25} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Fragariae folium</i>	33,60
<i>Rubi idaei folium</i>	41,00
<i>Rubi fruticosi folium</i>	42,95
<i>Agrimoniae herba</i>	59,20
EGCG	6,30
(-)-epikatechin	39,35
(+)-katechin	77,90

Graf č. 15: Porovnání antiradikálové aktivity pomocí hodnot IC_{25} ($\mu\text{g/ml}$)



Největší antiradikálovou aktivitu ukázal extrakt *Fragariae folium* s IC_{25} 33,6 $\mu\text{g/ml}$. 1,7x menší a nejslabší schopnost inhibice superoxidu vykazoval vodný extrakt *Agrimoniae*

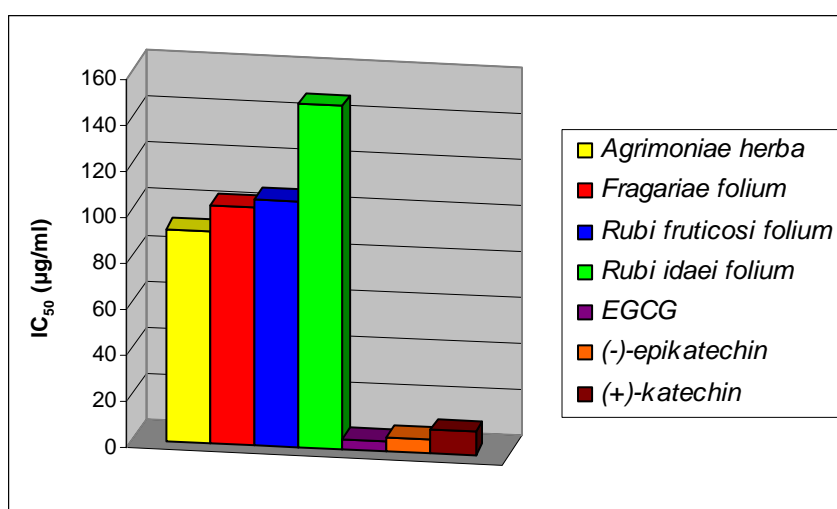
herba (IC₂₅ 59,25 µg/ml). U standardů měl nejvyšší aktivitu epigalokatechin galát (IC₂₅ 6,3 µg/ml), jehož aktivita byla 5,3x vyšší než aktivita vodného extraktu *Fragariae folium* a 9,4x vyšší než vodný extrakt *Agrimoniae herba*. Nejnížší aktivity dosahoval (+)-katechin s IC₂₅ 77,9 µg/ml, (-)-epikatechin (IC₂₅ 39,35 µg/ml) měl srovnatelné hodnoty s měřenými extrakty drog.

Další metodou pro zjištění antiradikálové aktivity studovaných drog byla metoda zhášení DPPH radikálu. Výsledky měření jsou uvedeny v tab. č. 41 - 44 a grafech č. 8 - 11. Hodnoty koncentrací extraktů a standardů při 50 % inhibici radikálu jsou uvedeny v tabulce č. 49 a grafu č. 16.

Tab č. 49: Antiradikálová aktivita vodných extraktů drog a standardů

Vodný extrakt	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>Agrimoniae herba</i>	91,95
<i>Fragariae folium</i>	102,94
<i>Rubi fruticosi folium</i>	106,40
<i>Rubi idaei folium</i>	148,40
EGCG	4,10
(-)-epikatechin	5,93
(+)-katechin	9,90

Graf č. 15: Porovnání antiradikálové aktivity pomocí hodnot IC₅₀ (µg/ml)



U této metody ukázal nejvyšší aktivitu vodný extrakt *Agrimoniae herba* s IC₅₀ 91,95 µg/ml a nejnížší, 1,6x menší, vodný extrakt *Rubi idaei folium* s hodnotou IC₅₀ 148,40 µg/ml. Ze standardů radikál DPPH nejsilněji zhášel epigalokatechin galát

(IC₅₀ 4,10 µg/ml), což představovalo 22x větší aktivitu než vodný extrakt *Agrimoniae herba* a 25x větší aktivitu než extrakt drogy *Fragariae folium*, dále (-)-epikatechin s IC₅₀ 5,93 µg/ml a (+)-katechin s IC₅₀ 9,90 µg/ml.

Zjištěná antiradikálová aktivita extraktů drog je dána obsahem řady látek, jejichž antioxidační aktivita již byla experimentálně potvrzena. Vedle tříslovin jsou to zejména flavonoidy a hydroxyskořicové kyseliny, které přecházejí do vodných výluhů z drog. Zjištění schopnosti působit proti volným radikálům, zejména superoxidovému radikálu může přispět k objasnění podstaty biologické aktivity u stavů, které jsou spojeny s působením volných radikálů.

