

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra biologických a lékařských věd**



**Biologicky aktivní látky v druzích rodu *Rheum* využívaných v  
tradiční asijské medicíně**

**(diplomová práce)**

**Hradec Králové, 2011**

**Vanda Neradilová**

## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně a práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně ocitovány.“

Vanda Neradilová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala především panu Mgr. Petru Maršíkovi, Ph.D. za odbornou pomoc, trpělivost a za umožnění práce v Laboratoři biotechnologie rostlin v Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

Dále bych ráda poděkovala Ing. Jaroslavu Andrlemu za vstřícnou pomoc, trpělivost, užitečné rady a za čas, který mi věnoval.

# Obsah

<b>1 Úvod a zadání práce.....</b>	<b>11</b>
<b>2 Teoretická část .....</b>	<b>12</b>
2.1 Rostliny rodu <i>Rheum</i> Linnaeus Sp. Pl.....	12
2.1.1 Synonyma a klasifikace rodu <i>Rheum</i> .....	12
2.1.2 Taxonomie a botanická charakteristika .....	12
2.2 Analyzované druhy rodu <i>Rheum</i> .....	14
2.2.1 <i>Rheum acuminatum</i> Hook. f. & Thomson .....	14
2.2.2 <i>Rheum australe</i> D. Don .....	15
2.3 Obsahové látky analyzovaných druhů rodu <i>Rheum</i> .....	16
2.3.1 Anthrachinony a jejich glykosidy .....	16
2.3.2 Anthrony C – glukosidy .....	21
2.3.3 Stilbeny .....	23
2.3.4 Fenolické kyseliny .....	24
2.4 Účinky na lidský organismus .....	25
2.4.1 Účinky vybraných druhů rodu <i>Rheum</i> .....	26
<b>3 Cíl práce .....</b>	<b>28</b>
<b>4 Experimentální část .....</b>	<b>29</b>
4.1 Stanovení obsahu anthrachinonů a stilbenů .....	29
4.1.1 Extrakce anthrachinonů z rostlinného materiálu .....	29
4.1.2 HPLC analýza.....	30
4.2 Izolace předpokládaného physcionu a jeho určení.....	32
4.2.1 Izolace předpokládaného physcionu.....	32
4.2.2 Identifikace předpokládaného physcionu .....	33
4.3 Statistické zpracování výsledků.....	34
<b>5 Výsledky .....</b>	<b>35</b>
5.1 Kalibrace anthrachinonů.....	35
5.2 Kalibrace stilbenů.....	36
5.3 UV – VIS absorpční spektra anthrachinonů a stilbenů.....	37
5.4 HPLC analýza anthrachinonů.....	37
5.5 Analýza předpokládaného physcionu .....	38
5.5.1 GC/MS analýza methylovaného physcionu a methylovaného emodinu.....	38
5.5.2 Analýza MS <sup>2</sup> a provnání s knihovnou NIST.....	42
5.6 Obsah a porovnání rozdílů v koncentraci jednotlivých látek mezi <i>Rheum acuminatum</i> a <i>R. australe</i> . .....	43
5.7 Zpracování dat pomocí vícerozměrných statistických metod .....	47
<b>6 Diskuse .....</b>	<b>52</b>
<b>7 Závěr .....</b>	<b>55</b>

<b>8 Seznam použité literatury a zdrojů .....</b>	<b>56</b>
<b>9 Přílohy.....</b>	<b>I</b>

# **Abstrakt**

**Vanda Neradiová**

**Biologicky aktivní látky v druzích rodu *Rheum* využívaných v tradiční asijské medicíně**

**Diplomová práce**

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Odborný pracovník v laboratorních metodách**

## **Cíl práce**

Cílem této práce bylo stanovit obsahové látky a jejich množství ve dvou druzích rodu *Rheum* (*R. acuminatum* Hook. f. & Thomson a *R. australe* D. Don) a porovnat, do jaké míry se tyto druhy liší v množství obsahových látek. Dalším kritériem, podle kterého byly tyto druhy srovnávány, bylo místo jejich původu. Srovnávala jsme tyto dva druhy rostoucí ve svém přirozeném prostředí – Himálajích a pěstované v České republice.

## **Metody**

Ke stanovení obsahových látek a jejich kvantitativnímu stanovení jsem používala vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s UV a fluorescenční detekcí. Vzorky jsem porovnávala pomocí retenčních faktorů a retenčních časů standardů. Dále jsem prováděla izolaci a identifikaci pravděpodobného physcionu hmotnostní spektrometrií.

## **Výsledky**

Při kvalitativní analýze anthrachinonů jsem stanovila aloë – emodin, emodin, chrysophanol, physcion a rehin a analýzou stilbenů piceatannol a resveratrol.

V druhu *R. acuminatum* bylo zjištěno vyšší zastoupení anthrachinonů oproti *R. australe*. Při srovnávání obsahu stilbenů, bylo nutné zvlášť hodnotit piceatannol, jehož množství bylo vyšší v *R. australe*. Množství resveratrolu se lišilo i v souvislosti s místem původu. Vzorky z Nepálu obsahovaly vyšší množství resveratrolu v *R. australe*, zatímco vzorky z Průhonic obsahovaly resveratrolu více v *R. acuminatum*.

Při srovnávání druhů, v závislosti na jejich místě původu, bylo zjištěno, že množství anthrachinonů bylo vyšší u vzorků z Nepálu. Obsah stilbenů byl naopak vyšší ve vzorcích z Průhonic.

## **Závěry**

Porovnáním druhů *R. acuminatum* a *R. australe* byly zjištěny značné rozdíly v množství jejich obsahových látek a byl prokázán také vliv prostředí, ve kterém rostou.

# **Abstrakt**

**Vanda Neradiová**

**Biologically active substances in the genus of *Rheum* species used in traditional Asian medicine**

**Diploma thesis**

**Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Specialist in laboratory methods**

## **Background**

The goal of this study was to determine content substances and their quantity in two different species of genus *Rheum* and compare to what extent these two species differ in a number of content substances. Another criterion by which these species were compared was their place of origin. I have compared a species growing in its natural environment in the Himalayas with a second species growing in the Czech Republic.

## **Methods**

For determination of content substances and their quantitative determination high – performance liquid chromatography with UV and fluorescent detection was used. Samples were compared with retention factors and retention times of standards. Furthermore, isolation and identification of probable physon was carried out using mass spectrometry.

## **Results**

By qualitative analysis of anthraquinones, aloe – emodin, emodin, chrysophanol, physon and rhein were determined and by analysis of stilbenes piceatannol and resveratrol were determined. Type *R. acuminatum* had greater representation of anthraquinones compared to *R. australe*. When comparing content of stilbenes, it was necessary to separately evaluate piceatannol and resveratrol, as the amount of resveratrol depends on the place of origin. The amount of piceatannol was higher in the *R. australe* species. Looking at the place of origin, samples from Nepal contained a higher amount of resveratrol in *R. australe*, while samples from Pruhonic contained a higher amount of resveratrol in *R. acuminatum*.



When comparing these species based on their place of origin, it was found that the quantity of anthraquinones was higher in the samples from Nepal. Conversely, the content of silbenes was higher in the samples from Pruhonice.

### **Conslusinos**

By comparing species *R. acuminatum* and *R. australe* significant differences were found in the amount of content substances and it was proven that the environment in which the species grow also has its influence.

## Seznam zkratek

<b>CAS</b>	Chemical Abstracts Service, registrační číslo chemické látky
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>FD</b>	fluorescenční detektor
<b>GC</b>	plynová chromatografie
<b>Glc</b>	glukóza
<b>HPLC</b>	vysokoučinná kapalinová chromatografie
<b>IR</b>	infračervená (infrared)
<b>LD</b>	limit detekce
<b>LQ</b>	limit stanovitelnosti
<b>Me</b>	methyl
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie
<b>NMR</b>	nukleární magnetická rezonance
<b>PCA</b>	analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis)
<b>TCM</b>	Tradiční čínská medicína
<b>TMAH</b>	tetramethyl amonium pentahydrát
<b>UV</b>	ultrafialová (ultraviolet)

# 1 Úvod a zadání práce

V současné době se stále více setkáváme s alternativními léčebnými metodami. Jednou z hlavních oblastí, která tyto alternativní přístupy využívá, je východní medicína, která zahrnuje především Tradiční Čínskou Medicínu (TCM), Tibetskou medicínu, Indonéskou medicínu, Korejskou medicínu a řadu dalších asijských medicín. Tisíciletá historie východní medicíny dokazuje účelnost jejího používání nejen v oblasti dálného východu, ale i na celém světě (1, 2).

Východní medicína ve svých léčebných metodách využívá zejména přírodních zdrojů, rostlinných i živočišných. Mezi rostliny využívané k léčebným účelům patří i rod *Rheum*, který je ve východní medicíně využíván po tisíce let. Rebarbor, jak jsou rostliny tohoto rodu též nazývány, je známo přibližně 50 druhů. Přírodním areálem výskytu je alpské pásmo, v Himálajích, ale rozšířeny jsou také v Číně, na blízkém východě, jižním Povolží a Bulharsku. V dnešní době jsou však pěstovány i mimo své přirozené prostředí téměř po celém světě (3).

V asijské medicíně se rebarbory využívají pro svůj projímavý účinek, jako žaludeční tonikum, dále mají účinek protizánětlivý, antipsychotický, hemostatický, jsou využívány jako antioxidant a byla u nich prokázána také protinádorová aktivita (3, 4, 5).

Za nejúčinnější látky obsažené v rostlinách rodu *Rheum* jsou považovány fenolické látky jako například anthrachinony a stilbeny, které se nachází zejména v kořenech rostlin. Obsah těchto látek se v jednotlivých druzích může značně lišit. Vliv na přítomnost obsahových látek má i prostředí, ve kterém rostliny rostou. V této práci jsem se proto zabývala analýzou obsahových látek a porovnávala jejich množství ve dvou druzích – *Rheum acuminatum* Hook. f. & Thomson a *Rheum australe* D. Don. Dále jsem srovnávala vzorky těchto dvou druhů rostoucí ve svém přirozeném prostředí – Himálajích a pěstovaných u nás v České republice. Cílem bylo zjistit, jak moc se tyto druhy liší v množství obsahových látek a zda rostliny, které jsou pěstované mimo své přirozené prostředí, mají srovnatelný obsah účinných látek a mohou tak mít i stejné medicínské využití.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Rostliny rodu *Rheum* Linnaeus Sp. Pl.

#### 2.1.1 Synonyma a klasifikace rodu *Rheum*

##### Synonyma

Český název:	reveň (Rebarbora)
Farmaceutický název:	Radix et Rhizoma Rhei
Čínský název:	da huang shu, 大黄属 Bao Bojian, 包伯坚

##### Klasifikace

Říše:	Rostliny ( <i>Plantae</i> )
Oddělení:	Rostliny krytosemenné ( <i>Magnoliophyta</i> )
Třída:	Vyšší dvouděložné ( <i>Magnoliapsida</i> )
Řád:	Rdesnotvaré ( <i>Polygonales</i> )
Čeleď:	Rdesnovité ( <i>Polygonaceae</i> )
Rod:	Reveň ( <i>Rheum</i> )

#### 2.1.2 Taxonomie a botanická charakteristika

*Rheum* (reveně, Rebarbory) je rod patřící do řádu rdesnotvaré (*Polygonales*). Jsou to vytrvalé byliny původem z Číny a Tibetu (6, 7).

Stonek bývá silný, dutý a u některých druhů s jemnými chloupky. Oddenky a kořeny jsou tlusté a dřevnaté s dlouhými vedlejšími kořeny a oddenkovými hlízkami (7, 8).

Listy jsou jednoduché, celistvé i dlanitě členěné, srdčitého tvaru, přizemní listy bývají nápadně velké, dlouze řapíkaté a řapíky silné. Na bázi listu se nachází 5 – 7 žil (7, 8).

Rostliny rodu *Rheum* jsou jednodomé s oboupohlavními květy. Květenství bývá obvykle jednoduché nebo rozvětvené, jehlancovitého tvaru, podobné latě. Květy jsou tvořené šesti okvětními lístky, které jsou volné nebo na bázi nepatrně srostlé. Tyčinek bývá 9, ve dvou kruzích – vnější kruh s 6-ti a vnitřní kruh se 3-mi tyčinkami, jeden semeník, 2 až 4 čnělky s kulovitými bliznami. Plodem je trojhranná, křídlatá nažka (6, 8, 9).



Obr. 1: *Rheum* - 1 růst rostliny, 2 stonek listu, 3 květenství, 4 květ, 5 plod

Jednotlivé druhy se od sebe liší především výškou, velikostí listů a barvou a velikostí květů. Z více než 50 druhů rodu *Rheum* zmiňme například: ***Rheum compactum* L.** dorůstající délky 1 m, čepel listu má přibližně 30cm a okvětní lístky jsou světle žluté, velikosti asi 2 mm. ***R. kialense* Franch.** (Obr. 5: A) dorůstající asi 55 cm, listy má velké asi 11 x 8,5 cm, květy bývají fialové nebo světle zelené a mají fialovo - červené prašníky. ***R. nobile* Hook. f. & Thomson** (Obr. 5: B) dorůstající kolem 2 m, čepel listu je velká až 30 cm a distální listy se směrem nahoru zmenšují a jejich barva postupně přechází ve světle slámovou s růžovými okraji. Lata je přibližně 9 cm dlouhá s 5 – 9 květy, které mají žluto – zelenou barvu. ***R. officinale* Baill.** (Obr. 5: C) dorůstající velikosti 1,5 – 2 m a její listy měří až 50 cm. Lata je velká, složená z hustých, klasovitě složených hroznů drobných, žlutavě bílých květů. Květy mají 5 – 6 okvětních

lístku a 9 tyčinek. *R. palmatum* L. dorůstající 2 – 2,5 m a její listy jsou až 1 m dlouhé. Květy jsou drobné a mají bělavé nebo červené zbarvení. *R. rhabarbarum* L. dorůstající přibližně 150 cm a listy jsou dlouhé 90 cm. Okvětní lístky jsou žlutavé, dlouhé 1,5 – 2 mm. Do rodu *Rheum* dále patří např.: *R. alexandrae* Batalin, *R. micranthum* Samuel., *R. rhaponticum* L., *R. tataricum* L. f. a další. V mé práci jsme se soustředila na *R. acuminatum* Hook. f. & Thomson a *R. australe* D. Don, které jsou blíže popsány v následující kapitole. (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).



Obr. 2: **A:** *Rheum kialense*, **B:** *Rheum nobile*, **C:** *Rheum officinale*

## 2.2 Analyzované druhy rodu *Rheum*

*Rheum acuminatum* Hook. f. & Thomson a *R. australe* D. Don byly vybrány, protože jsou využívány v tradiční asijské medicíně, ale jeden z nich (*R. acuminatum*) není příliš prozkoumaný. Chtěla jsem proto tyto druhy srovnat, jak se liší v obsahových látkách.

### 2.2.1 *Rheum acuminatum* Hook. f. & Thomson

Český název: nemá

Další názvy: Himalayan rhubarb, Ornamental rhubarb (Anglicky),  
心叶大黄 Xin ye da huang (Čínsky)

Je to bylina vysoká 50 – 80 cm. Pochází ze střední Asie, Nepálu, Indie a Číny. Roste na svazích a v lesích 2800 - 4000 m nad mořem.

Listy jsou v přízemní růžici 1 – 3. Řapík listu má fialovo – červenou barvu a je přibližně stejně dlouhý jako čepel. Listy bývají velké 13 – 20 x 12 – 19 cm, široce

srdcovitého tvaru. Botka (= ocrea, ochrea - palisty nebo poševní ouška, srostlá ve válcovitý blanitý útvar, objímající osu v místech přisedání řapíku) je velká asi 2 cm, lysá nebo s jemnými chloupky.

Květy jsou uspořádané do laty, která je dvojitě rozvětvená na středu, řídce uspořádaná a lysá. Jsou ve svazku po 10 a mají 6 kališních červeno - fialových lístků. Tyčinky jsou kratší než okvěti, měří asi 2 mm. Prašníky mají černo – fialové zbarvení.

Plody mají velikost 7 – 8 x 6,5 – 7 mm. Křídla plodu, jsou-li čerstvá, mají fialovo – červené zbarvení (9, 18).



Obr. 3: *Rheum acuminatum*

### 2.2.2 *Rheum australe* D. Don

Synonyma: *Rheum emodi* Wall. ex Meisn.

Český název: reveň jižní

Další názvy: Himalayan rhubarb (Anglicky), 藏边大黄 Zang bian da  
huang (Čínsky), पदमचाल Padamchaal (Nepálsky)

Rostlina dorůstá do výšky 0,7 – 2 m. Roste na travnatých svazích Nepálu, Myanmaru, Indie a Pákistánu, v nadmořské výšce 3400 – 4300 m.

Listy v přízemní růžici mají řapík dlouhý přibližně 35 – 40. Čepel může dosahovat velikosti 20 – 50 x 18 – 40 cm. Vrchol listu bývá tupý. Ostatní listy na stonku jsou vejčité s velkou botkou.

Květenství je velké, dvojité nebo trojitě rozvětvené. Květy mají fialovo – červenou barvu a jsou asi 2,5 – 3,5 mm široké. Plody jsou velikosti 9 – 10 x 7 – 8,5 cm. Vaječník má kosodélníkový nebo vejčitý tvar a blizna je zploštělá. Křídla plodu jsou fialovo – červená (9, 19, 20).



Obr. 4: *Rheum australe*

## 2.3 Obsahové látky analyzovaných druhů rodu *Rheum*

Mezi obsahové látky rodu *Rheum* patří především anthrachinony a jejich glykosidy (60 - 80 %), anthronové C - glukosidy, stilbeny, fenolické kyseliny a další (16, 21).

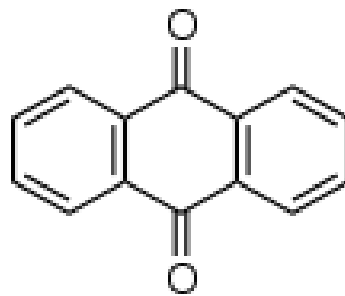
### 2.3.1 Anthrachinony a jejich glykosidy

Anthrachinony jsou aromatické organické sloučeniny, deriváty anthracenu. V rostlinách tvoří základní kostru jejich pigmentů.

systematický název: anthracen - 9, 10 - dion

sumární vzorec:  $C_{14}H_8O_2$



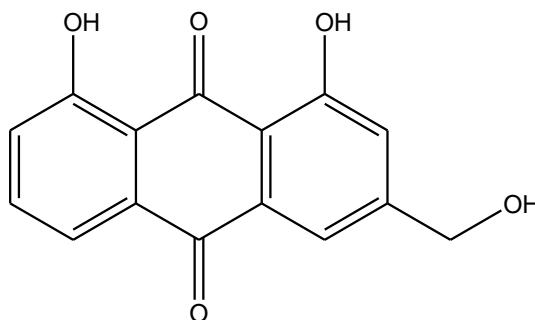


Obr. 5: anthrachinon

Anthrachinonové glykosidy se skládají z anthrachinonu a cukerné složky. Cukerná složka je nejčastěji glukóza a rhamnóza, které jsou vázané na prvním, šestém, či osmém uhlíku. Další substituent bývá obvykle v poloze 3. Obsah anthrachinonových látek se v rostlinách mění a to především zastoupení oxidovaných a redukovaných forem látek. Tyto změny se dějí v průběhu života rostlin, ale také v průběhu jejich skladování. (22, 23).

