

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Fytochemická studie vybraného rostlinného taxonu

Procyanidiny *Vaccinium macrocarpon* v doplňcích stravy

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Hradec Králové, 2013

Vlada Kazakova

PROHLÁŠENÍ

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

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Prof. RNDr. Ludřkovi Jahodářovi, CSc. za jeho odborné vedení a všemožnou podporu při vypracování mé diplomové práce.

Děkuji všem zaměstnancům Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vstřícnost a vytváření příjemné atmosféry na pracovišti. Zvláště děkuji Petře Němcové za podporu při práci v laboratoři, Ireně Rejlové za změření HPLC spekter, Ing. Kateřině Macákové za stanovení antioxidační aktivity, PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D. za pomoc při spektrofotometrickém měření a Prof. RNDr. Lubomírovi Opletalovi, CSc. za věcné poznámky v laboratoři i mimo ni.

Děkuji Danieli Zykovi za laskavé poskytnutí standardu a společnosti Valosun a.s. za poskytnutí extraktu.

Tato práce by také nevznikla bez podpory mých přátel a blízkých. Zvláště děkuji Lucii Hanusové, Lukášovi Zahálkovi a Pavlu Vondráčkovi.

Vlada Kazakova

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	4
I. ÚVOD	5
II. CÍL PRÁCE	7
III. TEORETICKÁ ČÁST	8
1. Botanická charakteristika	8
1.1 Taxonomické zařazení druhu	8
1.2 Výskyt	9
1.3 Popis druhu	10
2. Pěstování - historie a současnost	11
3. Obsahové látky <i>Vaccinium macrocarpon</i>	12
3.1 Jednoduché cukry a polysacharidy	14
3.2 Nefenolické organické kyseliny	14
3.3 Jednoduché fenoly a benzoáty	14
3.4 Polyfenoly neflavonoidní povahy	15
3.5 Terpeny a jejich deriváty	15
3.6 Anthocyany	15
3.7 Flavonoly	16
3.8 Flavan-3-oly (katechiny)	16
3.9 Proanthocyanidiny	17
4. Účinky na zdraví spojené z konzumací plodů a produktů z <i>V. macrocarpon</i>	18
4.1 Infekce močových cest	19
4.2 Jak působí <i>V. macrocarpon</i> proti infekcím?	20
4.2.2 Mechanismus účinku	21
4.2.3 Biodostupnost proanthocyanidinů	22
5. Doplnky stravy odvozené z <i>Vaccinium macrocarpon</i>	23
5.1 Dávkování	24
5.2 Hodnocení účinnosti doplňků stravy	24
5.3 Bezpečnost užívání doplňků stravy	25
5.4 Nežádoucí účinky spojené s užíváním	25
5.5 Lékové interakce <i>V. macrocarpon</i>	25
5.6 Zdravotní tvrzení uváděná v souvislosti s doplňky stravy	26

6. Faktory, které ho ovlivňují složení klikvových produktů.....	28
6.1 Složení extraktů z <i>Vaccinium macrocarpon</i>	29
7. Přehled metod používaných ke stanovení PAC.....	30
7.1 Metody kvantitativní	30
7.2 Metody kvalitativní	30
IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
1. Přehled hodnocených doplňků stravy	32
2. Hodnocení informací doprovázejících doplňky stravy.....	34
2.1 Povinné údaje vztahující se k doplňkům stravy.....	34
2.2 Nepovinné údaje vztahující se k doplňkům stravy	35
2.3 Doporučené dávkování a délka užívání	35
2.4 Uvádění botanického původu extraktů	36
3. Analýza extraktu <i>Vaccinium macrocarpon</i> pomocí chromatografie na tenké vrstvě	36
3.1 Použité materiály	36
3.1.1 Rozpouštědla, chemikálie a pomůcky	36
3.1.2 Referenční látky	37
3.1.3 Detekční činidla.....	37
3.1.4 Rostlinný materiál	37
3.2 Příprava vzorků	37
3.3 Popis metody.....	37
3.3.1 TLC-1	38
3.3.3 TLC-2	38
3.3.4 TLC-3	38
3.3.5 TLC-4	38
3.4 Výsledky	38
4. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	41
4.1 Použité materiály	41
4.1.1 Rozpouštědla, chemikálie a pomůcky	41
4.1.2 Referenční látky	41
4.1.3 Rostlinný materiál	41
4.2 Příprava vzorků	41
4.3 Popis HPLC metody	42
4.4 Výsledky	43

5. Stanovení antioxidační aktivity	43
5.1 Použité materiály	44
5.1.1 Rozpouštědla, chemikálie a pomůcky	44
5.1.2 Rostlinný materiál	44
5.2 Postup stanovení	44
5.3 Výpočet	44
5.4 Výsledky	45
6. Kvantitativní stanovení PAC s využitím reakce s DMAC	45
6.1 Mechanismus a specifita reakce	46
6.2 Výběr standardu	46
6.3 Reakční podmínky	46
6.4 Přesnost stanovení	47
6.5 Vlastní stanovení	47
6.5.1 Rozpouštědla, chemikálie a pomůcky	47
6.5.2 Referenční látky	48
6.5.3 Rostlinný materiál	48
6.5.4 Pracovní roztoky a jejich složení	48
6.5.4.1 Příprava pracovního a kontrolního roztoku standardu	48
6.5.5 Extrakce PAC a příprava vzorků	49
6.5.6 Provedení analýzy	49
6.6 Výpočet a výsledky	51
V. DISKUSE	55
1. Analýza extraktu <i>Vaccinium macrocarpon</i> pomocí TLC	55
2. Analýza extraktu pomocí HPLC	56
3. Stanovení antioxidační aktivity přípravků	56
3. Kvantitativní stanovení PAC s využitím reakce s DMAC	56
VI. ZÁVĚR	58
VII. POUŽITÁ LITERATURA	59
VIII. ABSTRAKT	65
IX. ABSTRACT	66

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ARS	Agricultural Research Service
AV ČR	Akademie věd České republiky
CSM/MHRA	Committee on Safety of Medicines/Medicines and Healthcare products Regulatory Agency
CYP	Cytochrom P450
DDD	Doporučená denní dávka
DMAC	4-Dimethylaminocinnamaldehyd
DPPH	2,2-Difenyl-1-pikrylhydrazyl
DS	Doplňky stravy
EFSA	European Food Safety Authority
GRIN	Germplasm resources information network
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IMC	Infekce močových cest
INR	International normalized ratio
MS	Hmotnostní spektrofotometrie
NRCS	Natural Resources Conservation Service
PAC	Proanthocyanidiny
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SD	Směrodatná odchylka
SDG	Diglukosid secoisolariciresinolu
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
USDA	United States Department of Agriculture
USP	United States Pharmacopeia
VASCAN	Database of Canadian vascular plants

I. ÚVOD

Oblast doplňků stravy se rychle rozvíjí, zaujímá stále větší pozici ve farmaceutickém průmyslu a získává čím dál větší pozornost spotřebitelů. Doplňky stravy mohou představovat nejen prostředek k obohacení jídelníčku o cenné látky, ale i vhodný doplněk k základní farmakologické léčbě pacienta.

Samozřejmě tyto přípravky nelze zaměňovat za léky. Řídí se zákonnými normami o potravinách. Bylo by ale nesprávné tvrdit, že potraviny nedisponují zdraví prospěšnými a léčivými účinky. Vždyť od počátku své existence člověk využívá rostlinné a živočišné zdroje nejen k obživě, získávání materiálů a energie, ale i k objevování a extrakci léčivých látek a vyvíjení nových léků.

Někteří odpůrci doplňků stravy tvrdí, že nepředstavují větší přínos než potraviny samotné. Avšak z poznatků o neuvěřitelné rozmanitosti přírodních látek, formách jejich výskytu, proměnlivosti jejich obsahu a o tom, že na naše zdraví mohou působit pozitivně i negativně je jasné, že právě doplňky stravy mohou představovat výhodnou možnost jak co nejlépe využít obrovský potenciál přírodních látek. Ve spojení s novými technologiemi získávání, analýzy a zpracování přírodních látek se bude oblast doplňků stravy bezpochyby dál intenzivně vyvíjet. Měla by být důležitou oblastí zájmu farmaceutů.

Přestože jsou doplňky stravy vlastně potravinami, prodávají se v lékárně. Od lékárníka je tedy očekáváno, že pacientovi podá solidní informace a vhodná doporučení. Profesionální přístup by měl znamenat, že lékárník ví a rozumí tomu, co pacientovi prodává, či vydává. To je ovšem s dnešní situací na trhu s doplňky stravy velmi těžké.

Situace je nepřehledná – zatímco některé přípravky jsou dobře charakterizované, u jiných se těžko hledá přesná a ucelená informace o původu a složení. Problémem je uvádění klinicky neověřené informace o účincích obsahových látek, chybějící standardizace přípravků, neadekvátní kontrola ze strany úřadů a velký prostor pro klamání spotřebitele.

Vedoucí mé diplomové práce se dlouhodobě zabývá zástupci rodu *Vaccinium* a věnuje se jejich výzkumu. Vybraným taxonem se stal *Vaccinium macrocarpon*, v české kotlině spíše známý pod nesprávným názvem brusinka. Je již dlouho využíván jako prostředek k podpoře funkce močového ústrojí, zejména při infekcích močových cest. Plody *Vaccinium macrocarpon* jsou bohatým zdrojem flavonoidů. Výzkum se zaměřil zejména na proanthocyanidiny a právě tyto obsahové látky se považují za klíčové z hlediska účinnosti.

K fytochemické analýze jsme nepoužili rostlinný materiál, ale přípravky s jeho obsahem. Na českém trhu je mnoho doplňků stravy doporučovaných k použití při infekcích močových cest s deklarovaným obsahem *Vaccinium macrocarpon*. Rozhodli jsme se na taxon nahlédnout právě skrz problematiku doplňků stravy a zjistit, zda jsou taková doporučení vhodná a zda doplňky stravy skutečně obsahují rostlinný materiál z *Vaccinium macrocarpon*.

II. CÍL PRÁCE

Primárním cílem práce je fytochemická analýza doplňků stravy, v jejichž složení je deklarována přítomnost produktů odvozených z *Vaccinium macrocarpon*. A to zejména zhodnocení obsahu látek, které se považují za klíčové z hlediska účinnosti.