10. Závěr

V práci byla hodnocena antiradikálová aktivita vodných výluhů tříslovinných drog *Rubi idaei folium*, *Rubi fruticosi folium*, *Fragariae folium* a *Argimoniae herba* na základě schopnosti zhasět superoxidový a DPPH radikál.

Superoxidový radikál byl generován reakcí NADH / PMS / NBT. Zhášení superoxidového radikálu způsobovaly všechny výluhy, nejvyšší aktivitu měl vodný výluh *Fragariae folium* s IC_{25} 33,60 $\mu\text{g/ml}$, dále *Rubi idaei folium* (IC_{25} 41,00 $\mu\text{g/ml}$), *Rubi fruticosi folium* (IC_{25} 42,95 $\mu\text{g/ml}$) a *Argimoniae herba* s IC_{25} 59,20 $\mu\text{g/ml}$.

Antiradikálová aktivita testovaných standardů vůči superoxidovému radikálu klesala v tomto pořadí: EGCG s IC_{25} 6,30 $\mu\text{g/ml}$, (-)-epikatechin s IC_{25} 39,30 $\mu\text{g/ml}$ a (+)-katechin s IC_{25} 77,90 $\mu\text{g/ml}$.

Nejvyšší aktivitu vůči DPPH radikálu vykazoval vodný extrakt *Argimoniae herba* s IC_{50} 81,00 $\mu\text{g/ml}$. U dalších extraktů klesala aktivita: IC_{50} 93,90 $\mu\text{g/ml}$ u *Fragariae folium*, IC_{50} 96,5 $\mu\text{g/ml}$ u *Rubi fruticosi folium* a IC_{50} 125,15 $\mu\text{g/ml}$ u *Rubi idaei folium*.

U standardů klesala aktivita v pořadí: EGCG s IC_{50} 3,45 $\mu\text{g/ml}$, (-)-epikatechin s IC_{50} 5,10 $\mu\text{g/ml}$ a (+)-katechin s IC_{50} 7,35 $\mu\text{g/ml}$.

Všechny testované extrakty prokázaly antiradikálovou aktivitu vůči radikálu DPPH a superoxidu.

11. LITERATURA

- (1) Paulová, H., et. al.: Chem. Listy, 2004; 98, 174-179.
- (2) Racek, J., Holeček, et al. : Chem. Listy, 1999; 93, 774-780.
- (3) Hudcovská, L. : Oxidativní stres v rostlinách - reaktivní radikály a antioxidační ochrana, Ročníková práce, Právnická fakulta Masarykovy univerzity Brno, 2002.
- (4) Valko, M., et. al. : Int. J. Biochem. Cell Biol., 2007; 39, 44-84.
- (5) Piterková, J., et. al. : Chem. Listy, 2005; 99, 455-466.
- (6) Karabín, M., et al. : Chem. Listy, 2006; 100, 184-189.
- (7) Fidler, M., et. al.: : Analýza antioxidantů v chmelu a pivu, Univerzita Pardubice, <http://www.vscht.cz/anl/soutez2007/abstrakt-Fidler.pdf>.
- (8) Šulc, M., et. al. : Chem. Listy, 2007; 101, 584-591.
- (9) Chvátalová, K.: Studium antiradikálové aktivity fenolových kyselin a jejich vlivu na redoxní stav železa a mědi, disertační práce, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno, 2006.
- (10) Bruneton, J.: Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants. Intercept Ltd., 2nd Ed., Londres, Paris, New York 1999.
- (11) Hänsel, R., Sticher, O.: Pharmakognosie-Phytopharmazie, 7 Aufl., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2004.
- (12) Niero, R., Filho, V.C.: Nat. Prod. Commun., 2008; 3, 437 – 444.
- (13) Slavík, B. (Ed.): Květena České republiky 4, Academia, Praha 1995, s. 54 - 281.
- (14) Korbelař, E., et al.: Naše rostliny v lékařství, 7.vyd., Praha Avicenum, 1981.
- (15) Pantelidis, G.,E., et al.: Food Chem., 2007; 102, 777–783.
- (16) Atala, E., et al.: Food Chem., 2009; 113, 331–335.
- (17) Socha, R., et al.: Food Chem., 2009; 113, 568–574.
- (18) Mullen, W., et al.: Phytochemistry, 2003; 64, 617–624.
- (19) Gudej, J., et al.: Acta Polon. Pharm., 2003; 60, 313-315.
- (20) Wada, L., et al.: J. Agric. Food Chem., 2002; 50, 3495-3500.
- (21) Ross H., A., et al.: Phytochemistry, 2007; 68, 218–228.
- (22) Oomah, B.,D., et al.: Food Chem., 2000; 69, 187–193.
- (23) Stintzing, F.,C., et al.: J. Agric. Food. Chem., 2002; 50, 396 - 399.
- (24) Rocabado, G.,O., et al.: Nat. Prod. Commun., 2008; 3, 423 – 436.
- (25) Elisia, I., et al.: Food Chem., 2007; 101, 1052–1058.
- (26) Rimpapa, Z., et al.: Bosn. J. Basic Med. Sci., 2007; 7, 117-20.