### 2.3.1.1 Aloe – emodin (1,8-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl)anthrachinon)

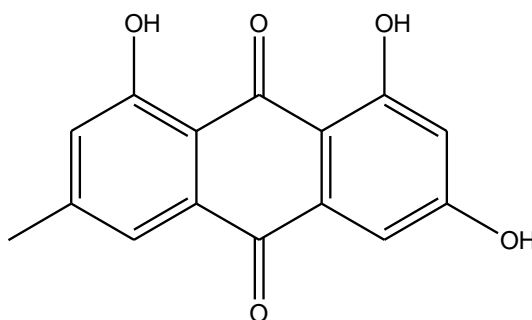
Jeho relativní molekulová hmotnost je 270 a sumární vzorec  $C_{15}H_{10}O_5$ . Registrační číslo CAS (Chemical Abstracts Service) je 481-72-1. Je to fluorescenční sloučenina s maximální excitační vlnovou délkou 410 nm a maximální emisní vlnovou délkou 510 nm. Byl izolován z *Rheum coreanum* jako oranžovo – žluté jehličky, které mají bod tání 223 – 224°C (24, 25, 26).



Obr. 6: aloe – emodin

### 2.3.1.2 Emodin (1, 3, 8 – tri hydroxy – 6 – methylantrachinon)

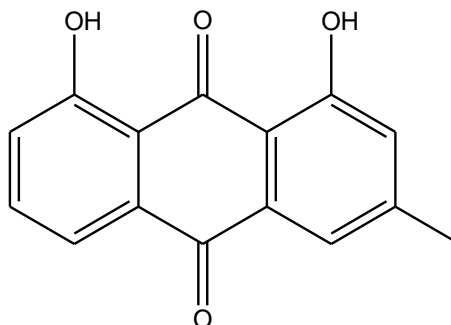
Jeho relativní molekulová hmotnost je 270 a sumární vzorec  $C_{15}H_{10}O_5$ . Registrační číslo CAS je 518-82-1. Je to sloučenina, která byla izolována z *Rheum coreanum* jako oranžové jehličky. Bod tání emodinu je 264 - 265°C. Při infračervené spektroskopii (IR spektroskopie) jeví absorpci při 3430  $cm^{-1}$  (OH), 2930  $cm^{-1}$  (C–H), 1684  $cm^{-1}$  (C=O), 1633  $cm^{-1}$  (chelátových C=O), 1559  $cm^{-1}$ , 1540  $cm^{-1}$  a 1480  $cm^{-1}$  (aromatických C=O). UV spektroskopie má absorpční maxima při 221 nm, 289 nm a 443 nm. Struktura byla potvrzena nukleární magnetickou rezonancí (NMR) (4, 27, 28).



Obr. 7: emodin

### 2.3.1.3 Chrysophanol (1,8-Dihydroxy-3-methylantrachinon)

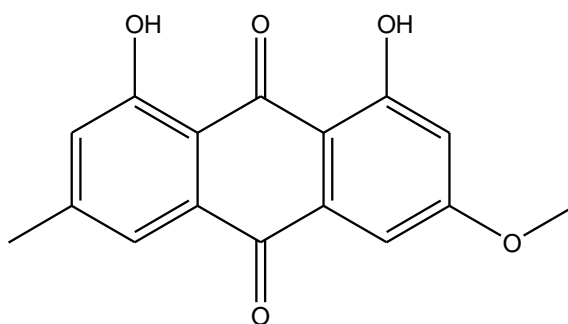
Jeho relativní molekulová hmotnost je 254 a sumární vzorec  $C_{15}H_{10}O_4$ . Registrační číslo CAS je 481-74-3. Byl získán z *Rheum coreanum* jako žluté jehličky. Jeho bod tání je 196 - 197°C. IR spektroskopie dává signál při 1626  $cm^{-1}$  (chelátových C=O), 1559  $cm^{-1}$ , 1540  $cm^{-1}$ , 1477  $cm^{-1}$  a 1456  $cm^{-1}$  (aromatických C=O). UV má absorpční maxima při 225 nm, 256 nm, 277 nm, 287 nm a 429 nm. H-NMR a C-NMR potvrzují strukturu látky (27, 29).



Obr. 8: chrysophanol

#### 2.3.1.4 Phycion (1, 8 – dihydroxy – 3 – methoxy – 6 – methylantrachinon)

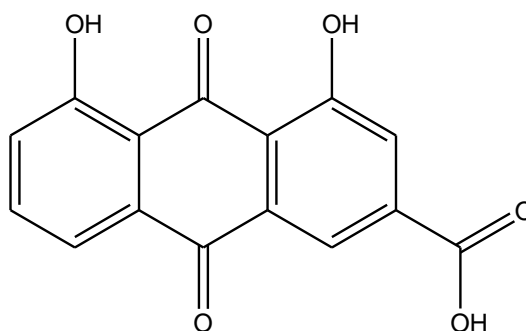
Jeho relativní molekulová hmotnost je 284 a sumární vzorec  $C_{16}H_{12}O_5$ . Registrační číslo CAS je 521-61-9. Byl izolován z *Rheum coreanum* jako oranžové jehličky. Bod tání je 207 - 208°C. Při IR spektroskopii jeví absorpci při 3430  $cm^{-1}$  (OH), 2925  $cm^{-1}$  (C-H), 1684  $cm^{-1}$  (volných C=O), 1625  $cm^{-1}$  (chelátových C=O), 1559  $cm^{-1}$ , 1540  $cm^{-1}$  a 1506  $cm^{-1}$  (aromatických C=O). UV má absorpční maxima při 223 nm, 253 nm, 286 nm a 437 nm. Identifikace byla potvrzena NMR ( $^1H$ -,  $^{13}C$ -) (27, 28).



Obr. 9: phycion

#### 2.3.1.5 Rhein (4, 5 – dihydroxyanthrachinon – 2 – karboxylová kyselina)

Jeho relativní molekulová hmotnost je 284 a sumární vzorec  $C_{15}H_8O_6$ . Registrační číslo je 478-43-3. Byl izolován z *Rheum coreanum* jako žluté jehličky nebo žluto – hnědý prášek. Jeho bod tání je 321 - 322°C. NMR potvrdila strukturu látky (30).

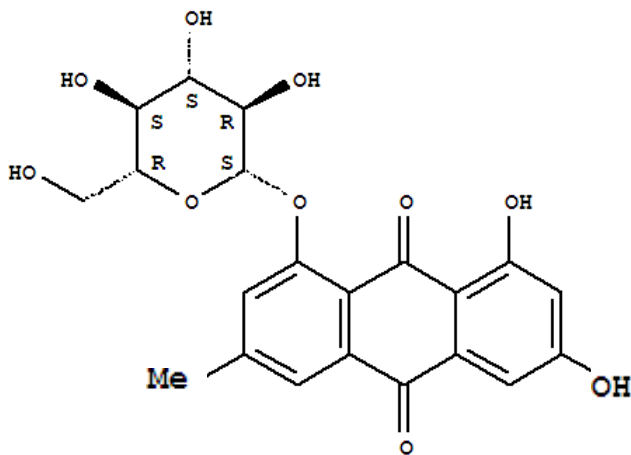


Obr. 10: rhein

#### 2.3.1.6 Aloe – emodin – 8 – O – $\beta$ – D – glukopyranosid

Jeho sumární vzorec je  $C_{21}H_{20}O_{10}$ . Byl izolován z *Rheum coreanum* jako žluté jehličky. Jeho bod tání je 237 - 238°C. IR spektrum dává hodnoty 3348  $cm^{-1}$  (OH), 2928

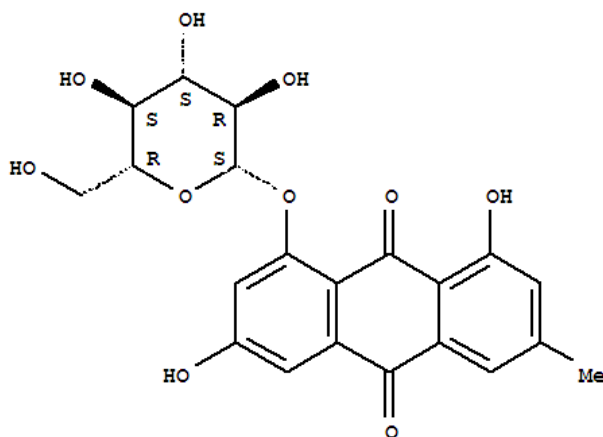
$\text{cm}^{-1}$ , (C-H),  $1641 \text{ cm}^{-1}$  (chelátových C=O),  $1077 \text{ cm}^{-1}$  (cukerných C-O),  $1584 \text{ cm}^{-1}$  a  $1447 \text{ cm}^{-1}$  (aromatických C-C). UV má absorpční maxima  $222 \text{ nm}$ ,  $253 \text{ nm}$ ,  $283 \text{ nm}$  a  $408 \text{ nm}$ . K potvrzení struktury byla použita NMR (27).



Obr. 11: aloë – emodin – 8 – O –  $\beta$  – D – glukopyranosid

### 2.3.1.7 Emodin - 8 – O – glukopyranosid

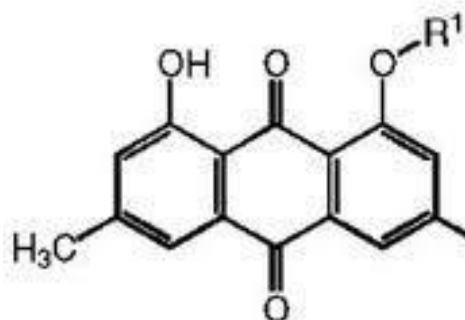
Jeho sumární vzorec je  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ . Byl izolován z *Rheum coreanum* jako oranžové jehličky, jejichž bod tání je  $190 - 191^\circ\text{C}$ . Při IR spektroskopii dává signál  $3410 \text{ cm}^{-1}$  (OH),  $1629 \text{ cm}^{-1}$  (chelátových C=O),  $1596 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1509 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1478 \text{ cm}^{-1}$  (aromatických C=C),  $1072 \text{ cm}^{-1}$  a  $1046 \text{ cm}^{-1}$  (cukerných C-O). UV absorpční maxima při  $221 \text{ nm}$ ,  $285 \text{ nm}$  a  $417 \text{ nm}$  (27).



Obr. 12: Emodin - 8 – O – glukopyranosid

### 2.3.1.8 Chrysophanol – 8 – O – $\beta$ – D – glukopyranosid

Jeho sumární vzorec je  $C_{21}H_{20}O_9$ . Byl izolován z *Rheum coreanum* jako žluté jehličky, které mají bod tání 259 - 260°C. IR spektroskopie dává signál 3385  $cm^{-1}$  (OH), 2920  $cm^{-1}$  (C-H), 1671  $cm^{-1}$  (volných C=O), 1632  $cm^{-1}$  (chelátových C=O), 1594  $cm^{-1}$ , 1448  $cm^{-1}$  (aromatických C=O). UV má absorpční maximum při 221 nm, 258 nm, 283 nm a 412 nm (27).



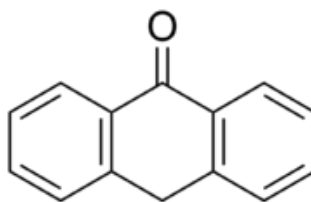
Obr. 13: chrysophanol – 8 – O –  $\beta$  – D – glukopyranosid, R1: Glc

### 2.3.2 Anthrony C – glukosidy

Anthrony jsou tricyklické aromatické ketony.

Systematický název: 10H – anthracen – 9 – on

Sumární vzorec:  $C_{14}H_{10}O$



Obr. 14: anthron

Anthronové C - glukosidy jsou tvořeny anthronem a cukernou složkou. Cukernou složku nejčastěji tvoří glukóza (31).

### 2.3.2.1 10 – hydroxykaskarosid C

Relativní molekulová hmotnost je 580 a jeho sumární vzorec je  $C_{27}H_{32}O_{14}$ . Byl získán z *Rheum australe* jako světle žlutá amorfnní látka, která má úhel optické otáčivosti  $[\alpha]_D^{21} - 41,2^\circ$ . IR spektroskopie jeví signál  $3392\text{ cm}^{-1}$  (OH),  $1634\text{ cm}^{-1}$  (chelátových C=O) a  $1573\text{ cm}^{-1}$  (aromatický kruh). Struktura byla potvrzena pomocí  $^1\text{H-NMR}$  a  $^{13}\text{C-NMR}$  (32).

### 2.3.2.2 10 – hydroxykaskarosid D

Relativní molekulová hmotnost je 580 a jeho sumární vzorec je  $C_{27}H_{32}O_{14}$ . Byl získán z *Rheum australe* jako světle žlutá amorfnní látka, s úhlem optické otáčivosti  $[\alpha]_D^{21} - 81,9^\circ$ . IR spektrum dává signál  $3393\text{ cm}^{-1}$  (OH),  $1636\text{ cm}^{-1}$  (C=O) a  $1573\text{ cm}^{-1}$  (aromatický kruh). UV má absorpční maxima při 263 nm, 298 nm a 325 nm (32).

### 2.3.2.3 10R – chrysaloin 1 – O – $\beta$ – D – glukopyranosid

Jeho relativní molekulová hmotnost je 564 a jeho sumární vzorec je  $C_{27}H_{32}O_{13}$ . Byl izolován z *Rheum australe* jako světle žlutá látka, který má úhel otáčivosti  $[\alpha]_D^{21} - 56,6^\circ$ . IR spektroskopie poskytuje signál  $3369\text{ cm}^{-1}$  (chelátových OH),  $1628\text{ cm}^{-1}$  (chelátových C=O) a  $1567\text{ cm}^{-1}$  (aromatický kruh) (32).

Z dalších anthronových glukosidů byly izolovány **kaskarosid C**, **kaskarosid D**, **kassialoin** a **8 – O –  $\beta$  – D (6' – O – acetyl) glukopyranosyl – chrysofanol** (32).

<p><math>\beta</math>-D-glucopyranosyl</p>		X $\varphi$	Y $\varphi$	R <sup>3</sup> $\varphi$	R <sup>6</sup> $\varphi$	R <sup>8</sup> $\varphi$
	aloin A $\varphi$	Glc $\varphi$	H $\varphi$	OH $\varphi$	H $\varphi$	H $\varphi$
	aloin B $\varphi$	H $\varphi$	Glc $\varphi$	OH $\varphi$	H $\varphi$	H $\varphi$
	cascaroside A $\varphi$	Glc $\varphi$	H $\varphi$	OH $\varphi$	H $\varphi$	Glc $\varphi$
	cascaroside B $\varphi$	H $\varphi$	Glc $\varphi$	OH $\varphi$	H $\varphi$	Glc $\varphi$
	cascaroside C $\varphi$	Glc $\varphi$	H $\varphi$	H $\varphi$	H $\varphi$	Glc $\varphi$
	cascaroside D $\varphi$	H $\varphi$	Glc $\varphi$	H $\varphi$	H $\varphi$	Glc $\varphi$
	cascaroside E $\varphi$	Glc $\varphi$	H $\varphi$	H $\varphi$	OH $\varphi$	Glc $\varphi$
	cascaroside F $\varphi$	H $\varphi$	Glc $\varphi$	H $\varphi$	OH $\varphi$	Glc $\varphi$
	chrysaloin A $\varphi$	Glc $\varphi$	H $\varphi$	H $\varphi$	H $\varphi$	H $\varphi$
chrysaloin B $\varphi$	H $\varphi$	Glc $\varphi$	H $\varphi$	H $\varphi$	H $\varphi$	

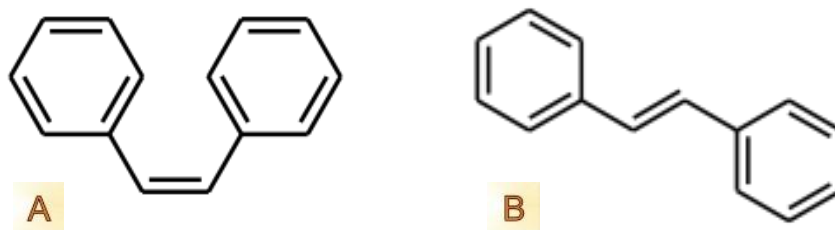
Obr. 15: kaskarosidy

### 2.3.3 Stilbeny

Jsou to uhlovodíky, kde ethen spojuje dvě fenylové skupiny. Existují jako dva možné izomery *cis* (*Z*) a *trans* (*E*). *Cis* izomer je méně stálý (33, 34).

Systematický název: 1, 2 – difenylethen

Sumární vzorec:  $C_{14}H_{12}$

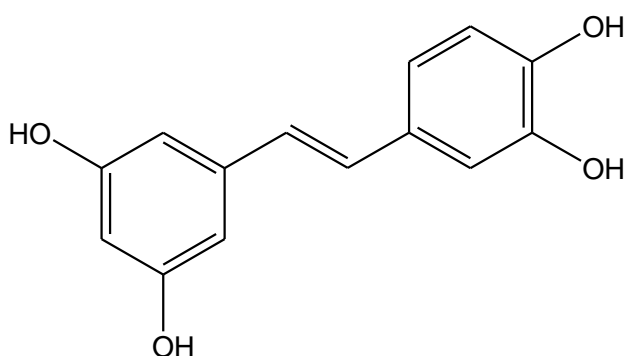


Obr. 16: A: (*Z*) – 1, 2 – difenylethen, B: (*E*) – 1, 2 – difenylethen

Hydroxylované deriváty stilbenů se nazývají **stilbenoidy**.

#### 2.3.3.1 Piceatannol (5 - [(*E*) – 2 - (3, 4 - dihydroxyfenyl) vinyl] benzen - 1, 3 – diol)

Jeho relativní molekulová hmotnost je 244 a sumární vzorec je  $C_{14}H_{12}O_4$ . Registrační číslo CAS je 10083-24-6. Byl izolován z *Rheum raphonticum* jako bílý krystalický prášek, jehož bod tání je 226 - 230°C (35, 36).

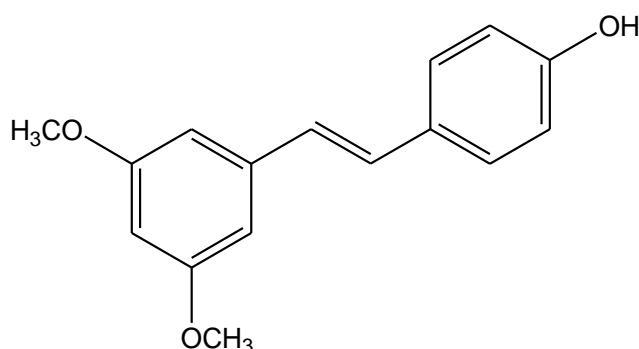


Obr. 17: piceatannol

#### 2.3.3.2 Pterostilben (4 - [(*E*) – 2 - (3, 5 - dimethoxyfenyl) ethenyl] fenol)

Jeho relativní molekulová hmotnost je 256 a sumární vzorec  $C_{16}H_{16}O_3$ . Registrační číslo CAS je 537-42-8. Byl izolován z *Rheum raphonticum* jako bílý

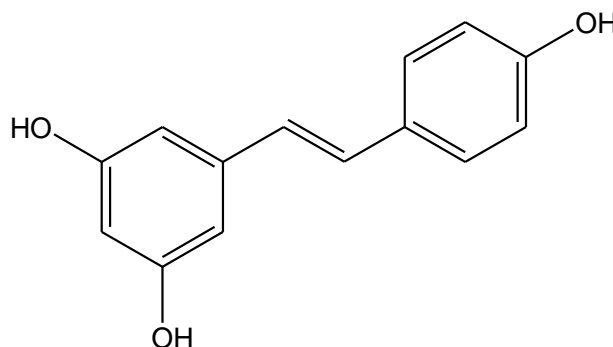
krystalický prášek, který má bod tání 85 - 88°C. UV má absorpční pás kolem 300 nm a dvě absorpční maxima při 309 nm a 325 nm (37, 38).



Obr. 18: pterostilben

### 2.3.3.3 Resveratrol (5 - [(E) - 2 - (4 - hydroxyfenyl) ethenyl] - 1, 3 - benzendiol)

Jeho relativní molekulová hmotnost je 228 a sumární vzorec  $C_{14}H_{12}O_3$ . Registrační číslo CAS je 501-36-0. Byl izolován z *Rheum raphonticum* jako bílý krystalický prášek, který může být někdy lehce nažloutlý a má bod tání 253 - 255°C. UV spektroskopie dává maximum 320 nm. Při hmotnostní spektrometrii byla zjištěna hodnota  $m/z$  227 [M-H]<sup>-</sup> (39, 40).