Další pracovní cíle vyplývající z potřeby mít ucelený přehled v rámci dané problematiky: charakteristika vybraného taxonu, vytvoření přehledu o obsahových látkách a metodách jejích analýzy, vyhledání důvěryhodných informací o účincích na zdraví člověka a zhodnocení opodstatněnosti existence daných přípravků a jejich doporučení k léčbě infekcí močových cest.

III. TEORETICKÁ ČÁST

1. Botanická charakteristika

1.1 Taxonomické zařazení druhu

Rodový název *Vaccinium* L. je latinské pojmenování pro borůvku, odkazuje na farmaceuticky významnou podčeleď *Vaccinioideae* (borůvkovité) čeledi *Ericaceae* (vřesovcovité), která spojuje známé lesní keříky poskytující jedlé bobule - borůvky, brusinky a klikvy, druhy poskytující lékopisné suroviny - medvědici lékařskou, rostliny využívané tradiční medicínou - vřes (*Calluna*) nebo pěstované jako okrasné - pěnišník (*Rhododendron*). Čeleď patří do řádu *Ericales* (vřesovcotvaré) dvouděložných krytosemenných rostlin¹. Pro přehlednost uvádím taxonomické zařazení druhu převzaté z databáze GRIN² a doplněné o údaje z jiných zdrojů^{3,4}:

Čeleď: *Ericaceae*

Podčeleď: *Vaccinioideae*

Tribus: *Vaccinieae*

Rod: *Vaccinium*

Sekce: *Oxycoccus* Hill

Druhy: *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers.

Vaccinium macrocarpon Aiton

Sekce: *Vitis-idaea* W.D.J. Koch

Druhy: *Vaccinium vitis-idaea* L.

Sekce: *Myrtillus* Dumortier

Druhy: *Vaccinium myrtillus* L.

Zřejmě první název předlineovského období, který odkazuje na vlastnosti plodů klikvy (z řečtiny oxys = kyselý, coccos = bobule) poprvé použil německý botanik a farmaceut Valerius Cordus (1515 - 1554)⁵. Tento všeobecně platný synonymní název *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers. vypovídá o dřívějším, některými autory dosud uznávaném, samostatném postavení rodu *Oxycoccus* Hill. Jak píše Suda⁶, tento rod se od *Vaccinium* liší

zejména plazivým růstem, hluboce čtyřdílnou květní korunou s cípy zahnutými nazpět, prašníky bez přívěšků, vřdyzeleností a reprodukčním způsobem - *Vaccinium* je autosterilní, u *Oxycoccus* je časté samoopylení.

V moderní botanice, na základě genetických dat je rod *Vaccinium* pojímán široce a *Oxycoccus* je do něj zahrnut v podobě samostatné sekce^{7,8}. Do této sekce patří *Vaccinium macrocarpon* Aiton - klikva velkoplodá a *Vaccinium oxycoccos* L. - klikva maloplodá. Další druhy, například *Oxycoccus palustris* Pers. - klikva bahenní široce uváděná evropskými autory⁹, se v moderních databázích ztotožňují s již zmíněným *Vaccinium oxycoccos* L. a jejich jména platí pouze jako synonymní názvy. Elisens⁸ píše, že v Evropě se odlišným ploidním úrovním jednoho druhu někdy uděluje samostatné taxonomické postavení, že však není možné důsledně rozlišit hexaploidní rostliny od diploidních nebo tetraploidních na základě proměnlivých morfologických znaků. Tato variabilita se například projevuje odlišným ochlupením květní stopky, různou velikostí listu či různou barvou plodu, a to v závislosti na podmínkách stanoviště. Naproti tomu, *Vaccinium macrocarpon* se jeví jako druh málo proměnlivý, jednoznačně charakterizovaný a celosvětově uznávaný.

1.2 Výskyt

Klikva je rozšířená od mírného do arktického pásma severní polokoule. Za nejstarší současný druh je považován právě *Vaccinium macrocarpon*, který je domovem na území Severní Ameriky v oblasti Apalačského pohoří⁶. Vyskytuje se na východě Kanady - zasahuje až na Newfoundland, na severovýchodě až jihovýchodě USA, i v oblasti pacifického pobřeží - od Britské Kolumbie až po Kalifornii². Klikvě velkoplodé se právem říká klikva americká⁴.

Z tohoto původního druhu se zřejmě vyvinul *Vaccinium oxycoccos*, který se rozšířil do subarktické oblasti - na Aljašku a přes nejsevernější území Kanady až do Gronska. Nakonec přes severní Asii migroval i do Evropy, kde je dobře znám ve Skandinávii, Pobaltí, v evropském Rusku, v Bělorusku a na Sibiři. Najdeme ho na Kurilských ostrovech, v Japonsku, v severní Číně a v Koreji. Tato klikva maloplodá, nebo také evropská, se vyskytuje i v alpských oblastech Itálie, Rakouska a Švýcarska². V České republice je druh chráněný.

Přirozeným biotopem klikvy jsou rašeliniště, podmáčené smrčiny a mokřady. Euroasijský druh roste také na vyvýšenějších a sušších místech - v alpské a arktické tundře. Klikva, jako všechny vřesovcovité, se vyznačuje schopností růst za velmi nepříznivých podmínek, na chudých a kyselých půdách. Životně důležitou vlastností těchto rostlin je symbiotické soužití

s vřecovýtusnými houbami - mykorhiza, umožňuje jim čerpat živiny ze zdrojů pro jiné rostliny nedostupných¹⁰.

1.3 Popis druhu

Klikva velkoplodá tvoří vytrvalé, vždyzelené, poléhavé keříky. Hlavní lodyha je dřevnatá, plazivá, až 2 m dlouhá, v paždí pupenů vyrůstají adventivní vláskovité kořeny, z lodyhy odstupují vertikálně rostoucí, do výšky asi 15 cm, bohatě olistěné větve. Listy jsou drobné, kožovité, krátce řapíkaté, elipsovité, s nepatrně podvinutým okrajem čepele. Tyto xeroformní listy a takzvaný erikoidní vzhled se mimo jiné vysvětluje přizpůsobením rostlin k nedostatku dusíku v půdě¹⁰.

Květy vyrůstají jednotlivě, z úžlabí listů, na dlouhých nitovitých květních stopkách. Koruna



Obr. 1 Vyobrazení *Vaccinium macrocarpon*. Převzato z Katalogu rostlin pěstovaných v Královské botanické zahradě v Kew¹¹ (William Aiton 1789).

je čtyřčetná, s cípy obrácenými nazpět, barvy bílé až růžové. Tyčinky mají purpurové, chlupaté nitky a žlutě zbarvené trubkovitě protažené prašníky^{6,8}. Tyčinky spolu s pestíkem tvoří konický útvar obrácený k zemi a květ je svěšený dolů. Nejspíše právě pro podobnost květu klikvy s jeřábem - ptákem s dlouhým krkem a červenavou hlavou, první američtí osadníci tuto rostlinu pojmenovali *cranberry* (anglicky *crane* - jeřáb). Díky svým plodům - kulatým až oválným jasně červeným vícesemenným bobulím - je klikva odedávna velmi ceněnou rostlinou.

2. Pěstování - historie a současnost

Původní severoamerické kmeny znaly a využívaly plody klikvy jako léčivo, pochutinu, prostředek ke konzervaci masa a jako barvivo. Dá se říct, že to byli právě Indiáni, kdo začali tuto rostlinu kultivovat. Vypalovali rozsáhlá území jejího výskytu, aby zabránili zalesnění, obnovili staré porosty a zvýšili úrodu. Stala se oblíbenou i mezi prvními osadníky - je součástí tradičního oběda v Den díkuvzdání. Plody klikvy se sbírají na podzim až po přemrznutí, na rostlině však vydrží i do příštího jara. Protože se dají poměrně dlouho uchovávat čerstvé jen ve vodném nálevu, bezpochyby sloužily mnohým mořeplavcům jako prostředek proti kurdějím¹².

Za prvního pěstitele klikvy se považuje Henry Hall, s kultivací začal v roce 1816 ve státě Massachussets¹². Klikva se v té době začíná dovážet i do Evropy, avšak Britové ji dozajista znali už dlouho před tím. William Aiton ve svém katalogu rostlin pěstovaných v Královské botanické zahradě v Kew¹¹ z roku 1789 popisuje oba druhy - *V. oxycoccos* jako původní britský a *V. macrocarpon* jako původní americký druh.

V moderní Americe je klikva doslova národním ovocem a pěstuje se ve velkém. Je důležitou zemědělskou plodinou ve státech Wisconsin, Massachusetts, New Jersey, Oregon, Washington a kanadských provinciích British Columbia, New Brunswick, Quebec. Jen v USA se pěstuje na ploše 16000 hektarů a roční produkce je 7,5 milionů barelů - asi 50 milionů tun klikvy¹³. Zajímavý je způsob sklizně - takzvaný „mokrý“, kdy se plantáže pomocí speciálních hrází zaplní vodou, bobule vyplavou na povrch a za použití strojů se utrhnou z větviček a shromáždí k dalšímu sběru.

Zmínky o pěstování klikvy velkoplodé v Evropě nejsou četné. Pěstuje se ve Skotsku, v severním Polsku, Bělorusku, avšak není jisté, o který druh se jedná, a produkovaná množství jsou zanedbatelná. Tam, kde není klikva maloplodá ohroženým druhem (Skandinávie, Rusko) sbírá se dívoce rostoucí a tradičně se používá jako pochutina a léčebný prostředek.

3. Obsahové látky *Vaccinium macrocarpon*

O významu klikvy jako léčivé rostliny vypovídá skutečnost, že je součástí amerického lékopisu - United States Pharmacopeia (USP). Stat¹⁴ nazvaná *Cranberry Liquid Preparation* uvádí, že se jedná o jasně červenou šťávu z plodů *Vaccinium macrocarpon* nebo *Vaccinium oxycoccos*. Zdá se, že tyto dva druhy se významně neliší složením¹⁵. Avšak kultivovaný *V. macrocarpon* existuje v různých vyselektovaných varietách, například s vyšším obsahem vstřebatelných antioxidantů. Je široce používán v potravinářství a farmacii a těší se intenzivnímu výzkumu. Proto v práci popisují právě tento druh.

Klikva velkoplodá poskytuje širokou škálu biologicky aktivních látek. V dnešní době je určeno asi 150 z nich¹⁶, Guay ve své práci¹⁷ uvádí až 248 obsahových látek. Tabulka I shrnuje nejdůležitější z nich, uvádí funkci látek v rostlině, následně pak v lidské stravě a potenciální účinky na zdraví člověka.