- (27) De Mello, R., et al.: Characterization of the extracellular compounds released from *Rubus fruticosus* cells during a hypertensive response, <http://www.sinpospq.org/2008/node/401>.
- (28) Flamini, G., et al.: *Phytochemistry*, 2002; 59, 873-876.
- (29) Panizzi, L., et al.: *J. Ethnopharmacol.*, 2002; 79, 165-168.
- (30) Ono, M., et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 2003; 51, 200-202.
- (31) Qingguo, T, et al.: *Food Chem.*, 2006; 94, 465-468.
- (32) Niero, R., et al.: *J. Nat. Prod.*, 1999; 62, 1145-1146.
- (33) Nam, J.,H., et al.: *Biol. Pharm. Bull.*, 2006; 29, 967-970.
- (34) Hussein, S.,A.,M., et al.: *Phytochemistry*, 2003; 63, 905-911.
- (35) Cui, Ch.,B., et al.: *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2002; 4, 243-252.
- (36) Barbosa, E., et al.: *J. Ethnopharmacol.*, 2006; 109, 395-397.
- (37) Ruan, J., et al.: *Zhong Yao Coi*, 2001; 24, 645-647.
- (38) Jung, S.,W., et al.: *Arch. Pharm. Res.*, 2001; 24, 412-415.
- (39) Murakami, C., et al.: *Bioch. Bioph. Acta*, 2002; 1596, 193-200.
- (40) Pantelidis, G.,E., et al.: *Food Chem.*, 2007; 102, 777-783.
- (41) Wang, S.,Y., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2000; 48, 5677-5684.
- (42) Yau, M.,H., et al.: *Life Sci.*, 2002; 72, 329-338.
- (43) Serraino, I., et al.: *Life Sci.*, 2003; 73, 1097-1114.
- (44) Lee, K.,H., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2006; 34, 643-654.
- (45) Park, J.,H., et al.: *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 351, 146-152.
- (46) Kim, E.,J., et al.: *Nutrition*, 2005; 21, 1141-1148.
- (47) Lee, S.,J., et al.: *Arch. Pharmacol. Res.*, 2005; 28, 1270-1274.
- (48) Skupien, K., et al.: *Cancer Lett.*, 2006; 236, 282-291.
- (49) Hsieh, T.,C., et al.: *Int. J. Oncol.*, 2002; 20, 681-689.
- (50) Liu, Z., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53, 3909-3915.
- (51) Liu, Z., et al.: *Phytother. Res.*, 2006; 20, 806-813.
- (52) Lee, J.,H., et al.: *Arch. Pharmacol. Res.*, 2000; 23, 338-343.
- (53) Rauha, J.-P., et al.: *Int. J. Food Microbiol.*, 2000; 56, 3-12.
- (54) Thiem, B., et al.: *Fitoterapia*, 2004; 75, 93-95.
- (55) Derda, M., et al.: *Parasitol. Res.*, 2009; 104, 705-708.
- (56) Hamill, F.,A., et al.: *J. Ethnopharmacol.*, 2003; 87, 15-19.
- (57) Tshibangu, J.,N., et al.: *J. Ethnopharmacol.*, 2002; 80, 25-35.
- (58) Kim, T.,G., et al.: *Phytother. Res.*, 2001; 15, 718-720.