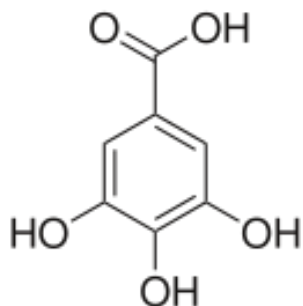
Obr. 19: resveratrol

### 2.3.4 Fenolické kyseliny

Jsou to látky, které mají fenolický kruh a funkční skupinu karboxylové kyseliny. Jsou známé jako mono -, di - nebo trihydroxybenzoové kyseliny. Příkladem fenolické kyseliny rodu *Rheum* je **kyselina gallová (kyselina 3, 4, 5 - hydroxybenzoová)**. Její



relativní molekulová hmotnost je 170 a sumární vzorec  $C_7H_6O_5$ . Registrační číslo CAS je 149-91-7. Byla izolována z *Rheum raphonticum* jako bílé nebo žlutobílé krystaly, které mají bod tání 250 - 253°C. UV má absorpční maxima při 220 nm a 271 nm (29, 41).



Obr. 20: kyselina gallová

## 2.4 Účinky na lidský organismus

Rostliny rodu *Rheum* jsou jako léčivé přípravky v asijské medicíně využívány už od starověku. Podle čínského lékopisu jsou sice tyto léčivé preparáty předepisovány jako sušené oddenky a kořeny tří druhů – *Rheum palatum* L., *R. tanguticum* Maxim. ex Balf. a *R. officinale* Baill., nicméně jsou využívány i jiné druhy tohoto rodu, např.: *R. australe*, *R. nobile*, *R. kialense* a další (4, 36, 42, 43).

Rostliny rodu *Rheum* jsou pro své **projímavé účinky** používány k léčbě zácpy a dále slouží jako **žaludeční tonikum** (3, 20, 32, 44, 45, 46). Při studiu bioaktivity látek z *Rheum palmatum* L. byl zjištěn **protizánětlivý efekt**, způsobený inhibicí oxidu dusnatého (NO), který je zánětlivým mediátorem (47, 48, 49, 50). V rámci protizánětlivých vlastností byly zkoumány i účinky na akutní pankreatitidu a bylo prokázáno, že extrakt z rostlin rodu *Rheum* **brání zánětu slinivky** (51). Rostliny tohoto rodu byly také využity k **léčbě různých syndromů způsobených obstrukcí krevního oběhu**, jako jsou bolestivé křeče při menstruaci (dysmenorea), nadměrné krvácení při menstruaci (hypermenorea) a zvracení krve (hemateméza) (43). Studie ukázaly, že látky z *Rheum undulatum* mohou také působit **proti srážení krve** (52). Extrakt z kořene *R. raphonticum* L. byl dále použit k **léčbě menopauzálních příznaků** a bylo zjištěno, že oproti placebo extrakt z rostlin rodu *Rheum* vykazoval lepší účinky (53). Další studie prokázala **vasorelaxační** vlastnosti stilbenů z extraktu *R. undulatum* (30). Některé studie

uvádějí použití tohoto rostlinného rodu také u **kožních onemocnění**. Z další účinků jsou známy například: **antialergický** efekt, působení **proti křečím** atd. (3, 20, 32, 44, 45, 54).

Mnoho studií se zabývá účinky jednotlivých látek. Náhodně vybrané účinky jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce.

Tab. 1: Obsahové látky a jejich fyziologické účinky

Obsahová látka	Účinek	Reference
(+)-catechin	antioxidační	55
gallová kyselina	protirakovinný, antioxidační	56, 57
lindleyin	fytoestrogen – zprostředkovává biologické reakce vyvolané estrogenem	58
RG - tannin	analgetický	59
rhatannin	snižuje hladinu dusíku močoviny v krvi, snižuje hladinu aminokyselin v krvi	60, 61

## 2.4.1 Účinky vybraných druhů rodu *Rheum*

### 2.4.1.1 Účinky *Rheum acuminatum* Hook. f. & Thomson

Z důvodu nedostatečného prozkoumání druhu *Rheum acuminatum* nejsou k dispozici studie, které by popisovaly účinky tohoto konkrétního druhu. Avšak díky znalostem jeho obsahových látek, lze jeho účinky odvodit a jsou tedy popsány v kapitole – Fyziologické účinky obsahových látek druhů *Rheum acuminatum* a *Rheum australe*.

### 2.4.1.2 Účinky *Rheum australe* D. Don

Řada studií potvrdila účinky antibakteriální a antifungální, což dokazuje **antiseptický efekt** (20, 62, 63, 64). Další studie potvrdila **antidiabetický efekt** snížením hladiny glukózy, což prokazoval methanolický extrakt z *R. australe* inhibičním působením na  $\alpha$  – glukosidázu (65, 66). Bylo také zjištěno, že extrakt z *R. emodi* má využití **při léčbě jaterních onemocnění**, díky **hepatoprotektivním** vlastnostem (67). Další ze studií se zabývala vlivem extraktu z oddenku *R. australe* na

signální dráhu exprese genu iNOS (inducibilní syntáza oxidu dusnatého) a uvolňování NO (oxidu dusnatého) z makrofágů, čímž působí jako **stimulant imunity**, díky uvolňování řady cytokinů (68, 69). Bylo zjištěno, že alkoholický extrakt *R. australe* má také účinek na **zlepšení funkce ledvin**, při poškození ledvinných tubulů nefrotoxickými látkami (70). Studie dále prokázaly, že má využití také jako **antioxidant** (71). Zjištěny byly i **protirakovinné účinky** (71).

#### 2.4.1.3 Fyziologické účinky obsahových látek druhů *Rheum acuminatum* a *Rheum australe*

*R. acuminatum* a *R. australe* obsahují řadu stejných látek, jejichž účinky jsou popsány v mnoha studiích. Tyto látky jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 2: Obsahové látky *Rheum acuminatum* a *Rheum australe* a jejich fyziologické účinky

Obsahová látka	Účinek	Reference
aloe - emodin	protirakovinný, antioxidační, antiseptický	24, 62, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79
emodin	protirakovinný, antioxidační, antiseptický, proti ateroskleróze	72, 73, 77, 78, 80, 81, 82, 83, 84
chrysophanol	protirakovinný, antioxidační, antiseptický, antidiabetický	62, 77, 85, 86, 87, 88
piceatannol	protirakovinný	89
pterostilben	protirakovinný, antioxidační, antidiabetický	90, 91, 92
phycion	antiseptický	62, 83
resveratrol	protirakovinný, antioxidační, antidiabetický, neuroprotektivní	89, 91, 93, 94, 95, 96, 97, 98
rhein	protirakovinný, antioxidační, antiseptický, proti ateroskleróze, inhibice jaterní fibrózy	62, 72, 77, 78, 99, 100, 101, 102

### 3 Cíl práce

Hlavními cíli této práce bylo:

1. Stanovit vybrané obsahové látky a jejich množství ve dvou druzích rodu *Rheum* – *Rheum acuminatum* Hook. f. & Thomson a *Rheum australe* D. Don.
2. Provést porovnání těchto dvou druhů z hlediska kvantity obsahových látek.
3. Provést porovnání těchto dvou druhů na základě množství obsahových látek z hlediska jejich původu – rostoucí v Himálajích a pěstovaných v České republice.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Stanovení obsahu anthrachinonů a stilbenů

#### 4.1.1 Extrakce anthrachinonů z rostlinného materiálu

##### 4.1.1.1 Použitý materiál

methanol pro HPLC, Lab – Scan, Polsko

aceton pro HPLC, Lab – Scan, ČR

deionizovaná voda pro HPLC, Sci – Aqua, SISW, ČR

sušené kořeny rostlin *Rheum acuminatum* a *R. australe*

##### 4.1.1.2 Použitá zařízení

váhy BOECO, Německo

ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex, Německo

vakuová odparka Büchi, Rotavapor R – 114, Švýcarsko

lyofilizační zařízení Free Zone 2.5, LABCONCO, USA

##### 4.1.1.3 Metodika

*Rheum acuminatum* a *R. australe* z České republiky byly kultivovány v Průhonicích na pokusných pozemcích AV ČR 3 roky. Kořeny rostlin byly lyofilizovány 3 dny dosucha. Lyofilizované kořeny jsem rozdrtila na třecí misce a jednotlivé vzorky zvažila. Rozdrcené kořeny jsem extrahovala do 30 ml směsi methanol:voda (7:3) a vložila na 5 minut do ultrazvukové lázně. Poté jsem vzorky filtrovala a filtrát jsem odpařila dosucha. Odparek jsem rozpustila ve 30 ml směsi aceton:voda (8:2) a vložila na 5 minut do ultrazvukové lázně, následně jsem vzorky znovu odpařila a opětovně rozpustila ve 30 ml acetonu (80%<sub>obj</sub>) a odpařila.

## **4.1.2 HPLC analýza**

### **4.1.2.1 Použitý materiál**

kyselina octová p.a., Penta, ČR

acetonitril pro HPLC, CHEM – LAB, Belgie

deionizovaná voda pro HPLC, Sci – Aqua, SISW, ČR

methanol pro HPLC, LAB – SCAN, Polsko

standardy antrachinonů – aloe – emodin, emodin, chrysophanol, rhein, SIGMA ALDRICH, USA

izolovaný standard physcionu

standardy stilbenů – piceatannol, pterostilben, resveratrol, SIGMA ALDRICH, USA

### **4.1.2.2 Použitá zařízení**

Přístroj HPLC:

Pumpa: Q – Grad, Watrex, ČR

Kolona: Phenomenex Gemini NX (25 x 4,6 mm), USA

Detektory: SpectraSystem, UV 6000 LP, Thermo Finnigan, US

fluorescenční detektor

Autosampler: Midas, Spark, Nizozemí

Termostat: Mistral, Spark, Nizozemí

mikrostřikačka Hamilton 10  $\mu\text{m}$  a 25  $\mu\text{m}$ , USA

### **4.1.2.3 Metodika**

Přítomnost antrachinonů ve vzorcích jsem zjišťovala metodou HPLC porovnáváním retenčních časů a UV spekter, případně odezvy fluorescenčního detektoru (FD) se standardy. Kvantitativní stanovení vzorků jsem prováděla pomocí porovnání poměru ploch píků ve vzorcích a jednotlivých standardech a výpočtem z rovnice kalibračních přímk.

Pro měření kalibrační křivky jsem standardy dávkovala stříkačkou Hamilton. Jako mobilní fáze jsem použila následující: mobilní fáze „A“ - směs vody s kyselinou octovou (0,25% objemových kys. octové) a mobilní fáze „B“ směs acetonitrilu s kyselinou octovou (0,25% objemových kys. octové). Analyzované látky jsem separovala pomocí gradientové eluce začínající na 20% fáze B a pokračující do 50-té

minuty na 100% fáze B s následným promýváním 100% fáze B po dobu 10 minut a na závěr 10 minutovou ekvilibrací počátečním poměrem fází. Průtok mobilní fáze byl 1 ml\*min<sup>-1</sup> a teplota kolony byla nastavena na 30°C po celou dobu analýzy. K získání výsledků jsem použila UV detektor s maximy při 254 nm a 280 nm a fluorescenční detektor s excitací při 435 nm a emisí při 515 nm.

Přítomnost stilbenů jsem zjišťovala metodou HPLC za stejných podmínek jako antrachinony.

### **Kalibrační křivka anthrachinonů**

Pro výpočet kalibrační křivky jsem připravila ředící řadu methanolických roztoků standardů v rozsahu koncentrací od 2 do 250 µg/ml. Pro kalibraci jsem použila velikosti ploch píků jednotlivých látek. Na základě analýzy standardů jsem stanovila limity detekce (LD) a stanovitelnosti (LQ). Tyto limity jsem určila jako poměr odezvy k šumu v poměru 3:1 (v případě LD) a v poměru 10:1 (v případě LQ).

### **Kalibrační křivka stilbenů**

Kalibrační křivku jsem připravila ředící řadou methanolových roztoků standardů v rozsahu koncentrací od 0,1 do 50 µg/ml. Kalibrační křivka sloužila ke kvantitativnímu určení odezvy a LD a LQ.

### **Analýza anthrachinonů ve vzorcích**

Vzorek jsem rozpouštěla ve 4 ml směsi methanolu a acetonu (1:1) asi 20 min. Dále jsem vzorek vložila na 2 min do ultrazvukové lázně. Odpipetovala jsem 100 µl do plastové mikrozkušavky a 5 min centrifugovala při 12000 rpm (otáčky za minutu). Čirý supernatant jsem nastříkla pomocí mikrostříkačky Hamilton k analýze na HPLC.

### **Analýza stilbenů ve vzorcích**

Vzorek jsem zpracovala stejně jako u analýzy antrachinonů a měřila na HPLC.

## **4.2 Izolace předpokládaného phycionu a jeho určení**

### **4.2.1 Izolace předpokládaného phycionu**

#### **4.2.1.1 Použitý materiál**

kyselina octová p.a., Penta, ČR

acetonitril pro HPLC, CHEM – LAB, Belgie

deionizovaná voda pro HPLC, Sci – Aqua, SISW, ČR

methanol pro HPLC, LAB – SCAN, Polsko

extrakty vzorků

#### **4.2.1.2 Použitá zařízení**

Přístroj HPLC:

Pumpa: Q – Grad, Watrex, ČR

Kolona: Phenomenex Gemini NX (25 x 4,6 mm), USA

Detektory: SpectraSystem, UV 6000 LP, Thermo Finnigan, USA

fluorescenční detektor

Autosampler: Midas, Spark, Nizozemí

Termostat: Mistral, Spark, Nizozemí

Mikrostříkačka Hamilton 10  $\mu\text{m}$  a 25  $\mu\text{m}$

#### **4.2.1.3 Metodika**

##### **HPLC separace vzorku**

Z již analyzovaných vzorků jsem zvolila extrakt s nejvyšším obsahem phycionu a rozpustila ho ve 4 ml směsi methanolu a acetonu (1:1). Vzorek jsem dále vložila na 2 min do ultrazvukové lázně. Z rozpuštěného vzorku jsem odebrala 100  $\mu\text{l}$  do plastové zkumavky a 5 min centrifugovala při 12000 rpm. Supernatant jsem převedla pomocí mikrostříkačky Hamilton na kolonu HPLC. V průběhu HPLC analýzy jsem do vialky jímala frakci odpovídající phycionu. Celý postup jsem opakovala 5x.



## 4.2.2 Identifikace předpokládaného physcionu

### 4.2.2.1 Použitý materiál

kyselina chlorovodíková p.a., Penta, ČR

n-hexan pro GC, Fluka, Švýcarsko

ethylacetát pro GC, SIGMA ALDRICH, USA

tetramethylamonium hydroxid pentahydrát (TMAH), SIGMA ALDRICH, USA

dimethylsufoxid (DMSO), SIGMA ALDRICH, USA

methyljodid, SIGMA ALDRICH, USA

### 4.2.2.2 Použitá zařízení

Plynový chromatogram s MS detekcí:

Plynový chromatograf: TRACE GC Ultra (Thermo, USA)

Hmotnostní spektrometr: ITQ 1100 (Thermo, USA)

Kolona: TR-5 MS SQS, 30 m, 0,25 mm ID, 0,25  $\mu$ m

Zařízení pro přímý vstup: Direct Exposure Probe (DEP)

### 4.2.2.3 Metodika

#### Methylace frakce physcionu

Jímanou frakci physcionu jsem odpařila proudem dusíku. K odparku jsem přidala 7 mg TMAH a 150  $\mu$ l DMSO, opatrně promíchala a nechala 2 min reagovat. Dále jsem přidala 10  $\mu$ l methyljodidu a nechala opět 2 min reagovat. Reakci jsem ukončila přidáním 200  $\mu$ l 0,1 N kyseliny chlorovodíkové a promíchala. Tuto směs jsem extrahovala do 1 ml směsi hexanu a ethylacetátu (3:1). Horní organickou vrstvu jsem oddělila a odpařila. Odparek jsem rozpustila v 50  $\mu$ l ethylacetátu a takto zpracovaný vzorek analyzovala na hmotnostním spektrometru.

#### MS analýza

Vzorek jsem nanasla na sondu přímého vstupu a nechala zahřát na 40°C, aby se odpařilo rozpouštědlo. Sondu jsem poté vsunula do prostoru iontového zdroje a zahřívala teplotním gradientem jdoucím od 30°C na 300°C. Signál byl snímán po dobu 5 minut.

Pro analýzu pomocí GC/MS derivatizovaných látek, byla použita následující metoda: Jako nosný plyn bylo použito helium, jehož průtok byl  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Teplota injektoru byla  $280^\circ\text{C}$  a teplota přechodové zóny také  $280^\circ\text{C}$ . Analýza probíhala za teplotního gradientu začínajícího na teplotě  $60^\circ\text{C}$  a teplota byla postupně zvyšována po  $3^\circ\text{C}$  až na  $300^\circ\text{C}$ . MS analýza probíhala v rozsahu  $50 - 650 \text{ m/z}$  (hmotnost/náboj). Ionizační podmínky pro přímý vstup byly následující: doba analýzy 2 minuty, teplota zdroje  $200^\circ\text{C}$ , emisní proud  $250 \mu\text{A}$  a ionizační energie  $-70 \text{ eV}$ .

Vzniklé ionty byly separovány v iontové pasti a fokusovány na detektor, který poskytuje elektrický signál úměrný jejich počtu. Signál byl dále zesílen, digitalizován a softwarově zpracován.

### 4.3 Statistické zpracování výsledků

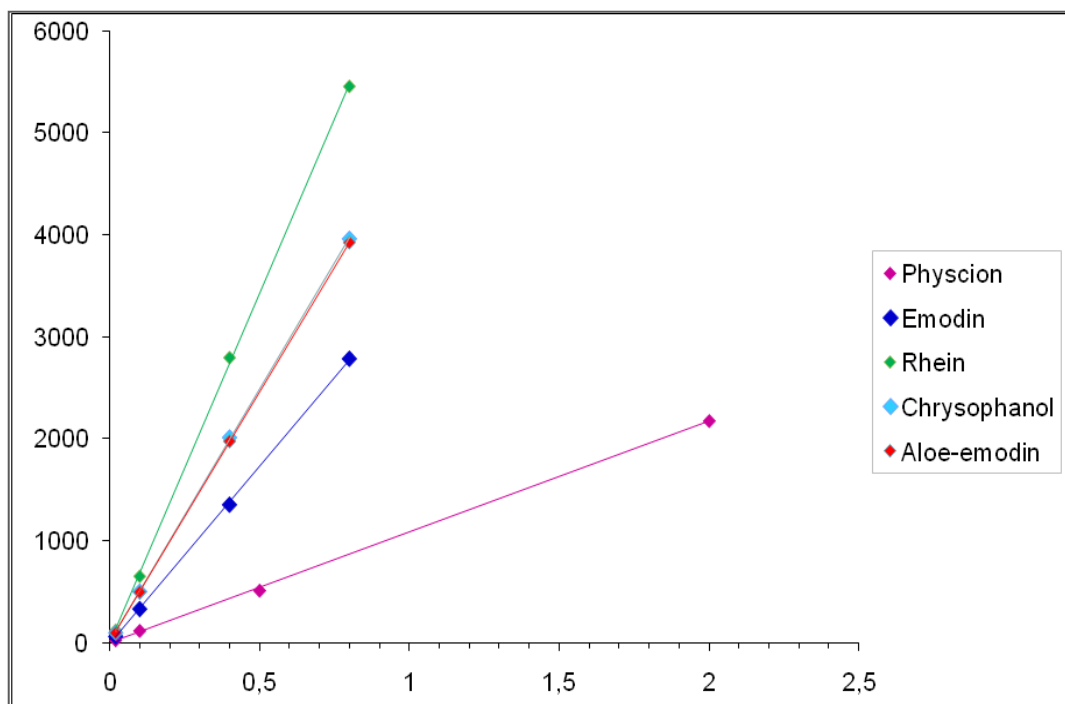
Statistické vyhodnocení jsem provedla metodami vícerozměrných statistických analýz: metodou klastrové analýzy a analýzou hlavních komponent (PCA – Principal Component Analysis). Cílem klastrové analýzy je nalézt v celém souboru dat takové skupiny objektů, které jsou si navzájem blízké nebo podobné, ale které se liší od objektů ostatních skupin (103). PCA je v teorii signálu transformace sloužící k dekorelaci dat. Často se používá ke snížení dimenze dat s co nejmenší ztrátou informace (104). Vlastní analýzu a výpočty jsem zpracovala pomocí programu Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA).