Tabulka I

Přehled obsahových látek *Vaccinium macrocarpon* s potenciálními pozitivními účinky na zdraví

Druh sloučeniny	Příklad látky	Funkce v rostlině	Vlastnosti v produktech	Potenciální účinky na zdraví
<u>Flavonoidy:</u>				
Anthocyany	peonidin-3- <i>O</i> -galaktosid	barevný atraktant	červené zbarvení	PN, AOX, NP, PKS
Flavonoly	quercetin-3- <i>O</i> -galaktosid	barevný atraktant, reprodukce, UV protekce	pigment, antioxidant	PN, PZ, AOX, PKS
Flavanoly (katechiny)	epikatechin	obrana patogenům	proti adstringentní chuť, antioxidant	PN, PZ, AOX, PKS
Proanthocyanidiny	procyanidin A2	obrana patogenům, strukturní	proti adstringentní chuť, antioxidant	AAB, AOX, AU, AAV, PKS, NP
Polymerní barevné sloučeniny	cyanidin-pentosid-flavan-3-ol	barevný atraktant	červenohnědý pigment	AOX, AAB, AAV
<u>Neflavonoidní sloučeniny:</u>				
Polyfenoly	resveratrol	různé	adstringentní chuť, antioxidant	PN, PZ, AOX
Jednoduché fenoly	kyselina salicylová	antioxidant, vonný atraktant	vůně, antioxidant	PN, PZ, AOX, PKS
<u>Nefenolické sloučeniny:</u>				
Organické kyseliny	kyselina askorbová	antibakteriální	kyselá chuť	PN, AOX
Polysacharidy	pektin	strukturní	gelotvorná látka	PN, AOX
Sacharidy	fruktosa	zásoba energie	sladká chuť	AAB, PN

Použité zkratky: AAB = antiadhezivní účinek na bakterie, AAV = antiadhezivní účinek na viry, AOX = antioxidační, AU = antiulcerózní, NP = neuroprotektivní, PKS = pozitivně působící na kardiovaskulární systém, PZ = protizánětlivý. Podle práce¹⁶ Pappas (2009).

Největší skupinou jsou flavonoidy. Tento pojem je vzhledem k rozmanitosti látek k němu přiřazovaných velice široký. Obecně jsou flavonoidy látky se základní strukturou C6-C3-C6, dvě benzenová jádra (kruhy A a B) spojená propanovým můstkem, který spolu s fenolickým kyslíkem tvoří kruh C. Jedná se o deriváty základní struktury - flavanu (nebo také

fenylchromanu), chemicky 1-fenyl-2*H*-benzopyranu. Podle stupně oxidace kruhu C potom rozlišujeme skupinu flavonů (zahrnuje flavony, flavonoly, flavanony) – bezbarvých až žlutavých látek (*flavus*=žlutý), k nimž se řadí citrusový hesperidin a jiné významné léčivé látky jako kvercetin, rutin, diosmin, a skupinu flavanolů (flavan-3-olů) – bezbarvých až růžových sloučenin, která zahrnuje dvojice isomerů katechin a epikatechin, gallokatechin a epigallokatechin. Kondenzací těchto jednoduchých katechinů vznikají dimerní, oligomerní nebo až polymerní sloučeniny - proanthocyanidiny, více známé pod pojmem kondenzované třísloviny, například jako hlavní složky čaje¹⁸.

3.1 Jednoduché cukry a polysacharidy

Obsah jednoduchých cukrů (glukosa, fruktosa, sacharosa) je asi 4 g na 100 g čerstvého ovoce¹⁹. Polysacharidy jsou zastoupeny hlavně pektinem, celulosou a hemicelulosou. Monomerní jednotky rozpustné polysacharidové frakce jsou nejčastěji arabinosa, glukosa a galaktosa¹⁶. Tyto cukry se také nejčastěji účastní glykosidové vazby s aglykony flavonoidů. Vznikající *O*-glykosidy jsou běžnou formou výskytu flavonoidních sloučenin, výhodnou pro rostlinu z hlediska rozpustnosti a skladování¹⁵.

3.2 Nefenolické organické kyseliny

Tvoří 2,67 až 3,65 % váhy čerstvého ovoce. Tři nejvíce zastoupené kyseliny – chinová, citronová a jablečná jsou přítomné ve velmi stálém vzájemném poměru (1 : 1 : 0,75), čehož se využívá k hodnocení kvality a totožnosti klikvových produktů, zejména džusů. Obsah kyseliny askorbové je průměrný, a to 11,5 mg na 100 g plodů¹⁶.

3.3 Jednoduché fenoly a benzoáty

Tyto látky jsou v klikvě přítomné v nezvykle velkém množství. K charakteristické vůni čerstvého ovoce významně přispívají zejména kyselina benzoová (4,7 mg na 1 g ovoce), benzylalkohol, benzaldehyd a benzylbenzoát. Z derivátů kyseliny hydroxybenzoové jsou ve značném množství přítomné také kyselina vanilinová (0,05 mg/1 g), 2,4-dihydroxybenzoová (0,04 mg/1 g), salicylová (0,02 mg na 1 g). Druhou skupinu tvoří kyselina skořicová (0,02 mg/1 g) a její deriváty – kyselina *p*-kumarová (0,25 mg/1 g), sinapová (0,21 mg/1 g), kávová (0,16 mg/1 g).

Celkový obsah fenolických kyselin byl stanoven na 0,57 % váhy čerstvého ovoce. Jen malá část (asi 10 %) se nachází ve volné formě a většina je esterifikována cukry, polysacharidy buněčné stěny a jinými makromolekulami²⁰. Například kyselina chlorogenová v množství 5,1 mg na 1 l džusu byla detekována až po kyselé hydrolyze vzorku¹⁶.

3.4 Polyfenoly neflavonoidní povahy

Obsah *trans*-resveratrolu (bioaktivnější izomer resveratrolu) v čerstvém klikvovém džusu není zanedbatelný – přibližně 0,2 mg/l. Nedosahuje sice obsahu této cenné látky v červeném víně (kolem 14 mg/l), ale je porovnatelný s obsahem v džusu grepovém (až 0,5 mg/l). Uvádí se také obsah celkového resveratrolu (*trans*- i *cis*-forma) zjištěný v divoce rostoucích plodech - 0,9 mg/1 g suché váhy. Zajímavý je obsah lignanu s estrogení aktivitou - secoisolariciresinolu (vyskytuje se jako diglukosid, SDG), který je v porovnání s jinými rostlinnými zdroji významný, uvádí se 10,54 mg/1 kg suché váhy¹⁶.

3.5 Terpeny a jejich deriváty

Analýzou aromatických látek obsažených v klikvě bylo zjištěno 19 různých terpenů, například nerol, limonen, linalool, myrcen, α - a β -pinen. Převažující je α -terpineol²¹. Plody klikvy jsou dobrým zdrojem kyseliny ursolové – obsah se uvádí mezi 60 až 110 mg na 100 g plodů, což je mezi jinými bobulemi rodu *Vaccinium* (*V. vitis-idaea*, *V. oxycoccus*, *V. angustifolium*) zcela nejvíce. Ve složení byly též identifikovány zřídka se vyskytující deriváty této kyseliny - její estery s kyselinou *cis*- a *trans*-3-*O*-*p*-hydroxyskořicovou²².

3.6 Anthocyany

Látky velice rozšířené v rostlinách, hlavně v plodech a květech, jsou zodpovědné za atraktivní zbarvení. Jako většina flavonoidů, nevyskytují se samostatně jako aglykony (anthocyanidiny), ale ve formě glykosylované – ve spojení s jednou či více cukernými jednotkami. Glykosylovaná forma je stabilnější a rozpustná ve vodě, mění svoje zbarvení podle pH prostředí. Červený flavylium-kation je stabilní při hodnotách pH 3 a nižších²³. Hlavními anthocyany jasně červených klikvových plodů jsou 3-monogalaktosidy, 3-monoarabinosidy a 3-monoglukosidy

cyanidinu a peonidinu. Ve zpracovaných produktech (džusy, sušené plody) byla identifikována řada dalších. K celkovému počtu 13 různých anthocyanů přispívají glykosidy malvidinu, pelargonidinu, delphinidinu a petunidinu. Tyto však tvoří přibližně 1% celkového obsahu anthocyanů a je otázkou, zda nejsou pouze artefakty vzniklémi jednak během průmyslového zpracování, jednak při přípravě a analýze vzorků. Celkový obsah anthocyanů kolísá od 13,6 do 140 mg na 100 g čerstvého ovoce v závislosti na stupni zralosti a odrůdě. Značně menší množství obsahují džusy – od 1,2 do 2,5 mg na 100 ml¹⁶. Menší obsah v džusu se dá vysvětlit mimo jiné tím, že se anthocyany kumulují ve slupce (exokarpu) bobule a při běžném zpracování zůstává velká část z nich ve zbytcích po lisování.

3.7 Flavonoly

V plodech *V. macrocarpon* se předpokládá existence až 22 různých struktur, 15 z nich již bylo identifikováno. Nejvíce zastoupené jsou glykosidy kvercetinů (například hyperosid v koncentraci 7,04 mg/100 g), myricetinů (myricetin-3-arabinosid v koncentraci 3,75 mg/100 g), a v menší míře kemferolu. S celkovým obsahem flavonolů mezi 20 až 40 mg na 100 g čerstvého ovoce je klikva jedním z nejbohatších zdrojů těchto látek. Ovšem, jako i v případě jiných flavonoidů, obsah látek ve zpracovaných produktech bývá značně menší. Například koncentrace hyperosidu v klikvovém džusu klesá na 2,32 mg/100 ml, tedy více než o polovinu ve srovnání s čerstvými plody¹⁶.

3.8 Flavan-3-oly (katechiny)

Sdílí stejnou strukturu s flavonoly, ale postrádají karbonylovou skupinu na C-4 (uhlík číslo 4 kruhu C). Na rozdíl od jiných flavonoidů se v rostlinách objevují jako volné aglykony, protože jsou ve vodě dobře rozpustné i bez glykosylace.