- (59) Alanis, A.,D., et al.: *Phytother. Res.*, 2003; 17, 681-682.
- (60) Jouad, H., et al.: *J. Ethnopharmacol.*, 2002; 81, 351-356.
- (61) Kanegusuku, M., et al.: *Z. Naturforsch.*, 2002; 57, 272-276.
- (62) Vera, J.,R., et. al.: *Nat. Prod. Commun.*, 2006; 1, 705–710.
- (63) Patel, A.,V., et al.: *Nat. Prod. Commun.*, 2007; 2, 913–916.
- (64) Bianco, L., et al.: *J. Proteome Res.*, 2008; 72, 586-607.
- (65) Rababah, T.,M., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53, 4444-7.
- (66) Pinto, M., D., S., et al.: *Plant Food Hums. Nutr.*, 2007; 62, 127-131.
- (67) Aaby, K., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2007; 55, 4395-4406.
- (68) Zhang, Y., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2008; 56, 670-675.
- (69) Aaby, K., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53, 4032-40.
- (70) Seeram, N.,P., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2006; 54, 9329-39.
- (71) Cerdá, B., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53, 227-35.
- (72) Hannum, S.,M., et al.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2004; 44, 1-17.
- (73) Aaby, K., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2007; 55, 5156-5166.
- (74) Zafra-Stone, S., et al.: *Mol. Nutr. Food Res.*, 2008; 52, 386-7.
- (75) Heo, H.,J., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53, 1984-9.
- (76) Antonio, J.,E., et al.: *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2007; 58, 629-636.
- (77) Wang, S.,Y., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2000; 48, 140-6.
- (78) Tulipani, S., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2008; 56, 696-704.
- (79) Meyers, K., J. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2003; 51, 6887-92.
- (80) Boivin, D., et al.: *Anticancer. Res.*, 2007; 27, 937-48.
- (81) Olsson, M.,E., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2006; 54, 1248-55.
- (82) Skupień, K., et al.: *Cancer Lett.*, 2006; 236, 282-91.
- (83) Wang, S.,Y., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53, 4187-93.
- (84) Roy, S., et al.: *Free Radic. Res.*, 2002; 36, 1023-31.
- (85) Naemura, A., et al.: *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 2005; 16, 501-9.
- (86) Mundic, I., et al.: *Int. J. of Phytother. Phytopharmacol.*, 2009; 16, 462-9.
- (87) Puupponen-Pimiä, R., et al.: *J. Appl. Microbiol.*, 2005; 98, 991-1000.
- (88) Shin, Y., et al.: *J. Food Sci.*, 2008; 73, 339-44.
- (89) Hartmann, A, et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2008; 56, 9484 - 9489.
- (90) Wang, C.,Y., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2007; 55, 6527-32.
- (91) Almenar, E., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2007; 55, 2240-5.
- (92) Venskutonis, P.,R., et al.: *J. Supercritic. Fluids*, 2008; 45, 231-237.

- (93) Correia, H., et al.: *Biomed. Chromatogr.*, 2006; 20, 88-94.
- (94) Shabana, M., H., et al.: *Herba Polon.*, 2003; 49, 24 - 28.
- (95) Gião, M., S., et al.: *Food Chem.*, 2009; 117, 412-416.
- (96) Ivanova, D., et al.: *Risk infections and Possibilities for Biomedical Terrorism, Book. Series: NATO Science Series, Sub Series I: Life and Behavioural Sciences*, 2004; 361, 41 - 48.
- (97) Correia, H.,S., et al.: *Biofactors.*, 2007; 29, 91-104.
- (98) Ivanova, D., et al.: *J. Ethnopharmacol.*, 2005; 96, 145-50.
- (99) Kwon, D.,H., et al.: *Phytother Res.*, 2005; 19, 355-8.
- (100) Swanston-Flatt, S.,K., et al.: *Diabetologia*, 1990; 33, 462-4.
- (101) Cao, G., et al.: *J. Nutr.*, 1998; 128, 2383-90.
- (102) Dávalos, A., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2003; 51, 2512-9.
- (103) Sadilova, E., et al.: *Mol. Nutr. Food Res.*, 2007; 51, 1461-1471.
- (104) Jenkins, D., et al.: *Metabolism*, 2008; 57, 1636-44.
- (105) Venskutonis, P.,R., et al.: *Fitoterapia*, 2007; 78, 162-165.
- (106) Venskutonis, P.,R., et al.: *Fitoterapia*, 2006; 78, 166-168.
- (107) Benvenuti, S., et al.: *J. Food Sci.*, 2004; 69, 164-169.
- (108) Hartmann, A., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 2008; 56, 9484-9489.

12. Abstrakt

Experimentální a klinické práce přinášejí důkazy o významném postavení volných radikálů, zejména reaktivních forem kyslíku v patogenezi řady onemocnění. Nárůst poznatků o úloze volných radikálů v organismu a o důsledcích jejich negativního působení s sebou přináší i stoupající zájem o hledání nových látek s antioxidační aktivitou.

Předmětem této práce je testování antiradikálové aktivity vodných extraktů z drog *Rubi idaei folium*, *Rubi fruticosi folium*, *Fragariae folium* a *Agrimoniae herba*.