Pro korelovanost koncentrací měřených látek byly vypočteny korelační koeficienty.

K porovnání rozdílů v koncentraci jednotlivých látek mezi *Rheum acuminatum* a *R. australe* jsem použila analýzu rozptylu (ANOVA) s následným Tukeyho testem.

## 5 Výsledky

### 5.1 Kalibrace anthrachinonů

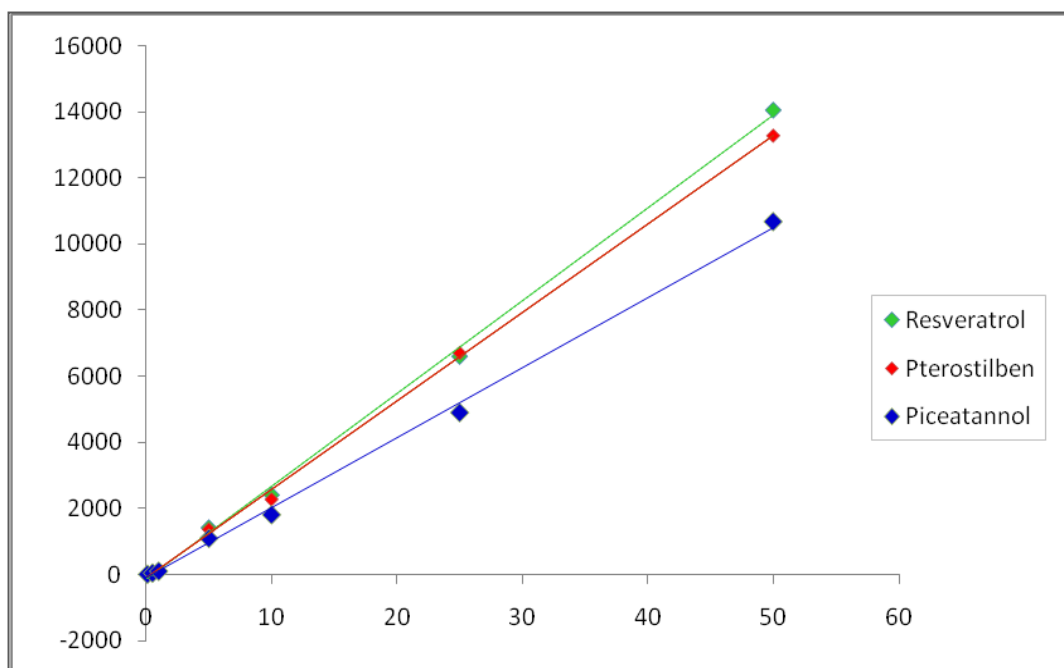


Obr. 21: Kalibrační křivky anthrachinonů

Tab. 3: Regresní rovnice a korelační koeficienty pro jednotlivé anthrachinony

Anthrachinony	Regresní rovnice	R <sup>2</sup>	LD (µg/ml)	LQ (µg/ml)
Aloe – emodin	$y = 49,03x - 4,7$	R <sup>2</sup> = 1	1,51	5,03
Emodin	$y = 34,843x - 15,889$	R <sup>2</sup> = 0,9998	2,43	8,10
Chrysophanol	$y = 49,585x + 11,362$	R <sup>2</sup> = 0,9999	2,28	7,60
Phycion	$y = 10,874x - 4,3298$	R <sup>2</sup> = 0,9997	1,76	5,88
Rhein	$y = 68,676x - 12,899$	R <sup>2</sup> = 0,9997	2,40	8,01

## 5.2 Kalibrace stilbenů



Obr. 22: Kalibrační křivky stilbenů

Tab. 4: Regresní rovnice a korelační koeficienty jednotlivých stilbenů

Stilbeny	Regresní rovnice	R <sup>2</sup>	LD (µg/ml)	LQ (µg/ml)
Piceatannol	$y = 212,19x - 102,74$	$R^2 = 0,9979$	0,58	1,95
Pterostilben	$y = 267,35x - 86,371$	$R^2 = 0,9991$	0,37	1,22
Resveratrol	$y = 280,55x - 134,4$	$R^2 = 0,9987$	0,36	1,19

LD – limit detekce

LQ – limit stanovitelnosti

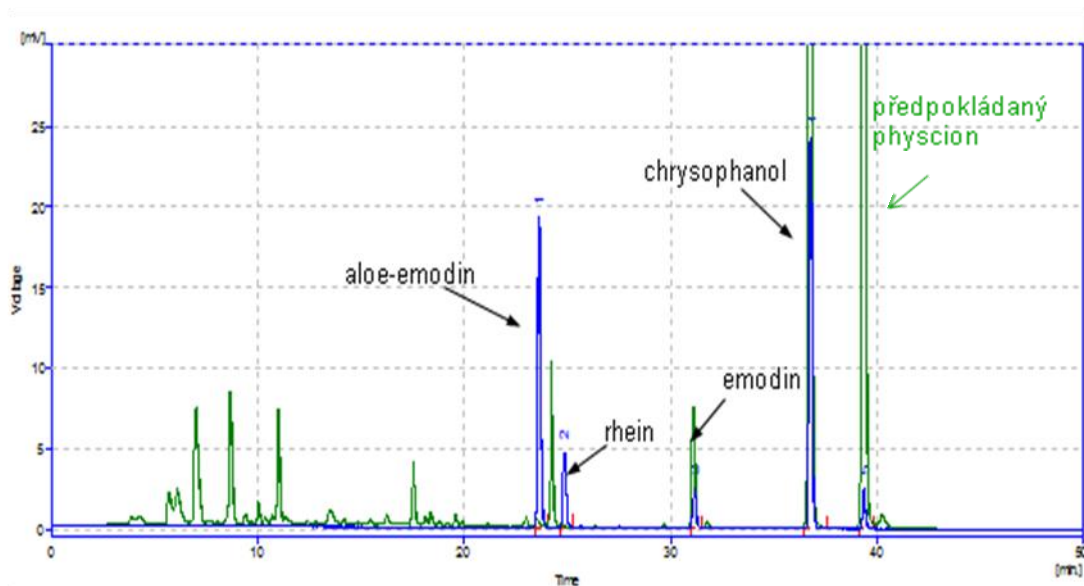
Tabulky 3 a 4 uvádí korelační koeficienty a korekční faktory, které sloužily pro výpočet obsahů anthrachinonů a stilbenů.

## 5.3 UV – VIS absorpční spektra anthrachinonů a stilbenů

Spektra jsou uvedena v kapitole Přílohy.

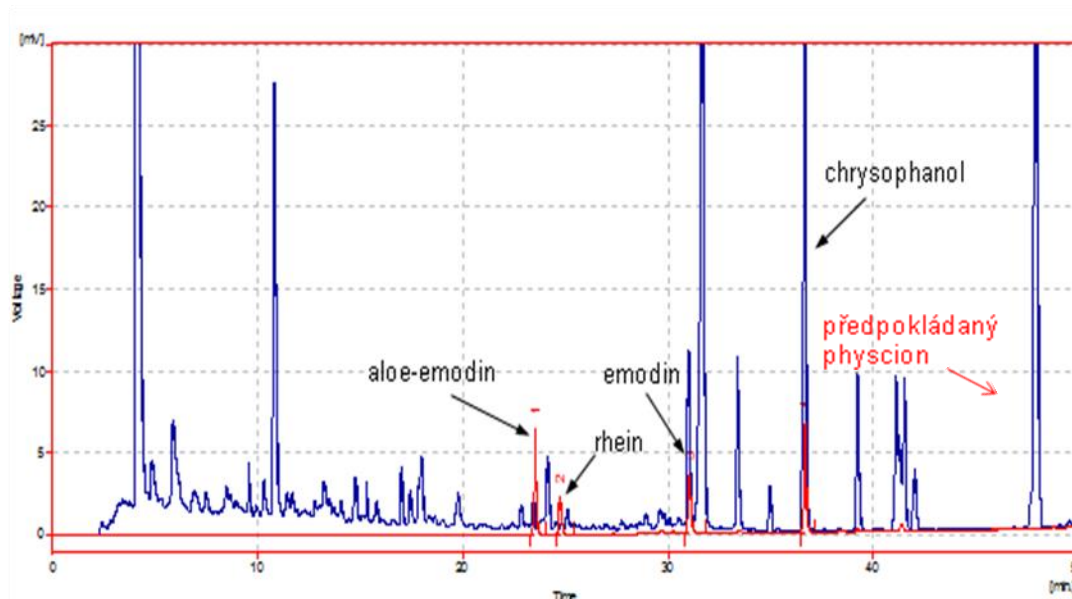
Ze spekter je patrné, že aloe – emodin, chryzophanol a rhein mají tři a emodin a physcion mají čtyři výrazná absorpční maxima. Stilbeny mají absorpční spektra jednodušší, pouze se dvěma výraznými absorpčními maximy. Maxima slouží k identifikaci látky, porovnáním se spektry standardů. Při UV – VIS detekci, lze také výsledky vyhodnocovat srovnáním se spektry z knihovny vytvořené na základě standardů, což může značně pomoci při rutinní identifikaci látek.

## 5.4 HPLC analýza anthrachinonů



Obr. 23: Porovnání chromatogramů fluorescenční detekce standardů a vzorku:

modré – standardy, zelené – vzorek



Obr. 24: Porovnání chromatogramů detekce PDA – UV absorbance standardů a vzorku:

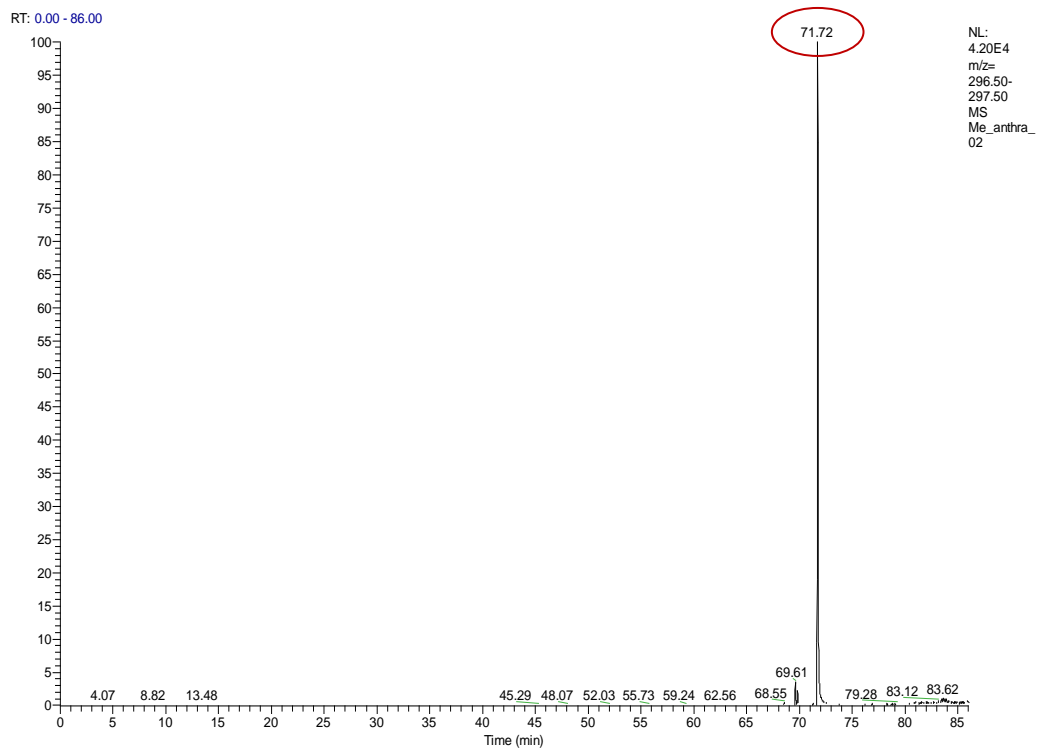
červené – standardy, modré – vzorek

Díky srovnání chromatogramu standardu a vzorku, lze kvalitativně identifikovat látky obsažené ve vzorcích. Při zachování stejných podmínek analýzy, je při překrytí chromatogramu zřejmé, které píky se shodují. Ve vzorcích byl patrný výrazný pík, který byl předběžně označen jako physcion, neboť jeho přítomnost je vzhledem k charakteru rostlinného materiálu vysoce pravděpodobná, a byl dále analyzován.

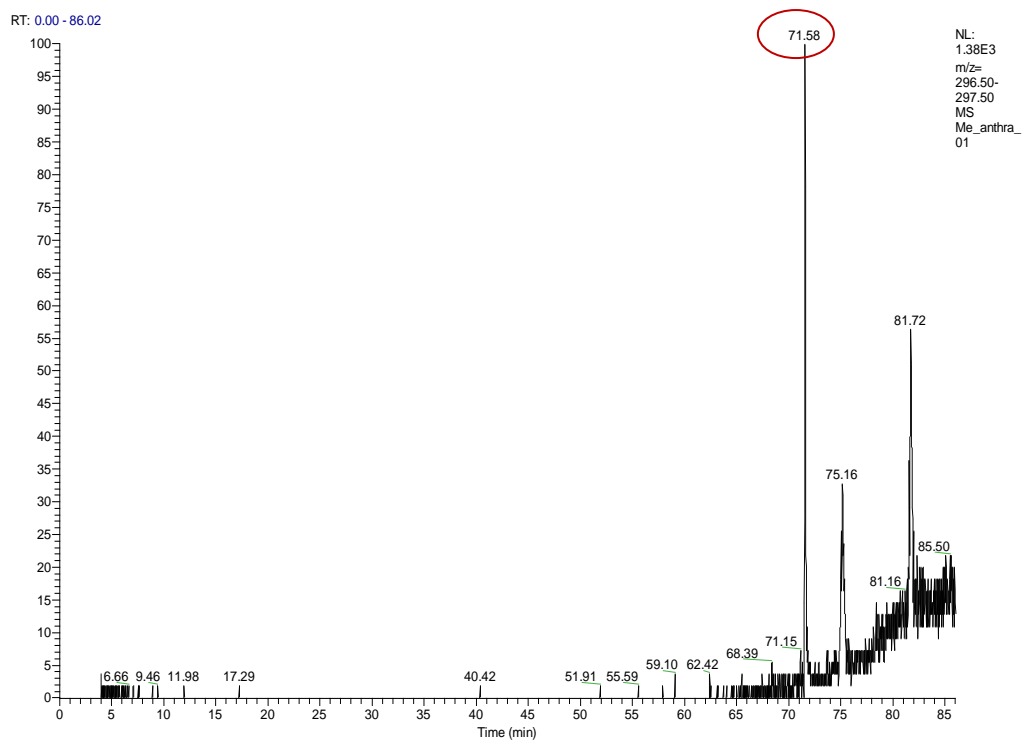
## 5.5 Analýza předpokládaného physcionu

### 5.5.1 GC/MS analýza methylovaného physcionu a methylovaného emodinu

Ze struktury emodinu a physcionu je patrné, že physcion je methylovaný emodin s methylovanou OH skupinou v poloze 3. Lze tedy předpokládat, že methylací emodinu a methylací physcionu vznikne látka totožné struktury. Pro potvrzení tohoto předpokladu byly obě methylované látky analyzovány pomocí GC/MS a jejich retenční časy a hmotnostní spektra porovnány.



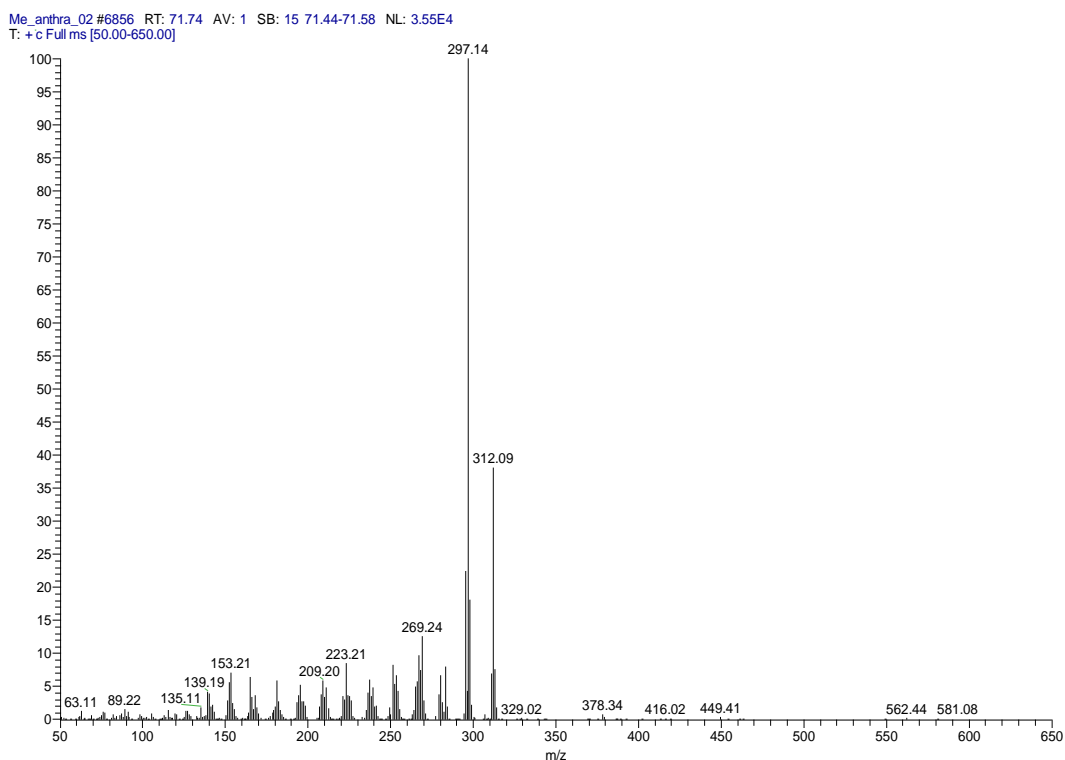
Obr. 25: chromatogram metylovaného emodinu



Obr. 26: chromatogram metylovaného physcionu

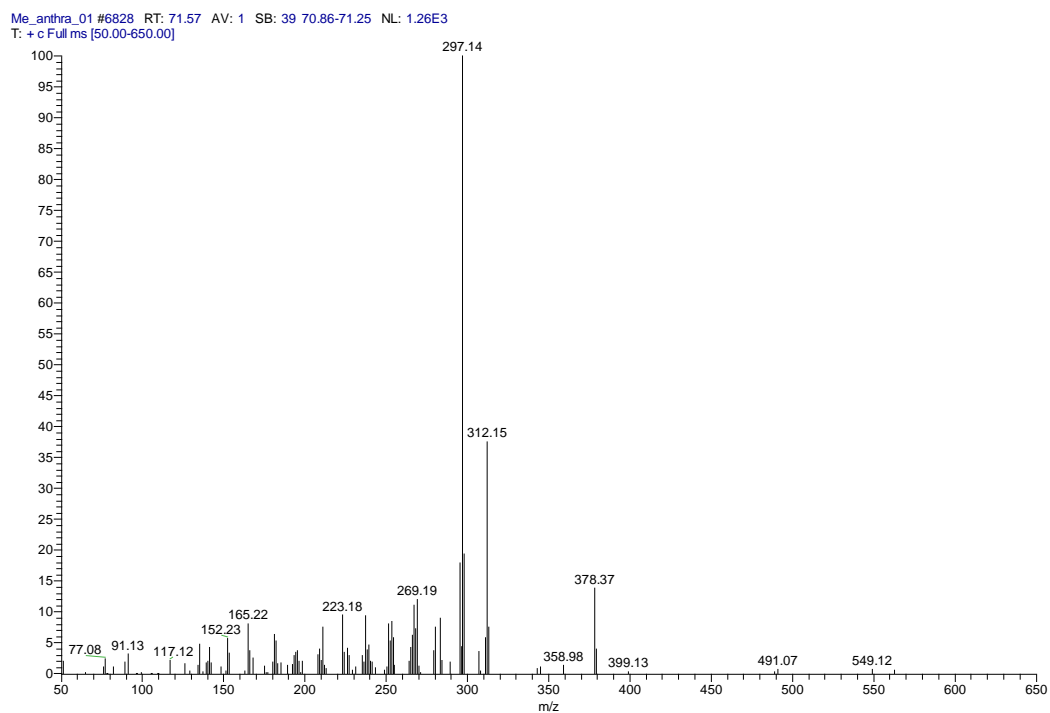
Z uvedených chromatogramů, je patrné, že retenční časy obou methylovaných látek se téměř shodují (u methylovaného emodinu je hodnota retenčního času 71,72 min a u methylovaného physcionu je to 71,58 min) a že se tedy jedná o tutéž látku.