Jednotlivé katechiny (jak se flavan-3-oly souhrnně označují) se rozlišují podle počtu a poloh hydroxylových skupin a podle konfigurace na dvou přítomných centrech chiralit (C-2 a C-3). Nejčastěji se vyskytuje dvojice isomerů (–)-epikatechin (stereochemie vazby C2 – C3 je *cis*) a (+)-katechin (*trans*-isomer). Jsou to pentahydroxyflavany, obsahují 5 hydroxylových skupin v polohách 3, 5, 7, 3' a 4'. Analogicky se vyskytuje dvojice hexahydroxyflavanů (3, 5, 7, 3',4',5'), a to (–)-epigallokatechin a (+)-gallokatechin²⁴.

Nejčastějším katechinem klikvy je (-)-epicatechin (4,5 mg/100 g). Celkový obsah monomerních flavan-3-olů je ve srovnání s jinými druhy ovoce průměrný, a to 7 mg/100 g¹⁶.

Reakcemi katalyzovanými světlem, teplem a působením kyslíku se flavan-3-oly spojují s dalšími látkami. Například ester s kyselinou gallovou (-)-epigallokatechin-gallát (EGCG) je významnou složkou zeleného čaje. V plodech klikvy byly identifikovány (+)-gallokatechin-gallát (0,4 mg/100 g), (-)-epigallokatechin-gallát (1,9 mg/100 g) a větší množství (+)-katechin-gallátu (7,9 mg/100 g), ovšem až po hydrolýze vzorků, proto je třeba existenci a obsah těchto látek v klikvě ověřit. Ne zcela potvrzená je také existence oligomerních sloučenin flavanolů s anthocyany (například cyanidin-pentosid-flavan-3-olu)¹⁶.

Monomerní katechiny se také spojují navzájem a tvoří tak základ široké skupiny látek zvaných proanthocyanidiny.

3.9 Proanthocyanidiny

Proanthocyanidiny (PAC) jsou v rostlinách a rostlinných produktech druhou nejrozšířenější skupinou flavonoidů. Právě PAC jsou zodpovědné za svíravou (adstringentní) chuť červeného vína, čaje nebo čokolády. Schopnost tvořit komplexy s bílkovinami, polysacharidy, kovy a alkaloidy se vysvětluje jejich vysokou relativní molekulovou hmotností a velkým počtem volných hydroxylových skupin. Pro tyto vlastnosti se PAC označují jako kondenzované třísloviny (druhou strukturně odlišenou skupinu tříslovin tvoří třísloviny hydrolyzovatelné - estery kyseliny gallové a ellagové s glukosou²⁴.

PAC se objevují jako dimery až polymery vzniklé enzymatickou kondenzací flavan-3-olových jednotek. Společnou vlastností proanthocyanidinů je to, že zahříváním v kyselém prostředí poskytují anthocyanidiny, odtud jejich název. Podle toho, který typ flavanolových jednotek obsahují a který typ anthocyanidinu následně poskytují, se dělí na několik skupin. Nejčastější jsou procyanidiny (s 3',4'-dihydroxysubstitucí kruhu B, tedy sestávající z katechinu a epikatechinu) a prodelfinidiny (s 3',4',5'-trihydroxysubstitucí - z gallokatechinu nebo epigallokatechinu)²⁴.

Nejčastějším typem interflavanových vazeb jsou C – C vazby mezi C-4 (uhlík číslo 4) jednoho flavanolu („horní“ jednotka) a C-6 nebo C-8 druhého („dolní“ jednotka). Takové PAC se označují jako tzv. B-typu (dimery) a C-typu (trimery). V přírodě méně rozšířené PAC typu A obsahují kromě vazby C – C ještě navíc vazbu typu C – O, a to mezi C-2 horní monomerní jednotky a kyslíkem na C-7 jednotky dolní. Názvosloví PAC je analogické jako u polysacharidů.

V názvu se uvádí jednotlivé monomery, v závorce se uvádí typ a směr vazby (4 →), a konfigurace na C-4 jako α nebo β . U A-typu se v závorce uvádí obě dvě vazby²⁴.

Unikátní vlastností plodů *V. macrocarpon* je vysoký obsah a přítomnost zřídka se vyskytujících typů proanthocyanidinů a s nimi spojené prospěšné účinky na zdraví člověka. Celkový obsah PAC v čerstvých plodech klikvy byl stanoven na 418 mg/100 g, přičemž mezi 21 hodnocenými druhy ovoce jen plody aronie měly větší obsah. V souvislosti s neobyčejně velkou strukturní rozmanitostí PAC a jejich problematickým analytickým hodnocením jen malá část těchto látek byla přesně definována. V klikvě byly stanoveny dva dimery: procyanidin A-2 (epikatechin-(4 β →8, 2 β →7)-epikatechin) a B-2 (epikatechin-(4 β →8)-epikatechin). Dále tři trimery A-typu, například epikatechin-(4 β →6)-epikatechin-(4 β →8, 2 β →7)-epikatechin. Početnější jsou tetramery a pentamery složené převážně z epikatechinových jednotek, prodloužené jednotkami epigallokatechinovými a katechinovými a zakončené pomoci vazby A-typu. Z celkové analýzy PAC vyplývá, že jsou přítomné látky s 10 a více jednotkami (průměrný stupeň polymerizace je 4,7), až 65 % z nich obsahuje alespoň jednu vazbu typu A, která většinou připojuje terminální jednotku. Koncové vazby typu A jsou pro klikvu velmi příznačné. PAC tohoto typu se našly ve velmi malém množství v arašídech, v 88 jiných druzích ovoce zjištěny nebyly¹⁶.

4. Účinky na zdraví spojené z konzumací plodů a produktů z *V. macrocarpon*

Zvýšený obsah rostlinné složky v potravě dobře koreluje se sníženým výskytem kardiovaskulárních onemocnění, poklesem rizika vzniku rakoviny a zpomalením degenerativních procesů a stárnutí organismu. Kromě jiného pramení tyto účinky z obsahu látek fenolické povahy a jejich antioxidačního působení. Plody klikvy jsou bezpochyby bohatým zdrojem těchto látek. *In vitro* antioxidační kapacita obsahových látek plodů *V. macrocarpon* patří k nejvyšším ve srovnání s jiným běžně konzumovaným ovocem v USA¹⁶. Intenzivně studovány jsou antiproliferační, protizánětlivé a neuroprotektivní účinky *V. macrocarpon*²⁵. Data získaná *in vitro* a *in vivo* podporují to, co je již známo o prospěšnosti rostlinných metabolitů. Obecně se dají tyto účinky shrnout v několika bodech:

- příznivé působení na kardiovaskulární systém,
- protinádorové působení,
- předcházení vzniku neurodegenerativních onemocnění,

- modulace zánětlivých procesů.

Avšak nejznámějším účinkem, který je pro plody klikvy charakteristický a pramení z unikátní skladby obsahových látek, je inhibice adheze patogenů na cílovou tkáň. Ukazuje se, že látky z proanthocyanidinové frakce obsažené v klikvě usnadňují eradikaci *Helicobacter pylori* ze žaludku a jsou vhodným doplňkem k antibiotické léčbě. Působí také proti přilnavosti a tvorbě povlaků bakterií *Streptococcus mutans* a *Porphyromonas gingivalis* v dutině ústní a pomáhají předcházet rozvoji zubního kazu a parodontitidy. Hodnotí se i působení proti nejružnějším virům, například proti enterovirům a virusu chřipky²⁶. Již tradiční je použití klikvy proti infekcím močových cest.

4.1 Infekce močových cest

Infekce močových cest (IMC) jsou po infekcích cest dýchacích druhými nejčastějšími. V populaci v reprodukčním věku postihují až 50 krát častěji ženy než muže. Uvádí se, že až 30 % žen prodělá aspoň jednou za život infekci močových cest. IMC jsou definovány jako přítomnost významného množství bakterií ve vývodných močových cestách, v ledvinovém parenchymu (pyelonefritis) nebo v prostatě. Až v 90 % případů je původcem gramnegativní bakterie *Escherichia coli*, která je běžnou součástí střevní flóry a do močového traktu proniká vzestupnou cestou²⁷. Nejčastěji se vyskytují infekce dolních močových cest - močové trubice (urethritis) a močového měchýře (cystitis). Projevují se bolestí v podbřišku, řezavým močením a častým nucením na močení. Někdy je průběh asymptomatický. Komplikovaná infekce může vyústit v akutní pyelonefritidu projevující se tupou bolestí v bederní krajině a vysokou teplotou a vyžadující neodkladnou lékařskou péči. Zvláště nebezpečné jsou IMC u těhotných žen. Nekomplikované IMC mají sklon k recidivám a přechodu do chronicity. Až třetina žen, které prodělaly IMC, uvádí, že se infekce opakovala v průběhu příštích 6 měsíců. Tyto opakující se IMC jsou pro pacienta obtěžující, a v neposlední řadě jejich léčba je značně nákladná. Léky první volby u nekomplikovaných IMC jsou trimetoprim a sulfametoxazol podávané v kombinaci po dobu tří dnů. Další možností jsou nitrofurantoin nebo fluorochinolony. Důležitou součástí léčby by mělo být zjištění citlivosti etiologického agens. Od jednorázového či jednodenního podání léků se dnes pro malou účinnost naštěstí upouští. Při recidivujících infekcích se antibiotika podávají dlouhodobě - týdny až měsíce. Velkým problémem je vznik rezistentních kmenů bakterií, jež pramení z častého či nesprávného používání antibiotik²⁸.

4.2 Jak působí *V. macrocarpon* proti infekcím?

Plody *V. macrocarpon* a jejích obsahové látky se jako možná alternativa v léčbě a prevenci IMC staly předmětem intenzivního výzkumu.

4.2.1 Doklady o účinnosti

Klinické studie dokládají, že po několikátýdenní každodenní konzumaci klikvy a jejích produktů (džusy, extrakty, sušené prášky) se u sledovaných skupin žen snižuje počet bakterií v moči a/nebo snižuje výskyt IMC. Metaanalýza vybraných randomizovaných placebem kontrolovaných studií publikovaných do roku 2006 stanovila relativní riziko symptomatických IMC po 12 měsících užívání produktů z klikvy na 0,65, tedy 35 % snížení rizika²⁷. Přehled studií zahrnutých do metaanalýzy uvádí tabulka II. Z dat také vyplývá, že *V. macrocarpon* působí výhradně jako preventivní prostředek, zabraňuje vzniku infekce, nepůsobí však na již rozvinutou IMC. Zdá se také, že pozitivní účinek se specificky projevuje u žen. Na skupiny se zvýšeným rizikem vzniku IMC, jako jsou starší lidé a pacienti vyžadující katetrizaci, suplementace klikvovými produkty neměla žádný, nebo jen malý pozitivní účinek^{27,28}.