Tyto drogy se v terapii využívají díky vysokému obsahu tříslovin a flavonoidů jako adstringencia při léčbě zánětů a poranění nejčastěji ve formě vodných výluhů. Pro zjištění antiradikálové aktivity vodných extraktů z drog byla sledována aktivita vůči radikálu DPPH a superoxidu. Jako porovnávací látky byly použity epigalokatechin galát, (-)-epikatechin a (+)-katechin.

U všech testovaných drog byla zjištěna antioxidační aktivita různé intenzity. Vůči radikálu DPPH byl nejúčinnější extrakt *Agrimoniae herba* s $IC_{50} = 91,95 \mu\text{g/ml}$. Aktivita testovaných drog dále klesala v pořadí *Fragariae folium* $IC_{50} = 102,94 \mu\text{g/ml}$, *Rubi fruticosi folium* $IC_{50} = 106,40 \mu\text{g/ml}$ a *Rubi idaei folium* $IC_{50} = 148,40 \mu\text{g/ml}$. Aktivita standardů klesala v pořadí epigalokatechin galát $IC_{50} = 4,10 \mu\text{g/ml}$, (-)-epikatechin $IC_{50} = 5,93 \mu\text{g/ml}$ a (+)-katechin $IC_{50} = 9,90 \mu\text{g/ml}$.

Nejvyšší aktivitu vůči superoxidovému radikálu měl extrakt *Fragariae folium* ($IC_{25} = 33,60 \mu\text{g/ml}$), a dále *Rubi idaei folium* ($IC_{25} = 41,00 \mu\text{g/ml}$), *Rubi fruticosi folium* ($IC_{25} = 42,95 \mu\text{g/ml}$) a *Agrimoniae herba* ($IC_{25} = 59,20 \mu\text{g/ml}$). Aktivita standardů klesala v pořadí epigalokatechin galát $IC_{25} = 6,30 \mu\text{g/ml}$, (-)-epikatechin $IC_{25} = 39,35 \mu\text{g/ml}$ a (+)-katechin $IC_{25} = 77,90 \mu\text{g/ml}$.

Antiradikálová aktivita, zejména aktivita vůči superoxidu, nebyla u vodných extraktů studovaných drog dosud popsána.

The experimental and clinical studies are bringing evidence of significant role of free radicals, especially reactive forms of oxygen in pathogenesis of whole range of diseases. Information accumulation regarding the role of free radicals in organism and of consequences of their negative effect brings with an increased interest in searching of new substances with antioxidant activity.

The subject of this work is testing antiradical activity of aqueous extracts from drugs *Rubi idaei folium*, *Rubi fruticosi folium*, *Fragariae folium*, and *Agrimoniae herba*.

These drugs are used in therapy for their content of tannins and flavonoids such as adstringentia in inflammations and wounds treatment often in form of aqueous tinctures. Activity towards DPPH radical and superoxide radical was screened to detect antiradical activity of aqueous extracts of drugs. As comparative substances were used epigallocatechin gallate, (-)-epicatechine and (+)-catechine.

Antioxidant activity of different intensity was discovered at all tested drugs. Towards DPPH radical was the most effective extract of *Agrimoniae herba* with $IC_{50} = 91,95 \mu\text{g/ml}$. The activity of tested drugs descended in order *Fragariae folium* $IC_{50} = 102,94 \mu\text{g/ml}$, *Rubi fruticosi folium* $IC_{50} = 106,40 \mu\text{g/ml}$ and *Rubi idaei folium* $IC_{50} = 148,40 \mu\text{g/ml}$. The activity of standards descended in order epigallocatechin gallate $IC_{50} = 4,10 \mu\text{g/ml}$, (-)-epicatechine $IC_{50} = 5,93 \mu\text{g/ml}$ and (+)-catechine $IC_{50} = 9,90 \mu\text{g/ml}$.

Highest activity towards superoxide radical had extract of *Fragariae folium* ($IC_{25} = 33,60 \mu\text{g/ml}$) and afterwards *Rubi idaei folium* ($IC_{25} = 41,00 \mu\text{g/ml}$), *Rubi fruticosi folium* ($IC_{25} = 42,95 \mu\text{g/ml}$) and *Agrimoniae herba* ($IC_{25} = 59,20 \mu\text{g/ml}$). The activity of standards descended in order epigallocatechin gallate $IC_{25} = 6,30 \mu\text{g/ml}$, (-)-epicatechine $IC_{25} = 39,35 \mu\text{g/ml}$ and (+)-catechine $IC_{25} = 77,90 \mu\text{g/ml}$.

The antiradical activity, especially activity towards superoxide radical, at aqueous extracts has not been described yet.