U obou vzorků bylo provedeno porovnání MS spekter příslušných píků, která jsou uvedena na následujících obrázcích 27 a 28.



Obr. 27: hmotnostní spektrum methylovaného emodinu (RT 71,72 min)





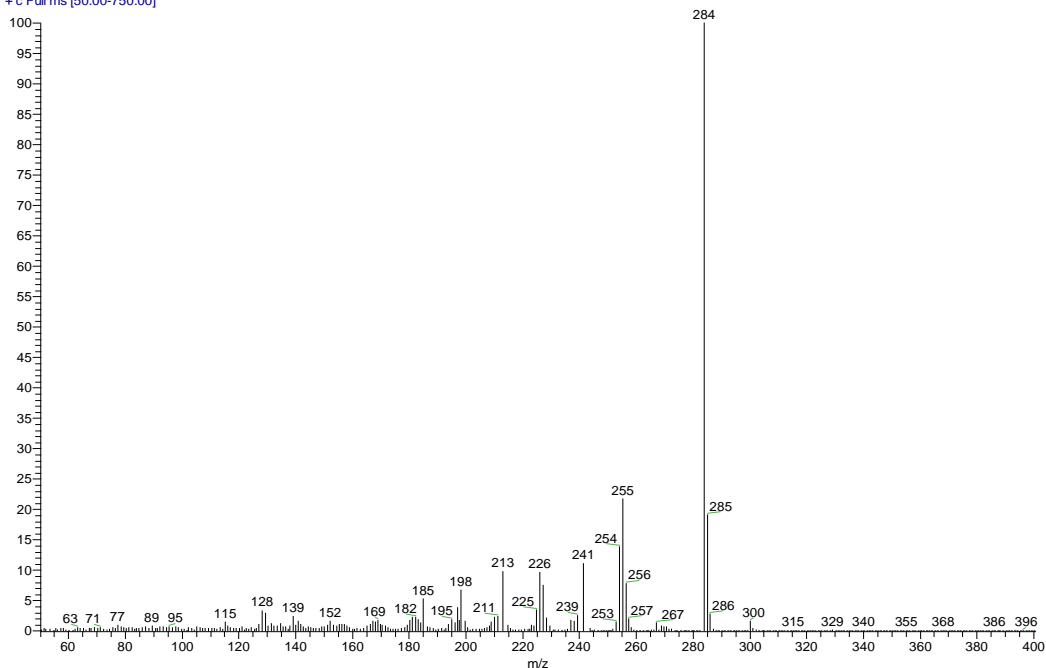
Obr. 28: hmotnostní spektrum methylovaného physcionu (RT 71,58)

Z hmotnostních spekter obou methylovaných látek je patrné, že se jedná o tutéž látku.

Výsledky MS analýzy příslušných píků potvrzují, že metylací emodinu a pravděpodobného physcionu vzniká tatáž látka a díky tomu, lze předpokládat, že izolovaná látka je skutečně physcion.

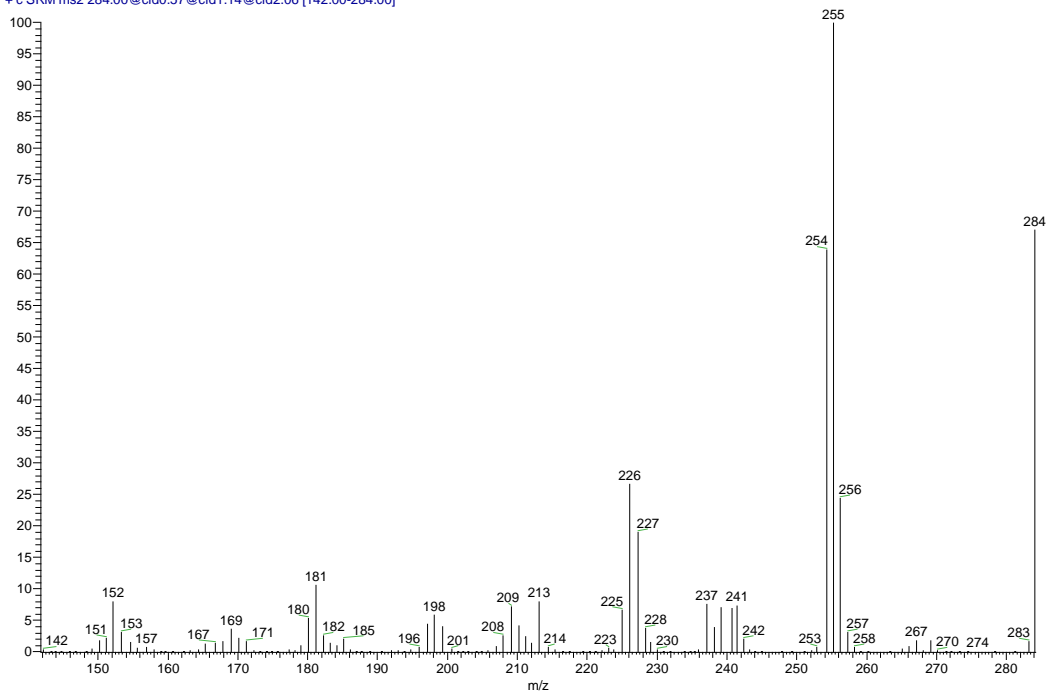
## 5.5.2 Analýza MS<sup>2</sup> a porovnání s knihovnou NIST

Anthracin-nezn\_01 #60 RT: 0.67 AV: 1 NL: 8.22E7  
T: +c Full ms [50.00-750.00]



Obr. 29: MS nederivatizovaného physcionu

Anthracin-nezn\_MS01 #75 RT: 0.66 AV: 1 SB: 137 0.79-1.94 NL: 1.45E6  
T: +c SRM ms2 284.00@cid0.57@cid1.14@cid2.06 [142.00-284.00]



Obr. 30: MS<sup>2</sup> nederivatizovaného physcionu

Na Obr. 29 je uvedeno MS nederivatizovaného physcionu s výchozím mateřským iontem 284, z něhož vychází MS<sup>2</sup> nederivatizovaného physcionu, které je na Obr. 30.

Tato spektra se shodovala se spektry uváděnými v knihovně.

## 5.6 Obsah a porovnání rozdílů v koncentraci jednotlivých látek mezi *Rheum acuminatum* a *R. australe*

Signifikance rozdílů byla testována na hladině pravděpodobnosti  $p \leq 0,05$ .

P – Průhonice

P1 – Průhonice, rostliny z lokality Mirki Bhir

P2 – Průhonice, rostliny z lokality Ponjo Kharka

N – Nepál

Tab. 5: Obsah anthrachinonů a stilbenů ve vzorcích – výchozí data

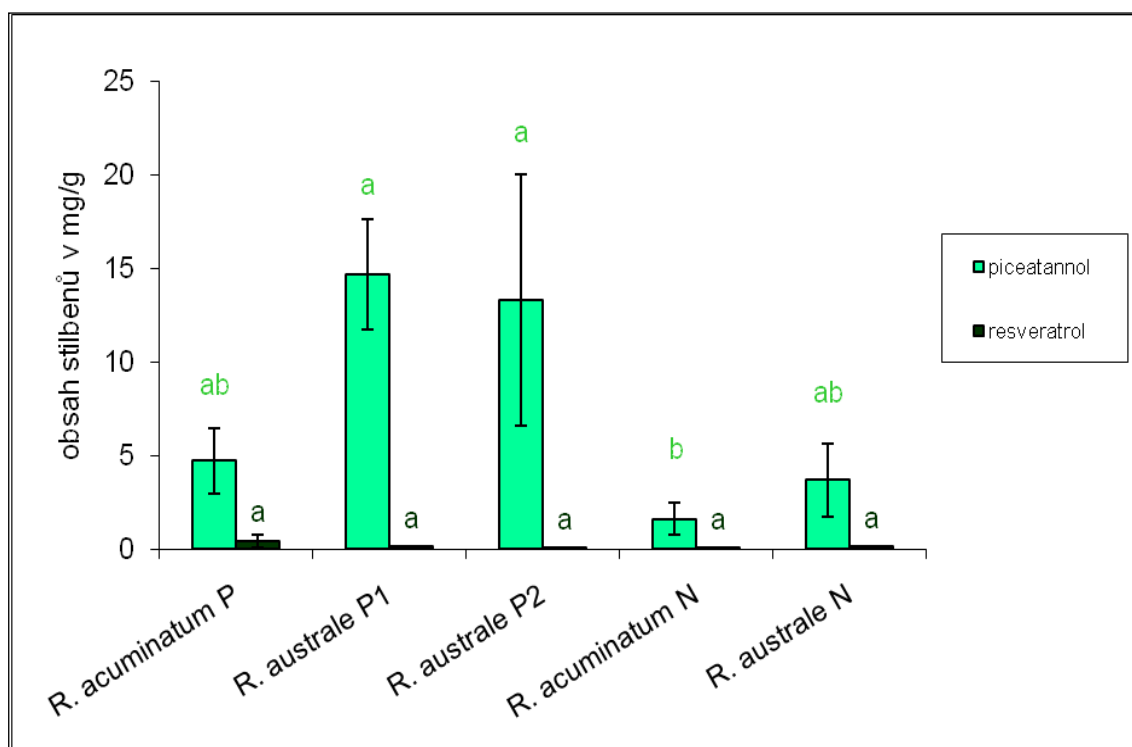
druh	mg/g sušiny						
	piceatannol	resveratrol	aloe - emodin	rhein	emodin	chryzophanol	physcion
<i>R. acuminatum</i> P	4,327	0,029	tr.	0	0,319	0,289	0,602
<i>R. acuminatum</i> P	2,832	0,860	tr.	0	0,446	0,407	0,768
<i>R. acuminatum</i> P	7,015	0,501	tr.	0	0,634	0,888	0,929
<i>R. australe</i> P1	18,496	0,196	tr.	0	0,121	0,356	0,451
<i>R. australe</i> P1	11,296	0,176	tr.	0	0,155	0,223	0,305
<i>R. australe</i> P1	14,230	0,123	tr.	0	0,130	0,421	0,472
<i>R. australe</i> P2	3,968	0,026	tr.	0	0,081	0,217	0,254
<i>R. australe</i> P2	19,534	0,119	tr.	0	0,255	0,613	0,780
<i>R. australe</i> P2	16,441	0,066	tr.	0	0,210	0,638	0,780
<i>R. acuminatum</i> N	2,534	0,088	0,018	0,003	16,720	7,235	4,116
<i>R. acuminatum</i> N	1,926	0,072	0,027	0,006	12,118	10,831	6,562
<i>R. acuminatum</i> N	0,460	0,036	0,456	0,003	16,889	8,140	3,241
<i>R. australe</i> N	4,259	0,163	0,012	0,001	2,912	9,871	2,098
<i>R. australe</i> N	5,771	0,189	0,012	0,002	4,253	11,659	3,054
<i>R. australe</i> N	1,061	0,078	0,050	0,001	2,592	10,354	3,580

tr. - stopová množství

Tab. 6: Průměrné hodnoty obsahu anthrachinonů a stilbenů ve vzorcích

druh	mg/g sušiny						
	piceatannol	resveratrol	aloe-emodin	rhein	emodin	chryzophanol	physcion
<i>R. acuminatum P</i>	4,73 ± 1,73	0,46 ± 0,34	0,00	0,00	0,47 ± 0,13	0,53 ± 0,26	0,77 ± 0,13
<i>R. australe P1</i>	14,67 ± 2,96	0,17 ± 0,03	0,00	0,00	0,14 ± 0,01	0,33 ± 0,08	0,41 ± 0,07
<i>R. australe P2</i>	13,31 ± 6,73	0,07 ± 0,04	0,00	0,00	0,18 ± 0,07	0,49 ± 0,19	0,61 ± 0,25
<i>R. acuminatum N</i>	1,64 ± 0,87	0,07 ± 0,02	0,17 ± 0,20	0,00	15,24 ± 2,21	8,74 ± 1,53	4,64 ± 1,41
<i>R. australe N</i>	3,70 ± 1,96	0,14 ± 0,05	0,03 ± 0,02	0,00	3,25 ± 0,72	10,63 ± 0,76	2,91 ± 0,61

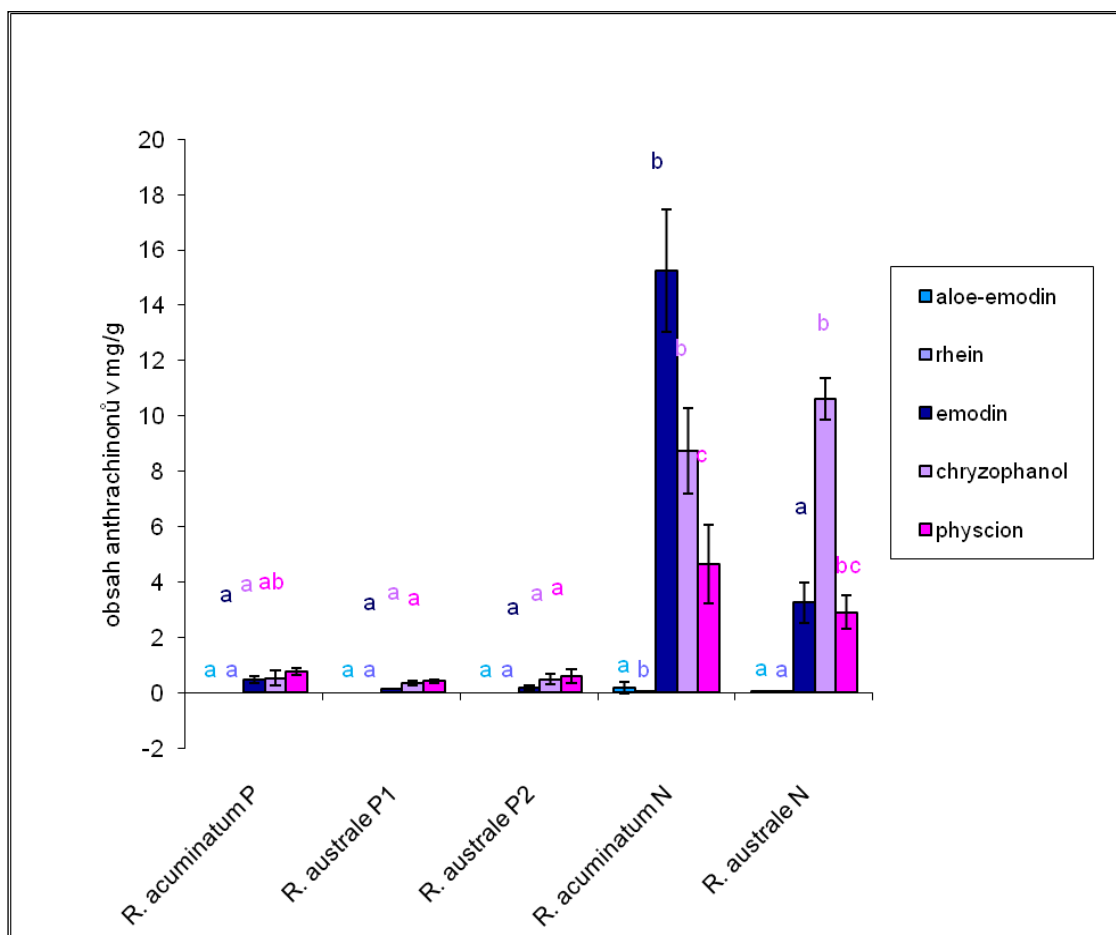
Z Tab. 5 a Tab. 6 je patrné, že v žádném analyzovaném vzorku nebyl stanoven pterostilben. Ve vzorcích z Průhonice nebyl prokázán rhein a aloe – emodin byl přítomen pouze ve stopových množstvích, zatímco ve vzorcích z Nepálu byly přítomny všechny anthrachinony.



Graf 1: Porovnání průměrných hodnot obsahu stilbenů. Písmena nad sloupci vyjadřují shodu/rozdíly mezi jednotlivými druhy v rámci koncentrací příslušné látky (ANOVA).

Graf 1 uvádí srovnání průměrného množství stilbenů ve vzorcích přepočtených na jednotku hmotnosti (mg/g).

Ve vzorcích nebyl detekován pterostilben, proto není v grafu uveden.

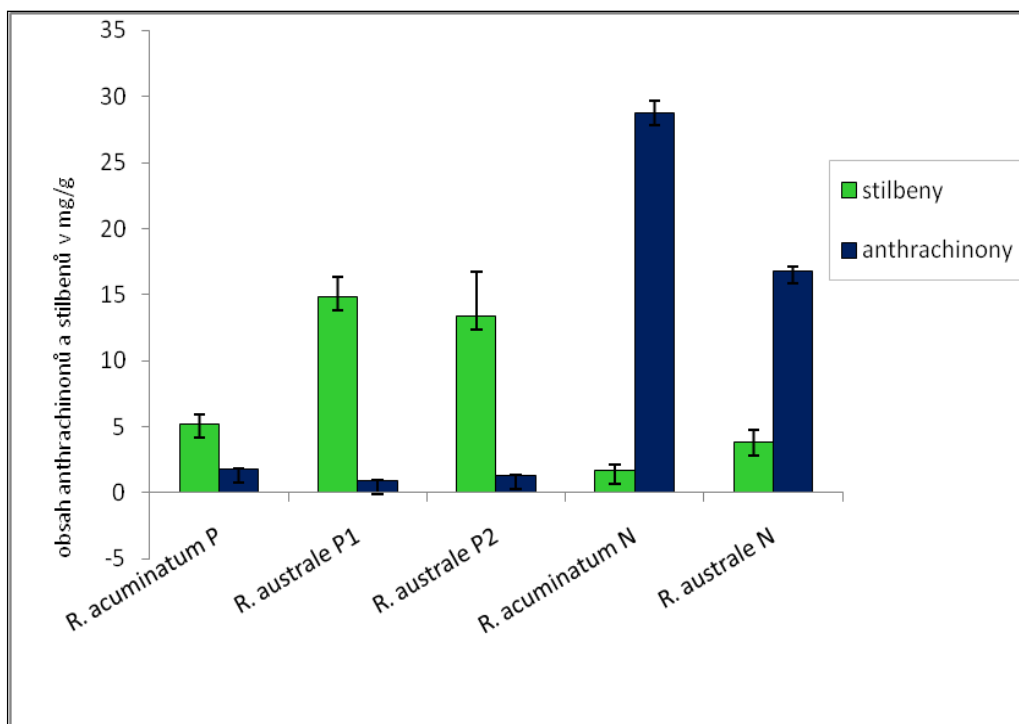


Graf 2: Porovnání průměrných hodnot obsahu anthrachinonů. Písmena nad sloupci vyjadřují shodu/rozdíly mezi jednotlivými druhy v rámci koncentrací příslušné látky (ANOVA).