Tabulka II

Přehled klinických studií zahrnutých do metaanalýzy²⁷ Jepsonové a Craiga (2007)
Převzato z práce²⁶ Shmueli (2012).

Skupina pacientů	Věk pacientů	Počet		Typ IMC	Účinek
		studií	pacientů		
Mladí	21	1	319	symptomatická	ne
Dospělí	31 - 42	3	318	symptomatická	ano
Starší	81 - 82	2	405	symptomatická	ne
	78,5	1	192	pyurie	ano
Pacienti s katetrizací močového měchýře					
Děti	9 - 18	2	55	symptomatická	ne
Dospělí	neupřesněn	2	69	symptomatická	ne

Výsledky dvou nedávno publikovaných klinických studií^{29,30} s pediatrickými pacienty však naznačují, že by klikvové produkty mohly být bezpečnou a účinnou terapií u dětí s rekurentními IMC. Do první studie²⁹ byly zahrnuty děti ve věku od 1 měsíce do 13 let, které měly alespoň dva případy IMC za posledních 6 měsíců. Hodnotilo se riziko vzniku IMC u pacientů léčených trimetoprimem a u pacientů dostávajících klikvový sirup. Byla zjištěna minimálně stejná účinnost (noninferiorita) sirupu ve srovnání s antibiotikem a potvrzena bezpečnost tohoto klikvového produktu pro děti. Druhá studie³⁰ porovnávala preventivní účinnost klikvového džusu bohatého na PAC a klikvového džusu neobsahujícího žádné PAC u dětí s rekurentními IMC. Výsledky potvrzují jednak účinnost této terapie u dětí (65 % snížení rizika onemocnění), jednak spojitost mezi touto účinností a obsahem proanthocyanidinů v klikvě.

4.2.2 Mechanismus účinku

Dříve se předpokládalo, že hlavním mechanismem účastnicím se na potlačení infekce je acidifikace moči díky zvýšené exkreci fenolických kyselin, například kyseliny salicylové, a bakteriostatické působení kyseliny hippurové - metabolitu kyselin benzoové a chinové. Tento mechanismus však nebyl potvrzen a po konzumaci klikvy nebo jejích produktů nebyly zjištěny výrazné změny pH ani dostatečné hladiny kyseliny hippurové¹⁷. Dnes se předpokládá, že obsahové látky klikvy účinkují hlavně prostřednictvím inhibice adheze bakterií *Escherichia coli* na epitel močových cest. Klíčovým krokem k iniciaci infekce je uchycení bakterií osídlujících periuretrální oblast na epitel močové trubice a následná kolonizace postupující nahoru k močovému měchýři²⁷. Kmeny *E. coli* schopné této adheze jsou opatřeny fimbriemi. Jsou to vlasovité proteinové útvary, na nichž bakterie vystavují adheziny – specifické struktury, které se selektivně váží na určité glykoproteinové nebo glykolipidové složky buněčné stěny hostitele a umožňují tak bakteriím přilnout k epitelu. Uropatogenní kmeny *E. coli* disponují dvěma typy adhezínů. Na fimbriích typu 1 jsou adheziny vážící manosu (manosa senzitivní adheziny). Přilnavost bakterií tohoto typu (1-typu) inhibuje fruktosa *in vitro*^{31,32}. Tento mechanismus působení klikvy proti IMC ale nebyl potvrzen, ani jiné ovoce bohaté na fruktosu takové působení nevykazuje, fruktosa je v těle metabolizována jako zdroj energie¹⁷. Druhý typ adhezínů (manosa rezistentní) je vystaven na P-fimbriích a váže se na disacharidovou (α -Gal(1 \rightarrow 4) β -Gal) strukturní jednotku buněčné stěny hostitele³². Tento receptor je také přítomný na erytrocytech – při styku s *E. coli* opatřenými P-fimbriemi podléhají erytrocyty hemaglutinaci. Inhibice hemaglutinace se stala jednou z metod zkoušení antiadhezivní aktivity obsahových látek klikvy. Uropatogenní *E. coli* s P-fimbriemi jsou zodpovědné za velkou část

IMC a početné studie dnes potvrzují, že látkami inhibujícími adhezi těchto bakterií jsou proanthocyanidiny²⁶.

Přesný mechanismus působení zatím nebyl definován, z výzkumu ale vyplývá, že je adhezin-selektivní a že PAC inhibují *E. coli* s P-fimbriemi a jsou neúčinné vůči *E. coli* s fimbriemi typu 1^{31,32}. Bakterie pěstované v médiu obsahujícím klikvový džus mění svůj tvar, což může ovlivňovat jejich schopnost přilnout k epitelu. Je také možné, že PAC snižují bakteriální expresi fimbrií a adhezinů, a to inhibicí enzymů zodpovědných za jejich syntézu. Působení PAC může v bakteriích vyvolávat stresovou odpověď a posunovat je do vývojového stádia, kdy geny odpovědné za expresi virulentních faktorů nejsou funkční¹⁶. Však nejpravděpodobnějším mechanismem se zdá být navození konformačních změn ve struktuře fimbrií látkami povahy tříslovin obsaženými v klikvě. Ve studii³³, která sledovala změny adhezivních sil P-fimbrií a hodnotila bakteriální povrch *E. coli*, bylo zjištěno, že po třech hodinách působení klikvového džusu se fimbrie zkrátily na 1/3 své původní délky a snížily se i adhezivní síly mezi bakteriemi a umělým povrchem. Zkrácení délky a zvýšení hustoty proteinových polymerů jsou zřejmě způsobeny tříslovinami, které ruší terciální strukturu a působí denuraci proteinů fimbrií³³. Dimerní a oligomerní proanthocyanidiny vykazují vlastnosti tříslovin. Mají dostatečný počet hydroxylových skupin (min. 8), aby reagovaly s hydrofilními skupinami proteinů, a vysokou relativní molekulovou hmotnost (nad 600), aby interagovaly s větší plochou bílkovinných struktur a vyvolávaly konformační změny ve fimbriích¹⁶. Studie³² porovnávající antiadhezivní aktivitu jednotlivých typů PAC z různých zdrojů zjistila, že PAC A-typu izolované z klikvy tuto aktivitu vykazují, zatímco PAC typu B z jablečného džusu, zeleného čaje a čokolády nikoliv. Stejně tak *ex vivo* antiadhezivní účinky moče jedinců, kteří konzumovaly potraviny bohaté na proanthocyanidiny, se projevovaly pouze po konzumaci klikvového džusu. Konzumace jablečného a grepfruitového džusu, zeleného čaje ani čokolády se na antiadhezivní aktivitě moče neprojevovaly. Výhradní účinnost PAC A-typu může být vysvětlena povahou přítomné dvojité vazby, která způsobuje menší ohebnost molekuly a větší schopnost vázat se na bílkovinné struktury, nebo hraje roli v tvorbě zatím neznámých účinných metabolitů³¹.

4.2.3 Biodostupnost proanthocyanidinů

V rozporu účinností doloženou *in vitro* a *ex vivo* zůstává otázka biodostupnosti PAC, jejich vstřebatelnosti a metabolismu. Biodostupnost zřejmě závisí na velikosti molekuly. O polymerních proanthocyanidinech z různých zdrojů se uvádí, že se buď nevstřebávají vůbec a

vyučují se navázané na složky potravy, nebo jsou degradovány v kyselém prostředí žaludku na kratší a vstřebatelnější oligomery, či rozloženy střevní florou na další fenolické produkty¹⁸. O menších oligomerních PAC bylo *in vitro* zjištěno, že by mohly být vstřebatelné. Dimerní procyanidin A2, trimer a tetramer A-typu získané z klikvy prochází přes vrstvu buněk lidského intestinálního epitelu, ovšem jen v malém množství (0,6 %, 0,4 % a 0,2 %) ³⁴. Osud jednotlivých typů PAC v organismu může být mimo jiného závislý na pevnosti vazby mezi monomery. Dvojitá vazba A-typu je pevnější a obtížněji podléhá degradaci. Ve studii³⁵, která sledovala složení moči po osmitýdenním podávání klikvového prášku, byly jako hlavní metabolity v moči detekovány kyselina hippurová, salicylová, dihydroxybenzoová a glukuronid kvercetinu, ovšem žádné PAC. Jiná studie³⁶ zjistila velmi malá množství PAC v moči zvířat krmených klikvovými produkty. Špatná biodostupnost ovšem nemusí znamenat absenci účinku *in vivo*. PAC působí antioxidačně ve střevu, neutralizují škodlivé látky a brání jejich vstřebání, šetří tak endogenní antioxidanty, které pak mohou působit jinde v těle. Takto nepřímě se dá vysvětlit i působení PAC proti IMC. Je možné, že na uropatogenní bakterie působí již v tlustém střevu a ovlivňují jejich schopnost kolonizovat v močovém traktu. Je také možné, že antiadhezivní aktivitu v moči vykazují zatím neznámé metabolity PAC¹⁶.

5. Doplnky stravy odvozené z *Vaccinium macrocarpon*

Jak shrnuje ve své přehledové práci²⁷ Jepson, klikva a klikvové produkty mohou být doporučeny k prevenci IMC a snížení počtu jejích recidiv u žen ve fertilním věku. Studie zahrnuté do přehledu hodnotily účinnost klikvového džusu (v 6 případech), přípravků ve formě tablet (ve 3 případech), v jednom případě se hodnotily obě formy. Jako účinná denní dávka určená na základě dávek používaných ve studiích se uvádí 240 až 300 ml džusu, který obsahuje 25 % ovocné složky. Vysoké procento vysazení džusu během terapie (až 55 %) poukazuje na špatnou akceptovatelnost této formy po delší dobu. Doplnky stravy se zdají být dobrou alternativou. Neobsahují cukr a pacienti nemusí měnit svoje stravovací návyky. Nevyřešenou otázkou zůstaly délka užívání a dávkování produktů, a to především pro obtížnou porovnatelnost z hlediska obsahu účinných látek.

5.1 Dávkování

Dnes již jsou k dispozici studie zabývající se vztahem mezi antiadhezivní aktivitou a účinnou koncentrací či dávkou PAC. Ve studii³⁷, která sledovala *in vitro* antiadhezivní aktivitu komerčně dostupného klikvového extraktu na uropatogenní *E. coli*, byla zaznamenána lineární závislost mezi účinností a koncentrací PAC v inkubačním médiu (od 5 do 75 µg/ml). Autoři shrnují, že PAC působí již ve velmi malé koncentraci a že i přes její špatnou biodostupnost by této účinné koncentrace mohlo být dosaženo, pokud by se do moči vyloučilo alespoň 1 % z dávky 2,7 mg PAC obsažených v jedné kapsli testovaného komerčně dostupného přípravku. Placebem kontrolovaná randomizovaná studie³⁸, jež hodnotila antiadhezivní vlastnosti moči po podání klikvového extraktu (36 nebo 108 mg), zaznamenala výrazný efekt závislý na dávce. Ze 4 hodnocených kmenů uropatogenní *E. coli* byli ovlivněny všechny, včetně kmenu s fimbriemi typu 1 a dvou kmenů rezistentních k antibiotikům.

Další klinická studie³⁹ hodnotila antiadhezivní působení moči po podání klikvového prášku standardizovaného na obsah proanthocyanidinů. Opět byl zaznamenán účinek závislý na dávce, přičemž podání 18 mg PAC mělo výrazně menší efekt ve srovnání s dávkami 36 a 72 mg. Moč byla hodnocena za 1 až 6 hodin po podání, kdy se předpokládá nejvýznamnější eliminace PAC, a následně za 24 hodin ke zhodnocení zbytkové aktivity. Autoři shrnují, že dávka 36 mg PAC denně je postačující k dosažení antiadhezivního účinku na uropatogenní *E. coli*. Pro dlouhodobý efekt, který přetrvává po 24 hodin, však doporučují 72 mg PAC rozdělených do dvou denních dávek.

Na základě těchto a jiných klinických studií francouzský úřad pro bezpečnost potravin (AFSSA) schválil, že užívání 36 mg PAC denně ve formě 6 různých klikvových produktů přispívá k omezení adheze některých uropatogenních kmenů *E. coli* ke sliznici močového traktu²⁶. Evropská komise a Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) však žádné takové zdravotní tvrzení zatím neschválily⁴⁰.

5.2 Hodnocení účinnosti doplňků stravy

Zajímavá je klinická studie⁴¹, která hodnotila účinnost dlouhodobého podávání doplňku stravy z klikvy (500 mg klikvového extraktu dvakrát denně) ve srovnání s podáváním antibiotik (kombinace trimetoprimu a sulfametoxazolu, 480 mg) v profylaxi recidivujících IMC u žen ve fertilním věku. Během 12 měsíců podávání se alespoň jeden případ IMC objevil u 78 % žen ve skupině užívající doplněk stravy a u 71 % ve skupině užívající antibiotikum. Po 1 měsíci

terapie se také hodnotil vznik rezistence uropatogenních *E. coli* k antibiotiku – rezistentních bylo 28 % bakterií izolovaných z moče žen užívajících doplněk stravy a 91 % ze skupiny s antibiotikem. Účinnost podávání doplňku stravy byla menší, ale tato terapie nepřispívala ke vzniku rezistentních kmenů bakterií.

Autoři jiné studie⁴², která hodnotila preventivní účinnost klikvového džusu a tablet s obsahem klikvy, předpokládají, že tento alternativní přístup k prevenci IMC je ekonomicky výhodnější než konvenční léčba antibiotiky, zvláště pak v případě, že pacienti trpí infekcemi častěji než dvakrát ročně.

5.3 Bezpečnost užívání doplňků stravy

Klikva a klikvové produkty jsou bezpečné, pokud se užívají doporučeným způsobem a v přiměřeném množství. Jako bezpečný pro děti se uvádí pouze klikvový džus. Terapeutické používání v těhotenství a během laktace se pro nedostatek informací nedoporučuje⁴³. To je třeba zvážit s ohledem na riziko užívání antibiotik v těhotenství. IMC jsou v těhotenství nebezpečné – antibiotika se nasazují i při asymptomatické infekci. Pokud by klikvové produkty snižovali četnost IMC u těhotných žen k těmto infekcím náchylných, mohlo by to znamenat omezení užívání chemoterapeutik.

5.4 Nežádoucí účinky spojené s užíváním

Klikvové produkty jsou dobře tolerovány. Při nadměrné konzumaci džusu (nad 3 litry) se mohou objevit nevolnost, zvracení nebo průjem. Uvádí se také, že dlouhodobý příjem více než 1 litru džusu denně může zvyšovat riziko tvorby urátových kamenů, a to kvůli snižování pH moči⁴³. Ve dvou studiích^{44,45}, které sledovaly vliv klikvového džusu na složení moči, byly zjištěny jen nepatrné změny pH, avšak zvýšené koncentrace vápníku (až o 20 %) a výrazné zvýšení koncentrace oxalátu (až o 50 %). Autoři shrnují, že klikvový džus a pravděpodobně i doplňky stravy obsahující klikvu mohou zvyšovat riziko tvorby oxalátových kamenů a proto by neměly být doporučovány pacientům s prodělanou nefrolithiázou nebo sníženou funkcí ledvin.

5.5 Lékové interakce *V. macrocarpon*

Na základě *in vitro* studií a studií na zvířatech se předpokládá, že by obsahové látky mohly ovlivňovat isoenzymy cytochromu P450 a kinetiku některých léčiv, například flurbiprofenu (CYP2C9) nebo nifedipinu (CYP3A4)⁴⁶. Za inhibitory CYP3A4 z lidských intestinálních

mikrosomů byly označeny triterpeny izolované z klikvy (kyselina ursolová)⁴⁷. Studie *in vivo* však neprokázaly, že by tyto interakce byly klinicky významné.

Některé kazuistiky spojují užívání klikvového džusu se zvýšením INR (*International normalized ratio*) a zvýšeným rizikem krvácení u warfarinizovaných pacientů. Mechanismus této interakce není znám. Předpokládá se, že by některé obsahové látky klikvy mohly inhibovat metabolismus warfarinu prostřednictvím CYP2C9 a zvyšovat jeho dostupnost v organismu. Možné je také farmakodynamické vysvětlení interakce. Kyselina salicylová obsažená v klikvě může způsobovat hypoprotrombinémii. Britský úřad pro kontrolu léčiv (CSM/MHRA) na základě značného počtu kazuistik (12) a nedostatku dat z klinických studií vydal v roce 2004 doporučení, že pacienti užívající warfarin by se měli vyhnout konzumaci džusu a dalších klikvových produktů, včetně doplňků stravy⁴⁶.

5.6 Zdravotní tvrzení uváděná v souvislosti s doplňky stravy

Doplňky stravy (DS) jsou definovány zákonem o potravinách a tabákových výrobcích⁴⁸. Požadavky na složení DS, jejich označování a způsob použití dále upravuje vyhláška⁴⁹. Podle této vyhlášky se doplňkům stravy nesmí přisuzovat vlastnosti týkající se prevence, léčby nebo vyléčení lidských onemocnění nebo na tyto vlastnosti odkazovat. V otázce zdravotních tvrzení však vyhláška dále odkazuje na přímo použitelné nařízení⁵⁰ Evropského parlamentu a Rady. Na základě tohoto nařízení se mají postupně posoudit, schválit a sjednotit všechna tvrzení, která uvádí, naznačují nebo ze kterých vyplývá, že existuje souvislost mezi kategorií potravin, potravinou nebo některou z jejích složek a zdravím⁵⁰. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) ke dnešnímu dni posoudil zhruba polovinu předložených zdravotních tvrzení. Seznam schválených a zamítnutých tvrzení zveřejňuje Evropská komise v registru⁴⁰.

Z celkového počtu 2037 posouzených zdravotních tvrzení bylo schváleno 241 tvrzení, která se týkají zejména vitamínů, minerálních a některých dalších látek. Ostatní tvrzení byla zamítnuta. Jsou mezi nimi i tvrzení spojující užívání *V. macrocarpon* a odvozených produktů (džusů, extraktů atd.) s takovými účinky na zdraví, jako je antioxidační působení, příznivé působení na zdraví srdce a cév, podpora imunitního systému nebo ochrana dásní a žaludeční sliznice. Taktéž nebyla schválena obecná tvrzení týkající se příznivého působení na zdraví močového ústrojí, ani tvrzení přímo poukazující na preventivní účinek *V. macrocarpon* proti infekcím močových cest.

Příkladem může být žádost společnosti Ocean Spray International Services (UK) Ltd. o vydání stanoviska ke zdravotnímu tvrzení týkajícímu se účinků Ocean Spray Cranberry Products® na infekci močových cest u žen. Navrhované tvrzení zformuloval žadatel takto: „Pravidelná spotřeba dvou porcí výrobku obsahujícího obvyklé množství 80 mg proanthocyanidinů z klikvy pomáhá snižovat riziko infekce močových cest u žen tím, že potlačuje schopnost určitých bakterií ulpívat v močovém traktu“. Na základě předložených údajů dospěl úřad k závěru, že nebyl zjištěn příčinný vztah mezi spotřebou Ocean Spray Cranberry Products® a uváděným účinkem. Vzhledem k tomu, že zdravotní tvrzení neodpovídá požadavkům stanoveným v nařízení⁵⁰, nemělo by být schváleno⁵¹.

Nařízení se opírá o stanovisko EFSA, které je zveřejněno v registru. Ve stanovisku jsou uvedeny podklady připojené žadatelem, včetně charakteristiky výrobků a obsahových látek a vědecky podložených odůvodnění předkládaného tvrzení. EFSA se sice domnívá, že uvedený účinek (snižování rizika IMC) je prospěšný pro lidské zdraví, dospěla ale k závěru, že nemůže být prokázána příčinná souvislost mezi užíváním daných klikvových produktů a tímto účinkem. Podle EFSA ani jedna z předložených studií (8 *in vitro/ex vivo* studií, 12 studií na lidech a dvou metaanalýz) nedokazuje opodstatněnost daného zdravotního tvrzení. Mezi uvedenými důvody jsou například nemožnost prokázání *in vivo* účinků na základě poznatků získaných *in vitro*. Dále nedostatečná výpovědní hodnota výsledků lidských studií, a to pro malý počet subjektů, vysoké procento vysazení terapie, krátké trvání studie, či špatnou specifikaci použitého klikvového produktu a pro další nedostatky v návrhu a provedení studií.