Graf 2 uvádí srovnání obsahu anthrachinonů ve vzorcích v mg/g. U žádného ze vzorků z Průhonic nebyl prokázán rhein, aloë – emodin byl přítomen pouze ve stopovém množství (viz též tab. 5).

Tab. 7: Celková suma anthrachinonů a stilbenů v jednotlivých druzích

	mg/g sušiny	
	stilbeny	anthrachinony
<i>R. acuminatum P</i>	5,188	1,760
<i>R. australe P1</i>	14,839	0,878
<i>R. australe P2</i>	13,384	1,276
<i>R. acuminatum N</i>	1,705	28,789
<i>R. australe N</i>	3,840	16,816

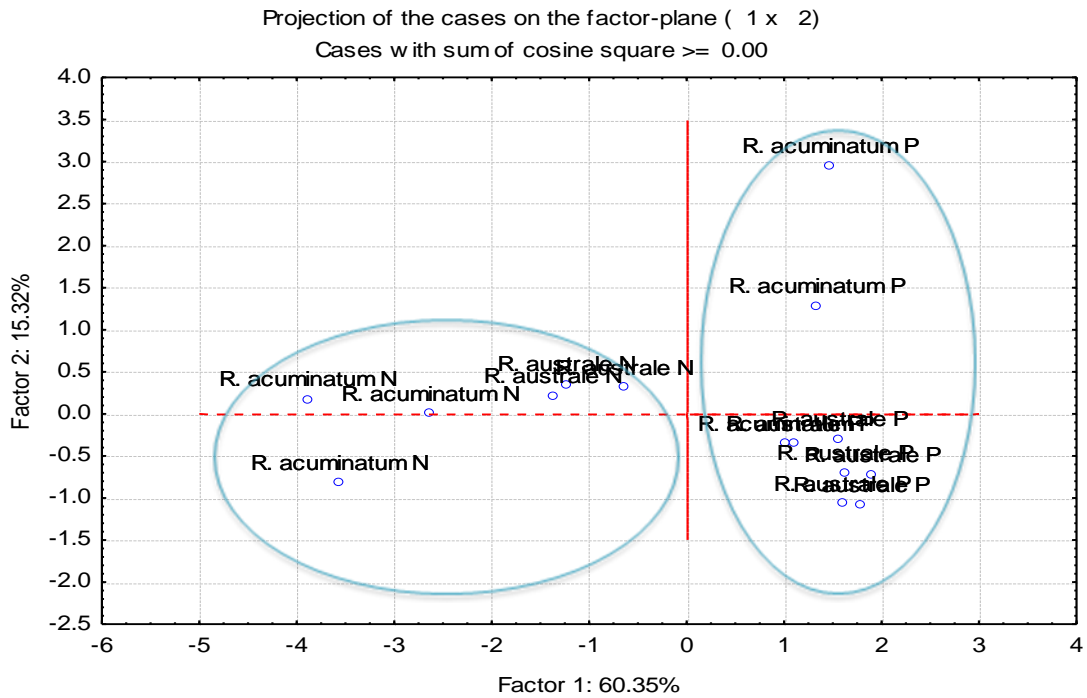


Graf 3: Celkové množství stilbenů a anthrachinonů ve vzorcích

Graf 3 uvádí celkové množství sumy anthrachinonů a stilbenů u každého druhu a lokality. Z výsledků je patrné, že obecně byla vyšší akumulace celkových anthrachinonů ve vzorcích z Nepálu a vyšší obsah celkových stilbenů v rostlinách z Průhonic.

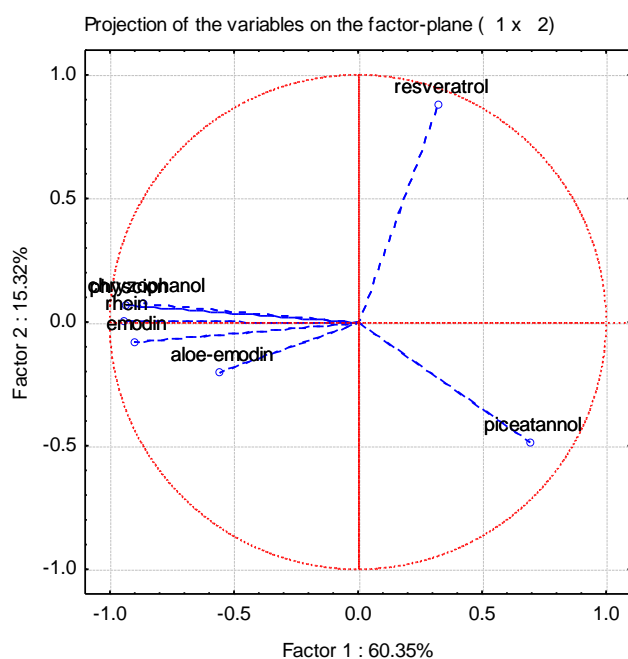
## 5.7 Zpracování dat pomocí vícerozměrných statistických metod

Data jsem vyhodnocovala z několika hledisek. Nejdříve všechny druhy společně a dále jsem porovnávala, jak se liší jednotlivé druhy mezi sebou a druhy podle místa původu.



Obr. 31: Metoda analýzy hlavních komponent – PCA (diagram komponentního skóre obou druhů - z obou míst původu)

Z diagramu je patrné, že oba druhy se liší podle místa původu. V rámci nepálských rostlin se obětuje i separace na úrovni obou druhů *R. acuminatum* a *R. australe*, což je lépe patrné z dílčích analýz (viz dále obr. 34).

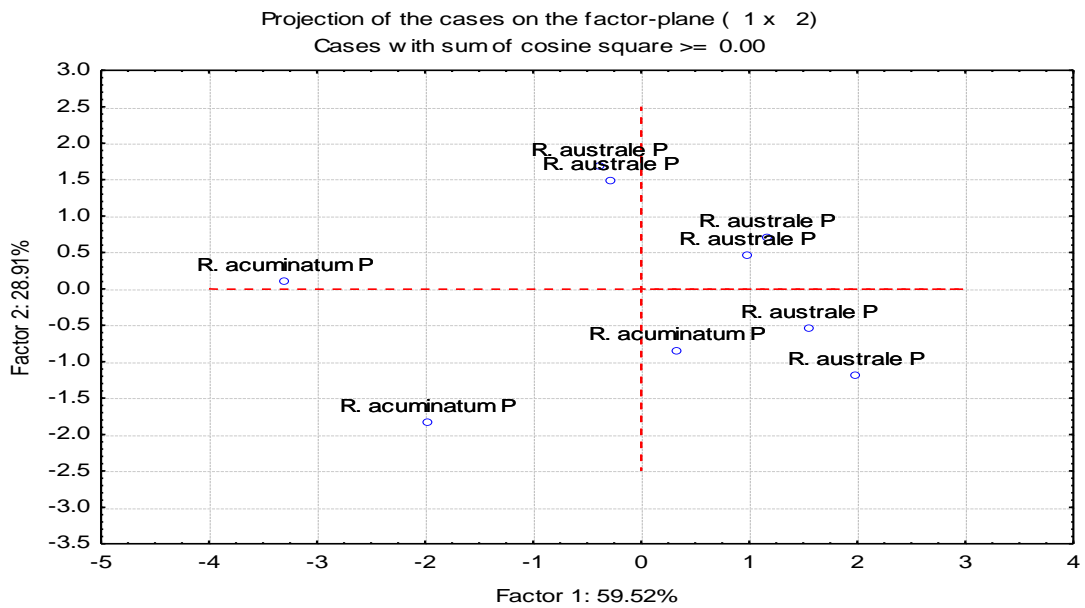


Obr. 32: Projekce jednotlivých proměnných (obsahové látky)

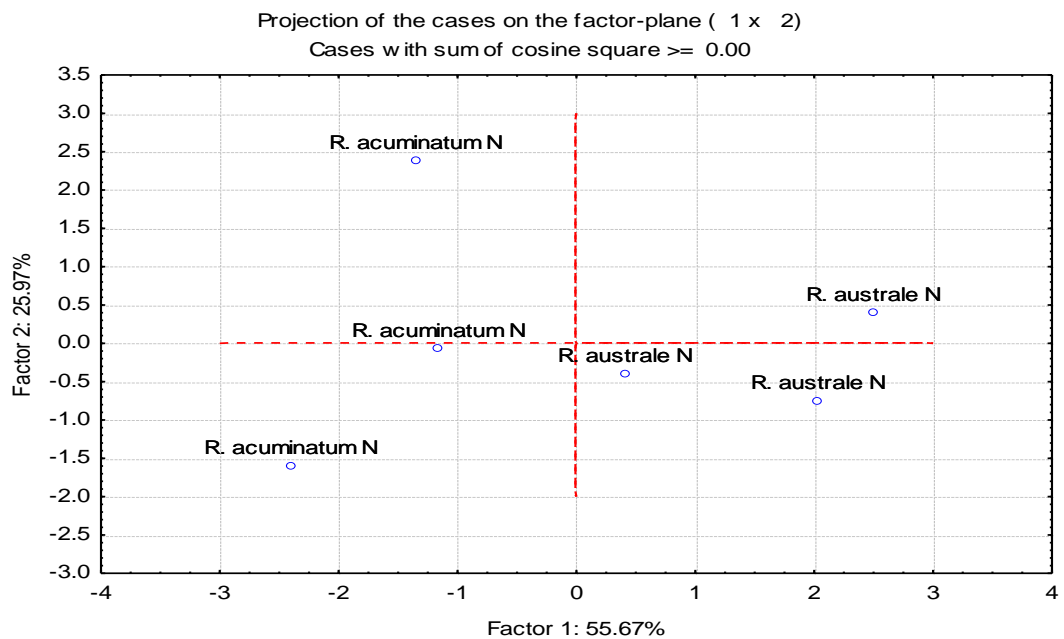
Obr. 32 je zobrazením sledovaných proměnných v příslušném systému teoretických faktorů variability. Tento obrázek nám ilustruje, na základě koncentrací kterých látek se druhy nejvýrazněji liší podle místa původu.

Při kombinaci výstupů na obr. 31 a 32 je patrné, že k nejvýraznější separaci obou vyšetřovaných skupin vzorků dochází podle osy faktoru 1, se kterým jsou těsně korelovány anthrachinony. Z toho lze usuzovat, že právě koncentrace anthrachinonů je v rámci našeho systému nevýznamnějším rysem, kterým se obě skupiny (české a nepálské rostliny) navzájem liší.



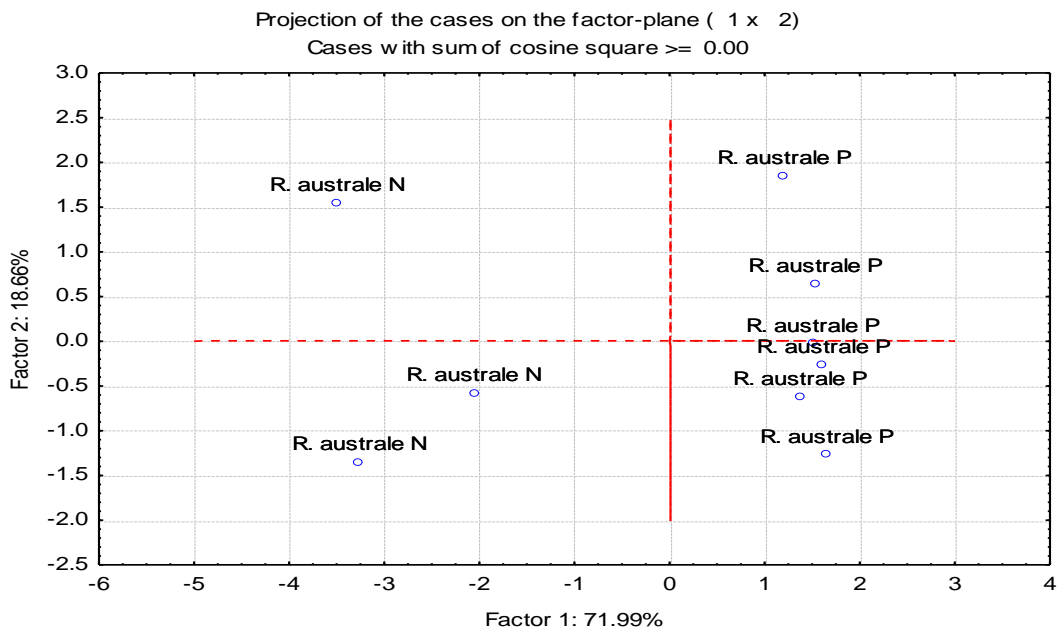


Obr. 33: PCA (diagram komponentního skóre obou druhů z Průhonice)

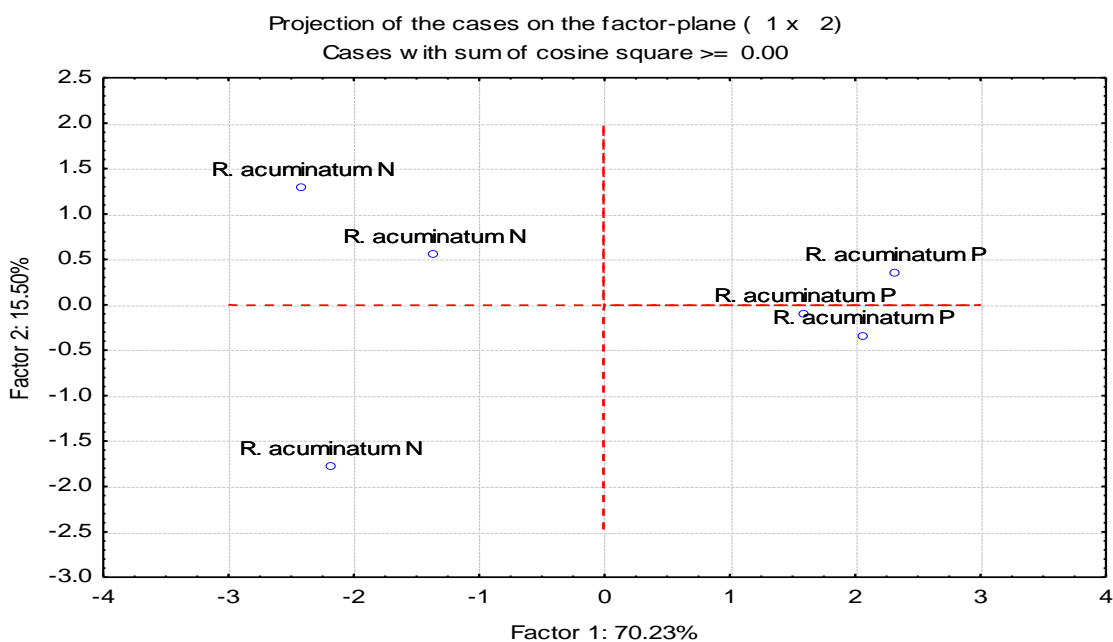


Obr. 34: PCA (diagram komponentního skóre obou druhů z Nepálu)

Z Obr. 33 a 34 je zřejmé, že existují i rozdíly mezi oběma druhy ze stejné lokality, přičemž zřetelnější jsou mezi divoce rostoucími rostlinami v přirozeném prostředí, v Nepálu.

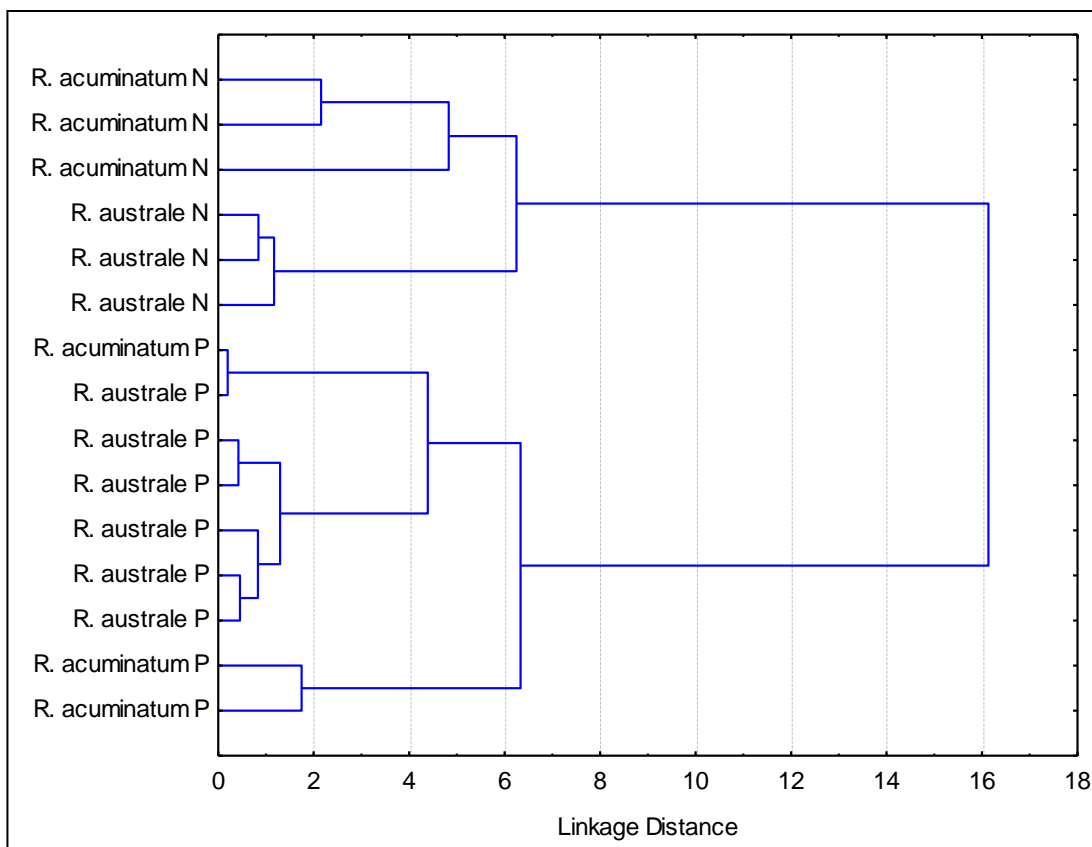


Obr. 35: PCA (diagram komponentního skóre druhu *Rheum australe* lišícího se místem původu)



Obr. 36: PCA (diagram komponentního skóre druhu *Rheum acuminatum* lišícího se místem původu)

Z Obr. 35 a 36 vyplývá, že stejné druhy se navzájem výrazně liší podle místa původu.



Obr. 37:Klastrová analýza. Shlukování pomocí Wardovy metody, euklidovské vzdálenosti.

Klastrovou analýzou se vzorky jednoznačně separovaly podle místa původu. U rostlin z Nepálu došlo i k jasnému rozdělení podle druhů, což značí, že jednotlivé druhy se liší obsahem látek a v rámci druhu byly obsahy látek podobné (viz výše obrázek 34).

Určitá korelovanost mezi jednotlivými obsahovými látkami sice existovala, ale většinou byla poměrně slabá. Významná se jevila například korelovanost rheinu s physcionem (0,97), rheinu s emodinem (0,86) a částečně i rheinu a chrysophanolu (0,78). Aloe – emodin a emodin byly korelovány pouze velmi slabě (0,63) a navíc jejich závislost je patrně zkrslena jejich nepřítomností (resp. přítomností ve stopách u aloe – emodinu) v rostlinách z Průhonic. Záporná, byť velmi slabá korelace byla vypočtena například pro piceatannol a chrysophanol (-0,59) a physcion (-0,58).