Ať už jsou dostupné vědecké poznatky o účinku *V. macrocarpon* skutečně nedostačující, nebo jsou kritéria hodnocení těchto poznatků příliš přísná, je zřejmé, že v dohledné době již nebude možné používat formulace, jako jsou „má příznivý vliv na zdraví močového ústrojí“, „působí proti rozmnožování bakterií“, „působí v močových cestách jako silný antioxidant“ nebo „zvyšuje odolnost vůči bakteriální infekci“. Tato tvrzení jsou dnes široce používaná výrobci hodnocených doplňků stravy k popisu a propagaci. Zůstává otázkou, jak s nadcházejícím omezením výrobci naloží a jak to ovlivní spotřebitele, pro něž jsou doplňky stravy určeny.

6. Faktory, které ho ovlivňují složení klikvových produktů

Plody klikvy jsou výjimečné svou dlouhou trvanlivostí - při pokojové teplotě vydrží čerstvé i několik týdnů. Pro svou kyselou chuť jsou ale v čerstvém stavu pro většinu konzumentů nepříjemné. Velká část ovoce se zpracovává do džusů, džemů, sušených prášků a extraktů.

Podmínky při skladování a zpracování mají značný vliv na obsahové látky. Výzkum se soustředil zejména na změny obsahu anthocyanů, protože jsou zodpovědné za atraktivní zbarvení klikvových produktů. Bylo zjištěno, že skladování při teplotě 15 °C je optimální pro posklizňovou biosyntézu v ovoci - obsah anthocyanů se může až zdvojnásobit. Široce používaným postupem zpracovávání je technika zmrazování a rozmrazování, při které krystaly ledu poškodí buněčnou stěnu a uvolní anthocyany z buněčných kompartmentů. Extrakce je pak mnohem účinnější - získá se až 50 % obsažených anthocyanů, zatímco z neupraveného ovoce jen 7 %. Je pravděpodobné, že tento postup vede k větší dostupnosti i dalších flavonoidních sloučenin.

Vliv na obsah cenných látek ve zpracovaných produktech mají zvýšená teplota, zvýšené pH, působení světla a rozpuštěného kyslíku, reakce katalyzované rostlinnými enzymy. Anthocyany zahříváním v kyselém prostředí (při $\text{pH} < 4$ a teplotě 100 °C) podléhají hydrolýze, uvolňují reaktivní aglykon, který rychle degraduje na bezbarvé produkty. Při zvýšeném pH (3 až 4) přechází anthocyany do rovnovážné formy mezi barevným flavylium-kationem a bezbarvým chromenolem, kdy jsou náchylnější k oxidaci a další degradaci. pH klikvového džusu se pohybuje kolem 2,7, zatímco optimální pH pro anthocyany je o něco nižší - 2,2. Obsah kyseliny askorbové je negativně ovlivněn teplotou, oxidačními reakcemi i přítomností kovových iontů. Výrobci jsou nuceni ztráty této látky v hotovém produktu doplňovat. Avšak kyselina askorbová může paradoxně působit prooxidačně na další obsahové látky. V přítomnosti kyslíku produkuje superoxidové aniony, peroxid a hydroxidové radikály, které reagují s dalšími látkami, zejména anthocyany, a působí jejich rozklad¹⁶.

Kyslík také katalyzuje působení oxidačních enzymů přítomných v rostlinném pletivu. Působením polyfenolové oxidasy na jednoduché fenoly vznikají *o*-difenoly a následně chinony, které mohou reagovat s dalšími fenolickými a flavonoidními látkami za vzniku hnědě zbarvených polymerních produktů, což se ve výrobku projevuje jako stárnutí, ztráta původní barvy a tvorba sedimentů. Tyto polymerní produkty tvoří frakci o vysoké molekulové hmotnosti a někdy se označují jako NDM (*cranberry nondialyzable material*). Je to složitá směs třísloučinné povahy, rozpustná ve vodě, složená z kondenzovaných fenolů a flavonoidů. Někteří autoři uvádí, že je

z 65 % tvořena proanthocyanidiny. Není zcela jasné, zda se v klikvě vyskytuje přirozeně, nebo vzniká až během zpracování. Jsou ale doklady o tom, že NDM je bioaktivní a podílí se na příznivých účincích klikvových plodů na zdraví člověka, včetně prevence IMC¹⁶. Rostlinné enzymy (oxidasy a glykosidasy) se při výrobě deaktivují působením tepla během blanšírování ovocné hmoty (40 až 80 °C), jinak by mohly značně snižovat obsah cenných látek⁵².

Proanthocyanidiny jsou mnohem stabilnější než anthocyany vůči působení tepla, ale velmi rychle podléhají polymerizaci způsobenou světlem. Proto by klikvové výrobky měly být skladovány za nepřístupu světla. Podíl monomerních, dimerních a trimerních PAC v odvozených produktech je ve srovnání s ovocem větší, a to na úkor PAC polymerních. To může být způsobeno hydrolýzou polymerních PAC na oligomerní, nebo jejich vazbou na celulosu a pektin v plodech a horší dostupností pro extrakci¹⁶. Standardním krokem při výrobě džusů je přidání pektinasy, která narušuje matrix a uvolňuje obsahové látky z rostlinných buněk. V ovocných výliscích přesto zůstává kolem 26 % oligomerních a 47 % polymerních procyanidinů, takže do džusu přechází přibližně 60 % celkového obsahu PAC⁵².

Flavonoly jsou poměrně stabilní a dobře extrahovatelné. Do džusu jich přechází až 70 %. Na rozdíl od čerstvého ovoce, byl v odvozených produktech zjištěn značný obsah (25 %) volných aglykonů flavonolů, což se vysvětluje působením kombinace nízkého pH a vysoké teploty⁵².

6.1 Složení extraktů z *Vaccinium macrocarpon*

Uvedené informace o změnách složení se týkají především džusů a dá se předpokládat, že mohou platit i pro takové produkty, jako je koncentrovaná sušená šťáva. Složení extraktů se ale může od složení džusu podstatně lišit. Protože se extrakt často vyrábí z celého ovoce a s využitím rozpouštědel, mohly bychom předpokládat lepší dostupnost obsahových látek v konečném výrobku.

Tarascou ve své práci⁵³ uvádí postup výroby klikvového extraktu poskytnutého firmou Ocean Spray Cranberries (Lakeville-Middleboro, MA, USA). Čerstvé zmražené ovoce bylo rozemleto v tekutém dusíku a extrahováno 80% okyseleným acetonem. Aceton byl odpařen, vodný zbytek byl přenesen na Biotage Flash40i C18 kolonu a postupně promýván vodou, 15% methanolem a 1% okyseleným acetonem. Methanol byl odpařen, zbytek doplněn vodou, přenesen na Sephadex LH-20 kolonu a promýván vodou, 25% ethanolem a 70% acetonem. Acetonová frakce byla po odpaření rozpouštědla lyofilizována, suchý zbytek tvořil 0,58 g z původních

100 g ovoce. Extrakty se získávají nejen z celého ovoce, ale i z ovocných výlisků. Harrison ve své práci⁵⁴ hodnotila biologickou aktivitu a složení prášků získaných sušením klikvové šťávy a prášků získaných extrakcí ovocných výlisků, které po výrobě šťávy zůstávají. Ethanolické extrakty ovocných výlisků obsahovaly třikrát více fenolických kyselin, pětkrát více flavonolů, desetkrát více anthocyanů a vykazovaly větší antioxidační aktivitu.

Informace o přesném složení komerčně dostupných extraktů a o postupu jejich výroby jsou různorodé. Zatímco některé jsou registrované a chráněné obchodní známkou, původ jiných je jen obtížně zjistitelný.

7. Přehled metod používaných ke stanovení PAC

7.1 Metody kvantitativní

Ke kvantitativnímu stanovení PAC se využívá metod kolorimetrických, gravimetrických, chromatografických a hmotnostně spektrometrických.

Proanthocyanidin assay nebo také *acid butanol assay* je stanovení využívající autooxidačního štěpení PAC a vzniku barevných anthocyanidinů. Nevýhodou stanovení je velká citlivost k podmínkám reakce - různý stupeň polymerizace analyzovaných látek, obsah vody v reakční směsi, teplota a použité rozpouštědlo, přítomnost antioxidačních látek. Reprodukovatelných výsledků může být dosaženo jen u čistých proanthocyanidinových frakcí, bez příměsí rušivých látek a za použití odpovídající kalibrace⁵⁵.

Další klasickou metodou je *vanilin assay* – reakce s vanilinem v kyselém prostředí probíhá v poloze 6 nebo 8 kruhu A každé flavanolové podjednotky a vede ke vzniku barevných produktů. Metoda je také velmi citlivá k reakčním podmínkám. Rušivě působí anthocyanidiny a kyselina askorbová. Použití katechinu jako standardu vede až k dvojnásobnému nadhodnocení obsahu PAC⁵⁵.

Metoda založenou na podobném principu - *DMAC assay*, je popsána v kapitole 6 experimentální části.

7.2 Metody kvalitativní

K identifikaci jednotlivých PAC se využívá HPLC metod. Chromatografie na normální fázi umožňuje rozdělení směsi v závislosti na stupni polymerizace, většinou do velikosti dekamerů.

Problémem bývá významné rozšiřování a překrývání píků, které vedou k posunu základní linie chromatogramu. K oddělení skupin oligomerů a rozlišení procyanidinů typu A a B lze využít speciální stacionární fázi a detekci fluorescenční nebo hmotnostně spektrometrickou (MS). Nevýhodou metody je nemožnost kvantitativního stanovení celkového množství PAC, a to pro nedostatek standardů a zhášení fluorescence polymerními PAC⁵⁶.

Kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) poskytuje rozdělení jednotlivých oligomerních PAC až do velikosti tetramerů. Pro kvantifikaci lze použít *diode array* detektor. Pro RP-HPLC však platí podobná omezení jako pro HPLC na normální fázi⁵⁷.

Proanthocyanidiny lze také stanovovat pomocí RP-HPLC na C-18 kolonách po thiolýze benzymerkaptanem. Thiolýza uvolňuje jen koncové monomerní jednotky jako flavan-3-oly, další podjednotky PAC jsou následně odděleny ve formě benzyletherů a kvantifikovány²⁴. Metoda byla využívána ke stanovení PAC pro sestavení databáze potravin *USDA National Food and Nutrition Analysis Program*.

IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. Přehled hodnocených doplňků stravy

Ke zhodnocení bylo zakoupeno 7 různých přípravků dostupných v jedné lékárně. Výběr se řídil obsahem *V. macrocarpon* a doporučeným použitím ke zlepšení zdraví močových cest. Všechny přípravky byly registrovány jako doplňky stravy. Tabulka III shrnuje názvy přípravků, jejich formu a obsah aktivních látek.