## 6 Diskuse

Rostlin rodu *Rheum* je známá celá řada a co do obsahových látek a účinků, nejsou všechny druhy stejně prozkoumané. To byl i případ mnou analyzovaných druhů, z nichž *Rheum australe* je zkoumán v mnoha studiích (20, 28, 32), zatímco práce týkající se *Rheum acuminatum*, jsou velmi sporadické, zpravidla dostupné pouze v lokálních asijských periodikách nebo velmi obecného charakteru (105).

Mnou prováděné analýzy byla zaměřena na stanovení obsahu anthrachinonů a stilbenů ve vzorcích *R. australe* a *R. acuminatum*. Vzorky se lišily místem původu – analýzy zahrnovaly vzorky z Nepálu a vzorky rostlin kultivovaných na pokusných pozemcích Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích. Stanovení obsahu anthrachinonů a stilbenů bylo provedeno metodou HPLC s UV a fluorescenční detekcí. Dále byla provedena identifikace předpokládaného physcionu pomocí MS, který byl ze vzorků izolován.

### **Srovnání množství sledovaných látek ve vzorcích na základě jejich původu**

#### Anthrachinony:

Analýzou byl zjištěn podstatný rozdíl mezi vzorky z Nepálu a z Průhonic, zejména v obsahu aloe – emodinu, který byl ve vzorcích z Průhonic pouze ve stopových množstvích a emodinu, který v těchto vzorcích nebyl detekován vůbec. Patrný byl i rozdíl v obsahu ostatních anthrachinonů, které byly u Nepálských vzorků řádově vyšší.

Tyto rozdíly mohou být způsobeny odlišnými klimatickými podmínkami (v Nepálu – vysokohorské klima, nižší teploty v zimě, větší množství srážek atd.). Podobnou tematikou vlivu klimatu na obsah anthrachinonů v *R. tanguticum* se zabývali Li et al. (106). Kromě rozdílných klimatických podmínek je nejpravděpodobnějším vysvětlením stáří analyzovaných rostlin, kdy rostliny z českých podmínek byly stejného stáří (3 roky), zatímco u materiálu z Nepálu nelze jejich stáří odhadnout, nicméně se dá předpokládat, že se jednalo o rostliny starší. Dalším možným vysvětlením by mohly být rozdíly ve zpracování rostlin, jelikož vzorky z Nepálu byly dodány již usušené a přesný postup jejich zpracování není znám (107). Část anthrachinonů se tak mohla uvolnit z konjugovaných forem (glykosidy), které se v kořenech rodu *Rheum* vyskytují

v poměrně vysokých koncentracích (27, 43). Toto vysvětlení je však poměrně málo pravděpodobné.

#### Stilbeny:

Vzorky se na základě svého původu značně lišily obsahem piceatannolu, kterého bylo více ve vzorcích z Průhonic a to až o jeden řád. Množství resveratrolu bylo v průhonických vzorcích vyšší, ale rozdíl nebyl velký.

Stejně, jako u anthrachinonů, mohl být rozdíl způsoben rozdílným klimatem, kdy podmínky v Průhonicích mohly být pro tvorbu stilbenů příznivější.

Nicméně nejpravděpodobnějším vysvětlením nižšího obsahu stilbenů ve vzorcích z Nepálu je jejich degradace v průběhu zpracování a především skladování, jako v případě anthrachinonů (107). Vzorky z Průhonic byly po hlubokém zamražení lyofilizovány, což je velmi šetrný způsob zpracování a navíc byly výrazně kratší dobu vystaveny oxidativním podmínkám před vlastní extrakcí a měřením. Z toho lze usuzovat, že hlavním důvodem rozdílného zastoupení stilbenů ve vzorcích, je nejspíše snadná oxidovatelnost stilbenů (108, 109).

#### **Srovnání množství anthrachinonů a stilbenů v *Rheum acuminatum* a *R. australe***

Z výsledků je patrné, že obsah anthrachinonů je výrazně vyšší u druhu *R. acuminatum*. U stilbenů byl velký rozdíl u piceatannolu, jehož množství bylo podstatně vyšší v *R. australe* a u resveratrolu, jehož množství se lišilo i v souvislosti s místem původu. U vzorků z Nepálu bylo vyšší množství resveratrolu v *R. australe*, zatímco u vzorků z Průhonic byl obsah resveratrolu v *R. australe* nižší.

Ačkoli se jedná o stejný rostlinný rod, mohou se jednotlivé druhy lišit metabolismem svých látek (i nepatrně), což může být příčinou rozdílu v obsahu látek mezi druhy (110). To je důsledkem genetického vývoje jednotlivých druhů, kdy se každý druh musel během svého vývoje přizpůsobovat jiným podmínkám a tím došlo k jejich odlišení (111).

#### **Izolace předpokládaného physcionu**

Po izolaci a methylovaní byl vzorek pravděpodobného physcionu analyzován na MS. Při vyhodnocování jsem vycházela z toho, že physcion má, až na přítomnost methylové skupiny na -OH substituentu v poloze 3, shodnou strukturu jako emodin. Dalo se tedy předpokládat, že pokud by byl emodin methylován, jeho hmotnostní spektrum by bylo stejné, jako methylovaného physcionu. Porovnála jsem proto spektra

obou methylovaných látek a tato spektra se shodovala. Navíc i analýzou spekter nederivatizovaného physcionu (MS<sup>2</sup> pomocí přímé sondy) a jejich porovnáním s dostupnými knihovny (NIST) jsem dospěla k závěru, že izolovanou látkou je s největší pravděpodobností physcion.

Z uvedených výsledků vyplývá, že existuje velká variabilita v obsahu anthrachinonů a stilbenů v jednotlivých druzích rodu *Rheum* a že rostliny se liší také podle místa původu, takže velký vliv na množství a kvalitu obsahových látek mají i podmínky jejich růstu, které jsou v ČR a v Nepálu velice rozdílné.

V rostlinách rodu *Rheum* je celá řada účinných látek, jako anthrachinony, dianthrony, glykosidy, stilbeny, fenolové kyseliny a další (42). Komplexní účinek těchto rostlin je tedy způsoben celou řadou látek, jejichž zastoupení se u jednotlivých druhů může výrazně lišit (4, 36, 42, 43).

## 7 Závěr

U vzorků *Rheum acuminatum* a *R. australe* byly kvalitativně stanoveny anthrachinony aloé – emodin, emodin, chrysophanol, physcion a rhein a stilbeny piceatannol a resveratrol.

Porovnáním profilu zmíněných metabolitů u těchto dvou druhů rostlin byly zjištěny významné rozdíly v jejich obsahu.

Anthrachinony byly ve vyšších koncentracích přítomny v druhu *R. acuminatum*, kdežto stilbeny spíše v druhu *R. australe*, s výjimkou resveratrolu v rostlinách *R. australe* pěstovaných v Průhonicích, ve kterých bylo jeho množství nižší.

Ještě významnějším faktorem ovlivňujícím obsah měřených metabolitů byl původ měřených vzorků. Ten zahrnuje řadu dílčích faktorů jako je vliv prostředí, způsob zpracování, délka skladování a věk rostlin. V souvislosti s místem původu byly obsahy anthrachinonů vyšší ve vzorcích z Nepálu, zatímco obsah stilbenů byl vyšší ve vzorcích z Průhonic.

## 8 Seznam použité literatury a zdrojů

- (1). FOHOW. *Tradiční čínská medicína*. [online]. (cit. 29.11.2010). Dostupné z: <http://www.fohowcz.cz/Vychodni-medicina-a-srovnani-se-zapadni/>
- (2). *Tradiční čínská medicína*. [online]. (cit. 14.6.2009). Dostupné z <http://home.zf.jcu.cz/public/departments/kbd/Special.%20zboziznalstvi/7.%20Tradicni%20cinska%20medicina.pdf>
- (3). SINGH, P. – NEGI, J. S. – RAWAT, M. S. M. – PANT, G. J. *Quantification of Mineral Element of Rheum emodi Wallr. (polygonaceae)*. HumanaPress, 2009.
- (4). YE, M. – HAN, J. – CHEN, H. – ZHENG, J. – GUO, D. Analysis of Phenolic Compounds in Rhubarbs Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *American Society for Mass Spectrometry*, září 2006, s. 82 – 91.
- (5). HUA – KUO, CH. – SUN, S. – W.. Analysis of nine rhubarb anthraquinones and bianthones by micellar electrokinetic chromatography using experimental design. *Analytica Chimica Acta*, 2003, s. 47 – 58.
- (6). NOVÁK, F. A. *Vyšší rostliny: tracheophyta*. 2. vydání. Praha: Academia, 1972, 941s.
- (7). KORBELÁŘ, J. – ENDRIS, Z. *Naše rostliny v lékařství*. 2. vydání. Praha : Státní zdravotnické nakladatelství. 1968, 480s, ISBN 735 – 21 – 08/31.
- (8). HEJNÝ, S. – SLAVÍK, B. *Květena České republiky* 2. Praha : Academia, 2003. 540s. ISBN 80 – 200 – 1089 – 0.
- (9). POLYGONACEAE. [online] (cit. 15.1.2011). Dostupné z : <http://hua.huh.harvard.edu/china/mss/volume05/Polygonaceae.pdf>
- (10). Flora od China. *Rheum compactum*. [online]. (cit. 18.1.2011). Dostupné z : [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=2&taxon\\_id=242343372](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=242343372)
- (11). Flora of China. *Rheum kialense*. [online]. (cit. 6.2.2011). Dostupné z : [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=2&taxon\\_id=242343383](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=242343383)



- (12). Flora of China. *Rheum nobile*. [online]. (cit. 12.2.2011). Dostupné z : [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=2&taxon\\_id=242343391](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=242343391)
- (13). WIKIPEDIA. *Rheum nobile*. [online]. (cit. 12.2.2011). Dostupné z : [http://en.wikipedia.org/wiki/Rheum\\_nobile](http://en.wikipedia.org/wiki/Rheum_nobile)
- (14). WIKIPEDIA. *Rheum officinale*. [online]. (cit. 12.2.2011). Dostupné z : [http://en.wikipedia.org/wiki/Rheum\\_officinale](http://en.wikipedia.org/wiki/Rheum_officinale)
- (15). POLÍVKA, F. *Úžitkové a pamětihodné rostliny cizích zemí. Reven lékařská*. [online]. (cit. 12.2.2011). Dostupné z : <http://botanika.wendys.cz/cizi/rostlina.php?160>
- (16). TRAXL, V. *Léčivé rostliny ze zahrady*. Most: ČZS KVĚT, 1992. 143 s. ISBN 80 – 85362 – 08 – 2
- (17). IWASHINA, T. – OMORI, Y. – KITAJIMA, J. – AKIYAMA, S. – SUZUKI, T. – OHBA, H.. Flavonoids in translucent bracts of the himalayan *Rheum nobile* (Polygonaceae) as ultraviolet shields. *The Botanical Society of Japan and Springer – Verlag Tokyo*, leden 2004, s. 101 – 107.
- (18). Flora of China. *Rheum acuminatum*. [online] (cit. 16.1.2011). Dostupné z : [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=2&taxon\\_id=242343367](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=242343367)
- (19). Flora of Pakistan. *Rheum australe*. [online]. (cit. 16.1.2011). Dostupné z : [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=5&taxon\\_id=242100141](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=5&taxon_id=242100141)
- (20). SINGH, N. P. – GUPTA, A. P. – SINHA, A. K. – AHUJA, P. S.. High - performance thin layer chromatography method for quantitative determination of major anthraquinone derivatives in *Rheum emodi*. *Jurnal of chromatography A*, 2005, s. 202 – 206.
- (21). LEROS. *Reven dlanitá, reven lékařská*. [online]. (cit. 10.3.2011). Dostupné z : <http://www.leros.cz/cs/herbar/reven-dlanita-reven-lekarska>
- (22). WIKIPEDIE. *Antrachinon*. [online]. (cit. 10.3.2011). Dostupné z : <http://cs.wikipedia.org/wiki/Antrachinon>
- (23). WIKIBOOKS. *Přírodní látky/ Chemie přírodních látek/ Přehled přírodních látek/ Glykosidy*. [online]. (cit. 10.3.2011). Dostupné z : [http://cs.wikibooks.org/wiki/P%C5%99%C3%ADrodn%C3%AD\\_1%C3%A1t](http://cs.wikibooks.org/wiki/P%C5%99%C3%ADrodn%C3%AD_1%C3%A1t)

ky/Chemie\_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch\_l%C3%A1tek/P%C5%99ehled\_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch\_l%C3%A1tek/Glykosidy#Antrachinonov.C3.A9\_glykosidy

- (24). PECERE, T. – GAZZOLA, M.V. – MUCIGNAT, L. - et al.. Aloe – emodin Is a New Type of Anticancer Agent with Selective Activity against Neuroectodermal Tumors. *Cancer Research*, červen 2000, s. 2800 – 2804.
- (25). KUPCHAN, S. M. – KARIM, A.. Tumor Inhibitors 114 Aloe Emodin : Antileucemic Principle Isolated from *Rhamnus frangula* L.. *Aloe Vera of Australia Products*, 1976, s. 223 – 224.
- (26). SIGMA – ALDRICH. *Aloe – emodin*. [online]. (cit. 12.3.2011). Dostupné z : [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=A7687|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=A7687|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)
- (27). KO, S. K. – WHANG, W. K. – KIM, I. H.. Anthraquinone and Stilbene Derivatives from the Cultivated Korean Rhubarb Rhizomes. *Archives of Pharmal Research*, 1995, vol. 18, no. 4, s. 282 – 288.
- (28). MALIK, S. – SHARMA, N. – SHARMA, U. K. – SINGH, N. P. – BHUSHAN, S. – SHARMA, M. - SINHA, A. K. – AHUJA, P. S.. Qualitative and quantitative analysis of anthraquinone derivatives in rhizomes of tissue culture – raised *Rheum emodi* Wall. plants. *Journal of Plant Physiology*, 2009, s. 1 – 8.
- (29). YAO, S. – LI, Y. – KONG, L.. Preparative isolation and purification of chemic constituents from the root of *Polygonum multiflorum* by high – speed counter – current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2006, s. 67 – 71.
- (30). YOO, M. Y. – OH, K. – S. – LEE, J. W. – SEO, H. W. – YON, G. H. – KWON, D. Y. – KIM, Y. S. – RYU, S. Y. – LEE, B. H.. Vasorelaxant effect of stilbenes from rhizome extract of rhubarb (*Rheum undulatum*) on the contractility of rat aorta. *Phytotherapy Research*, 2007, vol. 21, s. 186 – 189.
- (31). WIKIPEDIA. *Anthrone*. [online] (cit. 8.4.2011). Dostupné z : <http://en.wikipedia.org/wiki/Anthrone>

- (32). KRENN, L. – PRADHAN, R. – PRESSER, A. – REZNICEK, G. – KOPP, B.. Anthrone C-Glucosides from *Rheum emodi*. *Pharmaceutical Society of Japan*, leden 2004, s. 391 – 393.
- (33). WIKIPEDIA. (*E*) – *Stilbene*. [online] (cit. 11.4.2011). Dostupné z : <http://en.wikipedia.org/wiki/%28E%29-Stilbene>
- (34). WIKIPEDIA. (*Z*) – *Stilbene*. [online] (cit. 11.4.2011). Dostupné z : <http://en.wikipedia.org/wiki/%28Z%29-Stilbene>
- (35). CHEMICAL LAND 21. *PICEATANNOL*. [online] (cit. 12.4.2011). Dostupné z : <http://chemicalland21.com/lifescience/uh/PICEATANNOL.htm>
- (36). PÜSSA, T. – RAUDSEPP, P. – KUZINA, K. – RAAL, A.. Polyphenolic composition of roots and petioles of *Rheum rhaponticum* L.. *Phytochemical Analysis*, říjen 2008, s. 98 – 103.
- (37). CHEMICAL LAND 21. *PICEATANNOL*. [online] (cit. 12.4.2011). Dostupné z : <http://chemicalland21.com/lifescience/uh/PTEROSTILBENE.htm>
- (38). BONILLA, P. R. – CAZORLA, L. M. – NICOLÁS, J. M. L. – CARMONA, F. G.. Kinetic mechanism and product characterization of the detoxification process of stilbene – type phytoalexins. *Phytochemistry*, leden 2011, s. 100 – 108.
- (39). WIKIPEDIA. *Resveratrol*. [online] (cit. 12.4.2011). Dostupné z : <http://en.wikipedia.org/wiki/Resveratrol>
- (40). Look Chem. CAS No.:501-36-0. [online] (cit. 12.4.2011). Dostupné z : <http://www.lookchem.com/cas-501/501-36-0.html>
- (41). WIKIPEDIA. *Gallic acid*. [online] (cit. 12.4.2011). Dostupné z : [http://en.wikipedia.org/wiki/Gallic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Gallic_acid)
- (42). KOMATSU, K. – NAGAYAMA, Y. – TANAKA, K. – LING, Y. – CAI, S. – Q. – OMOTE, T. – MASELHY, M. – R.. Comparative Study of Chemical Constituents of Rhubarb from Different Origins. *Pharmaceutical Society of Japan*, 2006, s. 1491 – 1499.

- (43). ZHANG, H. - X. - LIU, M. - C.. Separation procedures for the pharmacologically active components of rhubarb. *Journal of Chromatography B*, září 2004, s. 175 – 181.
- (44). KOMATSU, K. – NAGAYAMA, Y. – TANAKA, K. – LING, Y. – BASNET, P. – MESELHY, M. R.. Development of High Performance Liquid Chromatographic Method for Systematic Quantitative Analysis of Chemical Constituents in Rhubarb. *Pharmaceutical Society of Japa*, únor 2006, s. 941 – 947.
- (45). LIN, CH. – CH. – WU, CH. – I – SHEU, S. – J.. Determination of 19 rhubarb constituents by high – performance liquid chromatography – ultraviolet – mass spectrometry. *InterScience*, červenec 2006, s. 2584 – 2593.
- (46). TONG, S. – YAN, J.. Large – scale separation of hydroxianthraquinones from *Rheum palmatum* L. By pH – zonerefining counter – current chromatography. *Journal of Chromatography A*, prosinec 2007, vol. 1176, s. 163 – 168.
- (47). WANG, CH. – CH. – HUANG, Y. – J. – CHEN, L. – G. – LEE, L. – T. – YANG, L. – L.. Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitors of Chinese Herb III. *Rheum palmatum*. *Planta Med*, 2002, s. 869 – 874.
- (48). MOON, M. K. – KANG, D. G. – LEE, J. K. – KIM, J. S. - LEE, H. S.. Vasodilatory and anti – inflammatory effects of the aqueous extract of rhubarb via a NO – cGMP pathway. *Life Sciences*, únor 2006, vol. 78, s. 1550 – 1557.
- (49). CUÉLLAR, M. J. – GINER, R. M. – RECIO, M. C. – MÁNEZ, S. – RÍOS, J. S.. Topical anti – inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders. *Fitoterapia*, březen 2001, vol. 72, s. 221 – 229.
- (50). CHAUHAN, N. S. – KAITH, B. S. – MANN, S. K.. Anti – inflammatory Activity of *Rheum australe* Roots. *Pharmaceutical Biology*, 1992, vol. 30, no. 2, s. 93 – 96.
- (51). ZHAO, Y. – Q. – LIU, X. – H. – ITO, T. – QIAN, J. – M.. Protective effects of rhubarb on experimental severe acute pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 2004, s. 1005 – 1009.

- (52). KO, S. K. – LEE, S. M. – WHANG, W. K.. Anti – platelet aggregation activity of stilbene derivatives from *Rheum undulatum*. *Archives of Pharmacal Research*, 1999, vol. 22, no. 4, s. 401 – 403.
- (53). VOLLMER, G. – PAPKE, A. – ZIERAU, O.. treatment of menopausal symptoms by an extract from the roots of rhapontic rhubarb : the role of estrogen receptors. *Chinese Medicine*, 2010, No. 5.
- (54). MATSUDA, H. – TREWTAKUL, S. – MORIKAWA, T. – YOSHIKAWA, M.. Anti – allergic activity of stilbens from Korean rhubarb (*Rheum undulatum* L.) : structure requirements for inhibition of antigen – induced degranulation and their effects on the release of TNF –  $\alpha$  and IL – 4 in RBL – 2H3 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, září 2004, vol. 12, s. 4871 – 4876.
- (55). MOREL, I. – LESCOAT, G. – COGREL, P. – SERGENT, O. – PASDELOUP, N. – BRISSOT, P. CILLARD, P. – CILLARD, J.. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochemical Pharmacology*, leden 1993, vol. 45, s. 13 – 19.
- (56). INOUE, M. – SUZUKI, R. – SAKAQUCHI, N. – LI, Z. – TAKEDA, T. – OQIHARA, Y. – JIANG, B. Y. – CHEN, Y.. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Pharmaceutical Society of Japan*, 1995, vol. 18, no. 11, s. 1526 – 1530.
- (57). ARUOMA, O. I. – MURCIA, A. – BUTLER, J. – HALLIWELL, B.. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, s. 1880 – 1885.
- (58). USUI, T. – IKEDA, Y. – TAGAMI, I. – MATSUDA, K. – MURIYAMA, K. – YAMADA, K. – KUZUYA, H. – KOHNO, S. – SHIMATSU, A.. The phytochemical lyndleyin isolated from *Rhei rhizoma*, mediates hormonal effects through estrogen receptors. *Journal of Endocrinology*, 2002, s. 289 – 296.
- (59). STAREC, M. – WAITZOVA, D. – ELIS, J.. Evaluation on the analgesic effect of RG – tannin using the „hot plate“ and „tail flick“ method in mice. *European Journal of Pharmacology*, 1990, s. 319 – 321.

- (60). SHINYA, S. – TETSURE, N. – HIKOKICHI, O. – GENICHIRO, N. – ITSUO, N.. Mechanism of the Rhatannin from Rhei Rhizoma in the Rat I. *The Pharmaceutical Society of Japan*, 1983, vol. 31, s. 2378 – 2385.
- (61). TETSURO, N. - HIKOKICHI, O. – GENICHIRO, N. – ITSUO, N..Effect of Rhatannin on the Incorporation of Precursors into Proteins and Ribonucleic acid of Rhat Liver. *The Pharmaceutical Society of Japan*, 1985, vol. 33, s. 4494 – 4499
- (62). AUGARWAL, S. K. – SINGH, S. S. – VERMA, S. – KUMAR, S.. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. *Journal of Ethnopharmacology*, září 2000, vol. 72, s. 43 – 46.
- (63). BABU, K. S. – SRINIVAS, P. V. – PRAVEEN, B. – KISHORE, K. H. – MURTY, U. S. – RAO, J. M.. Antimicrobial constituents from the rhizomes of *Rheum emodi*. *Phytochemistry*, 2003, vol. 62, s. 203 – 207.
- (64). IBRAHIM, M. – KHAN, A. A. – TIWARI, S. K. – HABEEB, M. A. – KHAJA, M. N. – HABIBULLAH, C. M.. Antimicrobial activity of *Sapindus mukorossi* and *Rheum emodi* extracts against *H pylori*: *In vitro* and *in vivo* studies. *World Journal of Gastroenterology*, listopad 2006, s. 7136 – 7142.
- (65). BABU, K. S. – TIWARI, A. K. – SRINIVAS, P. V. – ALI, A. Z. – RAJU, B. CH. – RAO, J. M.. Yeast and mammalian [alpha]-glucosidase inhibitory constituents from Himalayan rhubarb *Rheum emodi* Wall. ex Meisson. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, červenec 2004, vol. 14, s. 3841 – 3845.
- (66). JUNLIN, L. – ZHIBIN, W. – JIASHI, L.. Studies on Hypoglycemic Action of *Rheum emodi*. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 1997, s. 249 – 250.
- (67). IBRAHIM, M. – KHAJA, M. N. – AARA, A. – KHAN, A. A. - HABEEB, M. A. – DEVI, Y. P. – NARASU, M. L. - HABIBULLAH, C. M.. Hepatoprotective activity of *Sapindus mukorossi* and *Rheum emodi* extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *World Journal of Gastroenterology*, duben 2008, s. 2566 – 2571.

- (68). KOUNSAR, F. – AFZAL, Z. M.. *Rheum emodi* Induces Nitric Oxide Synthase Activity in Murine Macrophages. *American journal of Biomedicinal Society*, červenec 2009, s. 155 – 163.
- (69). KOUNSAR, F. – RATHER, M. A. – GANAI, B. A. – ZARGAR, M. A.. Immuno – enhancing effects of the herbal extract from Himalayan rhubarb *Rheum emodi* Wall. ex Meissn. *Food Chemistry*, 2011, vol. 126, s. 967 – 971.
- (70). ALAM, M. M. A. – JAVED, K. – JAFRI, M. A.. Effect of *Rheum emodi* (Revand Hindi) on renal functions in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, leden 2005, vol. 96, s. 121 – 125.
- (71). RAJKUMAR, V. – GUHA, G. – KUMAR, P. A.. Antioxidant and Anti – cancer Potentials of *Rheum emodi* Rhizome Extracts. *Evidence – Based Complementary and Alternative Medicine*, květen 2010, s. 1 – 9.
- (72). HUANG, Q. – LU, G. – SHEN, H. – M. – CHUNG, M. C. M. – ONG, CH. N.. Anti – cancer properties of anthraquinones from rhubarb. *Medicinal Research Reviews*, říjen 2006, No. 5, s. 609 – 630.
- (73). LEE, H. – Z.. Protein kinase C involvement in aloe – emodin and emodin – induced apoptosis in lung carcinoma cell. *British Journal of Pharmacology*, listopad 2001, vol. 134, s. 1093 – 1103.
- (74). FENIG, E. – NORDENBERG, J. – BEERY, J. – SULKES, J. – WASSERMAN, L.. Combined effect of aloe – emodin and chemoterapeutic agents on the proliferation of an adherent variant cell line of Merkel cell carcinoma. *Oncology reports*, 2004, vol. 11, s. 213 – 217.
- (75). LIN, J. – G. – CHEN, G. – W. – LI, T. – M. – CHOUH, S. – T. – TAN, T. – W. – CHUNG, J. – G.. Aloe – Emodin Induced Apoptosis in T24 Human Bladder Cancer Cells Trough the p53 Dependent Apoptotic Pathway. *The Journal of Urology*, leden 2006, vol. 175, s. 343 – 347.
- (76). TIAN, B. – HUA, Y.. Concentration – dependence of peroxidant and antioxidant effects of aloin and aloe – emodin on DNA. *Food Chemistry*, červenec 2005, vol. 91, s. 413 – 418.
- (77). YEN, G. – CH. – DUH, P. D. – CHUANG, D. – Y.. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. *Food Chemistry*, září 2000, vol. 70, s. 437 – 441.

- (78). VARGAS, F. – DÍAZ, Y. – CARBONELL, K.. Antioxidant and Scavenging Activity of Emodin, Aloe-Emodin, and Rhein on Free-Radical and Reactive Oxygen Species. *Pharmaceutical Biology*, 2004, vol. 42, no. 4 – 5, s. 342 – 348.
- (79). TIAN, B. – HUA, Y. J. – MA, X. Q. – WANG, G. L.. Relationship between antibacterial activity of aloe and its anthraquinone compounds. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2003, s. 1034 – 1037.
- (80). ZHANG, L. – CHANG, CH. – J. – BACUS, S. S. – HUNG, M. – CH.. Suppressed Transformation and Induced Differentiation of *HER – 2/neu* – overexpressing Breast Cancer Cells by Emodin. *Cancer Research*, 1995, s. 3890 – 3896.
- (81). SRINIVAS, G. – ANTO, R. J. – SRINIVAS, P. – VIDHYALAKSHMI, S. – SENAN, V. P. – KURUNAGAR, D.. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP – ribose) polymerase cleavage and activation of caspase – 9. *European Journal of Pharmacology*, červenec 2003, vol. 473, s. 117 – 125.
- (82). CHOI, J. S. – CHUNG, H. Y. – JUNG, H. A. – PARK, H. J. – YAKOZAWA, T.. Comparative Evaluation of Antioxidant Potential of Alaternin (2-Hydroxyemodin) and Emodin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, vol. 48, s. 6347 – 6351.
- (83). BASU, S. – GHOSH, A. – HAZRA, B.. Evaluation of the antibacterial activity of *Ventilago madraspatana* Gaertn., *Rubia cordifolia* Linn. and *Lantana camara* Linn. isolation of emodin and physcion as active antibacterial agents. *Phytotherapy Research*, říjen 2005, vol. 19, s. 888 – 894.
- (84). NAGASHIMA, H. – NAKAMURA, K. – GOTO, T.. Possible anti – atherogenic effects of emodin, an anthraquinone from Chinese herb and *Aspergillus* and *Penicillium* fungi. *Journal of the Japanese Association of Mycotoxicology*, 2002, vol. 52, no. 1, s. 23 – 27.
- (85). LEE, M. S. – SOHN, CH. B.. Anti – diabetic Properties of Chrysophanol and Its Glucosides from Rhubarb Rhizome. *Pharmaceutical Society of Japan*, listopad 2008, Vol. 31, No. 11, s. 2154 – 2157.



- (86). LU, C. C. – YANG, J. S. – HUANG, A. C. – HSIA, A. C. – CHOU, C. L. – LU, H. F. – LEE, T. H. – WOOD, W. E. – CHUNG, J. G.. Chrysophanol induces necrosis through the production of ROS and alteration of ATP levels in J5 human liver cancer cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, červenec 2010, vol. 54, s. 967 – 976.
- (87). KUMAR, S. P. – SRINIVAS, P. V. – RAO, J. M.. A new and convenient method for quantitative estimation of chrysophanol, an antioxidant in the rhizomes of *Rheum emodi* (Roxb). *Journal of Planar Chromatography*, 2002, vol. 15, s. 128 – 131.
- (88). SOSA, K. G. – ALVAREZ, N. V. – LÜBBEN, P. – RODRÍGUEZ, L. M. P.. Chrysophanol, an Antibacterial Anthraquinone from the Root Extract of *Colubrina greggi*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 2006, s. 76 – 78.
- (89). POTTER, G. A. – PATTERSON, L. H. – WONOGHO, E. – PERRY, P. – BUTLER, P. C. – IJAZ, T. – RAPARELIA, K. C. – LAMB, J. H. – FARMER, P. B. – STANLEY, L. A. – BURKE, M. D.. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *British Journal of Cancer*, 2002, s. 774 – 778.
- (90). PAN, M. H. – CHANG, Y. – H. – BADMAEV, V. – NAGABHUSHANAM, K. – HO, CH. – T.. Pterostilbene Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Gastric Carcinoma Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, s. 7777 – 7785.
- (91). MIKSTACKA, R. – RIMANDO, A. M. – IGNATOWICZ, E.. Antioxidant Effect of *trans*-Resveratrol, Pterostilbene, Quercetin and Their Combinations in Human Erythrocytes *In Vitro*. *Plant Food for Human Nutrition*, 2010, vol. 65, no. 1, s. 57 – 63.
- (92). PARI, L. – SATHEESH, M. A.. Effect of pterostilbene on hepatic key enzyme of glucose metabolism in streptozotocin – and nicotinamid – induced diabetic rats. *Life Sciences*, červenec 2006, vol. 79, s. 641 – 645.
- (93). LU, R. – SERRERD, G.. Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, červen 1999, vol. 179, s. 297 – 304.

- (94). HUNG, L. – M. – CHEN, J. K. – HUANG, S. – S. – LEE, R. – S. – SU, M. – J.. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Research*, 2000, s. 549 – 555.
- (95). RAMADORI, G. – GUATRON, L. – FUJIKAWA, T. – VIANNA, C. R. – ELMQUIST, J. K. – COPPARI, R.. Control Administration of Resveratrol Improves Diet – Induced Diabetes. *The Endocrine Society*, 2009, vol. 150, no. 12, s. 5326 – 5333.
- (96). SHARMA, S. – MISRA, CH. S. – ARUMUGAM, S. – ROY, S. – SHAH, V. – DAVIS, J. A. – SHIRUMALLA, R. K. – RAY, A.. Antidiabetic activity of resveratrol, a known SIRT1 activator in a genetic model for type – 2 – diabetes. *Phytoteraphy Research*, leden 2011, vol. 25, s. 67 – 73.
- (97). BASTIANETTO, S. – ZHENG, W. – H. – QUIRION, R.. Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide – related toxicity in cultured hippocampal neurons. *British Journal of Pharmacology*, říjen 2009, vol. 131, s. 711 – 720.
- (98). HAN, Y. – S. – ZHENG, W. – H. – BASTIANETTO, S. – CHABOT, J. – G. – QUIRION, R.. Neuroprotective effects of resveratrol against  $\beta$  – amyloid – induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. *British Journal of Pharmacology*, březem 2004, vol. 141, s. 997 – 1005.
- (99). GUO, M. Z. – LI, X. – S. – XU, H. – R. – MEI, Z. – CH. – SHEN, W. – YE, X. – F.. Rhein inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, srpen 2002, s. 739 – 744.
- (100). HE, Z. – H. – ZHOU, R. – HE, M. – F. – LAU, C. B. – S. – YUE, G. G. – L. – BUT, P. P. – H.. Anti – angiogenic effect and mechanism of rhein from *Rhizoma Rhei*. *Phytomedicine*, 2010.
- (101). CHOL, C. J. – TSUKASA, M. – KAZUO, A. – HIROAKI, K. – HARUKI, Y. – YASUO, O.. Anti – *Bacteroides fragilis* substance from *Rhubarb*. *Journal of Ethnopharmacology*, květen 1987, vol. 19, s. 279 – 283.

- (102). HEO, S. – K. – YUN, H. – J. – PARK, W. – H. – PARK, S. – D.. Rhein Inhibits TNF  $\alpha$  – Induced Human Aortic Smooth Muscle Cell Proliferation via Mitochondrial – Dependent Apoptosis. *Journal of Vascular Research*, leden 2008, s. 375 – 386.
- (103). Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Fakulta prírodných vied. *Mnohorozměrná statistická analýza dat.* (online) [cit. 15.4.2011]. Dostupné z: [http://www.keefpv.ukf.sk/files/mnohoroz\\_analyza\\_pred.ppt](http://www.keefpv.ukf.sk/files/mnohoroz_analyza_pred.ppt)
- (104). WIKIPEDIE. *Analýza hlavních komponent.* (online) [cit. 15.4.2011]. Dostupné z: [http://cs.wikipedia.org/wiki/Anal%C3%BDza\\_hlavn%C3%ADch\\_komponent](http://cs.wikipedia.org/wiki/Anal%C3%BDza_hlavn%C3%ADch_komponent)
- (105). ROKAYA, M. B. – MÜNZBERGOVÁ, Z. – TIMSINA, B.. Ethnobotanical study of medicinal plants from the Humla distric of western Nepal. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, vol. 130, s. 485 – 504.
- (106). LI, L. – SUN, P. – FENG, CH.. Effects of Climate factors on the Contents of Anthraquinones in *Rheum tanguticum*. *China Pharmacy*, 2010, s. 39 – 43.
- (107). HUAL, L. – QIANG, W. – CHENG, J. – XIAOHE, X.. Appearance and Physical Property of Rhubarb Water Extract by Different Drying Methods. *China Pharmaceuticals*, 2009, s. 19 – 24.
- (108). ZHANG, L. – GELLERSTEDT, G.. Reactive Structures in Wood and High – yield Pulps. IV. Daylight – induced Oxidation of Stilbene Structures in the Solid State. *Acta Chemica Scandinavica*, 1994, s. 490 – 497.
- (109). HALAS, S. M. – OKYNE, K. – FRY, A. J.. Anodic oxidation of stilbenes bearing electron – withdrawing ring substituents. *Electrochimica Acta*, 2003, vol. 48, s. 1837 – 1844.
- (110). CHONG, J. – POUTARAUD, A. – HUGUENEY, P.. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plants Science*, září 2009, vol. 177, s. 143 – 155.
- (111). BROWN, J. P.. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, květen 1980, vol 75, s. 243 – 277.

Původ obrázků:

- Obr. 1: Protabase. Rheum x hybridum Murray. [online]. Dostupné z :  
[http://database.prota.org/dbtw-wpd/exec/dbtwpub.dll?AC=QBE\\_QUERY&BU=http://database.prota.org/search.htm&TN=PROTAB~1&QB0=AND&QF0=Species+Code&QI0=Rheum+%D7hybridum&RF=Webdisplay](http://database.prota.org/dbtw-wpd/exec/dbtwpub.dll?AC=QBE_QUERY&BU=http://database.prota.org/search.htm&TN=PROTAB~1&QB0=AND&QF0=Species+Code&QI0=Rheum+%D7hybridum&RF=Webdisplay)
- Obr. 2: Swedishrockgarden.com. [online]. Dostupné z :  
[http://swedishrockgarden.com/plantdb/rheum\\_main.htm](http://swedishrockgarden.com/plantdb/rheum_main.htm), Bhutan  
Excursions. *Flowers of Bhutan*. [online]. Dostupné z :  
<http://www.bhutantour.bt/bhutan-articles/flowers-of-bhutan-2.html>,  
Biozahrada. [online]. Dostupné z :  
<http://diskuse.nachvojnici.cz/viewtopic.php?f=29&t=567>
- Obr. 3: SCIENCE photo LIBRARY. [online]. Dostupné z :  
[http://www.sciencephoto.com/images/download\\_lo\\_res.html?id=670043565](http://www.sciencephoto.com/images/download_lo_res.html?id=670043565)
- Obr. 4: Henriette's Herbal Homepage. [online]. Dostupné z :  
<http://www.henriettesherbal.com/pictures/p11/pages/rheum-australe.htm>
- Obr. 5: WIKIPEDIE. Antrachinon. [online]. Dostupné z :  
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Antrachinon>
- Obr. 6: SIGMA ALDRICH. Aloe – emodin. [online]. Dostupné z :  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=A7687|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=A7687|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)
- Obr. 7: SIGMA ALDRICH. Emodin. [online]. Dostupné z :  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=E7881|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=E7881|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)

- Obr. 8: SIGMA ALDRICH. Chrysophanol. [online]. Dostupné z :  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=229075|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=229075|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)
- Obr. 9: R&D Chemicals. Physcion. [online]. Dostupné z :  
[http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol\\_id=8149](http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol_id=8149)
- Obr. 10: SIGMA ALDRICH. Rhein. [online]. Dostupné z :  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=R7269|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=R7269|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)
- Obr. 11: LookChem. CAS No.:23313-21-5. [online]. Dostupné z :  
<http://www.lookchem.com/cas-233/23313-21-5.html>
- Obr. 12: LookChem. CAS No.:23313-21-5. [online]. Dostupné z :  
<http://www.lookchem.com/cas-233/23313-21-5.html>
- Obr. 13: Gentcare. [online]. Dostupné z :  
<http://www.gentcare.com/UploadFiles/20103992337112.jpg>
- Obr. 14: Wikipedia. Anthrone. [online]. Dostupné z :  
<http://en.wikipedia.org/wiki/Anthrone>
- Obr. 15: Gentcare Natural Ingredients Inc. [online]. Dostupné z :  
<http://www.gentcare.com/EnProductShow.asp?ID=67>
- Obr. 16: Wikipedia. *E* – stilbene, *Z* – stilbene. [online]. Dostupné z :  
<http://en.wikipedia.org/wiki/%28E%29-Stilbene>  
<http://en.wikipedia.org/wiki/%28Z%29-Stilbene>
- Obr. 17: SIGMA ALDRICH. Piceatannol. [online]. Dostupné z :  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=P0453|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=P0453|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)

- Obr. 18: SIGMA ALDRICH. Pterostilbene. [online]. Dostupné z :  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=P1499|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=P1499|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)
- Obr. 19: SIGMA ALDRICH. Resveratrol. [online]. Dostupné z :  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=R5010|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=R5010|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)
- Obr. 20: Wikipedia. Gallic acid. [online]. Dostupné z :  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Gallic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Gallic_acid)