Tabulka III
Stručný přehled hodnocených doplňků stravy

Název	Forma	Obsah aktivní látky	Denní dávka
1. Cys Control® Arkopharma	rozpuštěný prášek s obsahem koncentrovaného výtažku	0,648 g/sáček 18 mg PAC/sáček	2 sáčky 36 mg PAC
2. Max brusinky Swiss Herbal Remedies Ltd.	tablety s obsahem extraktu Cran Max® (34:1)	250 mg/tableta ekvivalent 8,5 g ovoce	2 tablety 500 mg extraktu
3. Cran Urin™ Barnys®	tekutina s obsahem extraktu CranRichPAC™	400 mg/10 ml	20 ml 800 mg extraktu
4. Urinal Wallmark	tobolky s obsahem koncentrované sušené šťávy	200 mg/tobolka	až 6 tobolek 1200 mg
5. Uroval® biotic Valosun®	tobolky s obsahem extraktu	130 mg/tobolka	až 6 tobolek 780 mg
6. GS Triurin Green-Swan Pharmaceuticals	tablety s obsahem extraktu (25:1)	250 mg/tableta ekvivalent 6,25 g ovoce	až 4 tablety 1000 mg
7. Apo-Brusinky Profarma- Produkt	kapsle s obsahem extraktu CranRich™ (36:1)	500 mg/kapsle ekvivalent 18 g ovoce	2 kapsle 1000

Přípravek číslo 1 - Cys Control® (Arkopharma, Francie) obsahuje 20 sáčků s práškem k rozpuštění ve vodě. Jeden sáček (5 g prášku) obsahuje koncentrovaný výtažek z *V. macrocarpon* s deklarovaným obsahem 18 mg proanthocyanidinů stanoveného pomocí DMAC. Doporučená denní dávka jsou 2 sáčky, tedy 36 mg PAC denně. Dále je uveden obsah 18,1 mg kyseliny ursolové v 1 sáčku. Doporučená doba používání je 20 dní. Pomocnými látkami jsou maltodextrin, hydroxid hořečnatý, kyselina citronová a malinové aroma.

Přípravek číslo 2 - Max Brusinky (Swiss Herbal Remedies Ltd, Kanada) je ve formě tablet s obsahem extraktu Cran Max® (250 mg v 1 tabletě) deklarovaným obsahem minimálně 5 % anthocyanů. Výrobce extraktu (Proprietary Nutritionals, Inc., USA) uvádí, že extrakt je získán z celého ovoce (*V. macrocarpon*) patentovanou technologií BioShield®, která využívá ovocnou vlákninu k ochraně obsahových látek před kyselým prostředím v žaludku a umožňuje jejich pomalé uvolňování ve střevě. Údaj o síle extraktu (34:1) označuje poměr mezi výchozí vahou ovoce a konečnou vahou získaného extraktu (8500 mg : 250 mg). Proto je na výrobku uvedeno, že 1 tableta je ekvivalentní 8500 mg čerstvého ovoce. Uveden je i obsah ovocné vlákniny (130 mg/tableta). Doporučená dávka jsou 2 tablety denně, po dobu minimálně 4 týdnů. Užívání se doporučuje i dětem od tří let (1 tableta denně). Pomocné látky jsou fosforečnan vápenatý, celulóza, oxid křemičitý a stearan hořečnatý.

Přípravek číslo 3 – Cran Urin™ Brusinky Forte (Barnys®, Česká republika) je tekutý přípravek s obsahem extraktu z *V. macrocarpon* v množství 800 mg/20 ml přípravku, jako doporučené denní dávce. Přesnější popis extraktu chybí, jen je uvedeno, že je vyroben technologií BioShield®. Můžeme předpokládat, že se jedná o stejný extrakt, jaký obsahuje přípravek 2. Pomocnými látkami jsou voda, sorban draselný a disiřičitan draselný.

Přípravek číslo 4 – Urinal (Walmart, Česká republika) je přípravek ve formě želatinových tobolek s obsahem koncentrované sušené šťávy NutriCran® z *V. macrocarpon*. Výrobce uvedeného koncentrátu Decas Botanical Synergies (USA) poskytuje informace o jeho složení. Koncentrát je připraven sprejovým sušením a obsahuje 35 % organických kyselin (9 % kyseliny chinové), 2 až 3,8 % celkových fenolických sloučenin, 0,15 až 1 % anthocyanů, 0,95 % PAC, 300 až 435 µg/g kvercetin a 200 až 415 µg/g kyseliny ellagové (DBS 2009). Doporučená denní dávka přípravku je 2 až 6 tobolek denně (až 1200 mg koncentrátu), která by podle dostupných informací měla obsahovat přibližně 12 mg PAC. Přípravek je doporučován pro dlouhodobé užívání. V příbalové informaci je uvedeno, že může být užíván během těhotenství

a kojení. Pomocnými látkami jsou sojový olej, želatina, glycerol, lecithin, včelí vosk a oxid železitý.

Přípravek číslo 5 – Uroval[®] biotic (Valosun[®], Česká republika) je kombinovaný přípravek ve formě tobolek. 1 tobolek obsahuje 130 mg extraktu *V. macrocarpon* standardizovaný na 10 % PAC. Denní dávka je 6 tobolek. Přípravek dále obsahuje D-manosu (200 mg/tobolka), probiotický komplex (1×10^9 CFU/tobolka) a inulin (80 mg) Doporučuje se i dlouhodobé užívání 4 tobolek denně. V příbalové informaci je také uvedeno, že přípravek mohou užívat děti od 3 let a těhotné a kojící ženy. Pomocnými látkami jsou stearan hořečnatý, želatina a oxid titaničitý.

Přípravek číslo 6 – GS Triurin (Green-Swan Pharmaceuticals, Česká republika) je kombinovaný přípravek. 1 tobolek obsahuje 250 mg extraktu *V. macrocarpon* (25:1, odpovídá 6250 mg plodů). Dále obsahuje 25 mg extraktu z kopřivy (4:1, odpovídá 100 mg sušeného kořene), 25 mg extraktu z listu medvědice lékařské (s obsahem 10 % arbutinu) a 25 mg extraktu z *Echinacea purpurea* (4:1, odpovídá 100 mg sušeného kořene). Doporučená denní dávka jsou 2 až 4 tobolky denně při krátkodobém užívání a 1 tobolek denně při užívání dlouhodobém. Pomocnými látkami jsou fosforečnan vápenatý, celulóza, sodná sůl karboxycelulózy, stearan hořečnatý, kyselina stearová, hydroxypropylmethylcelulóza a oxid titaničitý.

Přípravek číslo 7 – Apo-Brusinky (Profarma-Produkt s. r. o., Česká republika) jsou kapsle s obsahem 500 mg extraktu CranRich[™]. Výrobce extraktu InovoBiologic Inc. (Kanada) uvádí, že extrakt je vyroben z celého ovoce, včetně slupek, semínek, šťávy a vlákniny *V. macrocarpon*. 1 g extraktu odpovídá 36 g ovoce (extrakt 36:1). Doporučené dávkování je 1 až 2 kapsle denně. Přípravek mohou užívat i děti od 3 let. Pomocnými látkami jsou želatina, voda a oxid titaničitý.

2. Hodnocení informací doprovázejících doplňky stravy

Informace uvedené na vnějším obalu a/nebo v příbalovém letáku byly zhodnoceny z několika různých hledisek, s ohledem na poznatky získané o *V. macrocarpon* a infekcích močových cest a s ohledem na právní předpisy vztahující se k doplňkům stravy.

2.1 Povinné údaje vztahující se k doplňkům stravy

Byla zhodnocena přítomnost údajů a upozornění na obalu/v příbalovém letáku DS podle požadavků upravených zákonem⁴⁹, jako například označení, že se jedná o doplněk stravy, údaje

o složení, upozornění, že přípravek není náhradou pestré stravy, nebo že má být uložen mimo dosah dětí. Všechny hodnocené přípravky jsou označeny v souladu s těmito požadavky.

2.2 Nepovinné údaje vztahující se k doplňkům stravy

Některé informace uváděné na obalu/v příbalovém letáku DS sice nejsou požadovány zákonem, ale s přihlédnutím k tomu, že DS mají hlavně přispívat k upevnování zdraví a navození fyzické pohody pacienta, jsou tyto informace na místě a žádoucí.

V první řadě je třeba vzít v úvahu zdravotní stav jedince, který DS bude užívat. Hodnocené přípravky jsou vesměs doporučovány „při obtížích s močovým ústrojím“. Můžeme tedy předpokládat, že budou užívány jedincem, který právě trpí infekcí močových cest, nebo se u něj tyto infekce objevují ve zvýšené míře. S ohledem na častý přechod IMC do chronicity a rizika spojená s komplikovanými infekcemi by měly informace uváděné na DS obsahovat vhodné upozornění na tato rizika a doporučení o návštěvě lékaře. Takové upozornění je uvedeno u 5 hodnocených DS (přípravky č. 1, 4, 5, 6, 7). Z hlediska mechanismu vzniku infekce se velmi vhodné zdá být upozornění na důležitost dostatečného příjmu tekutin a dodržování správných hygienických návyků. Zmínka o pitném režimu je uvedena u 3 hodnocených přípravků (č. 1, 5, 6). Na význam správných hygienických návyků upozorňuje příbalová informace jednoho přípravku (č. 6).

Důležité se zdá být i upozornění pacientům, kteří mají zvýšené riziko tvorby ledvinových kamenů o tom, že by dané DS měli užívat s opatrností. Takové upozornění nedoprovází žádný z hodnocených přípravků.

2.3 Doporučené dávkování a délka užívání

Jak bylo uvedeno, výsledky klinických studií naznačují a autoři metaanalýz vyzdvihují preventivní účinnost, tedy snížení frekvence IMC jako důsledek dlouhodobého užívání *V. macrocarpon*. Proto je bezpochyby důležité předložit spotřebiteli informaci o předpokládaném preventivním působení a doporučit dlouhodobé užívání, zvláště pokud se jedná o chronické infekce. Takové doporučení je uvedeno u 2 hodnocených přípravků (č. 4 a 5).

2.4 Uvádění botanického původu extraktů

Zatímco latinské označení rostliny, jež je zdrojem použitých extraktů, je u všech přípravků uváděno jako *Vaccinium macrocarpon*, nebo synonymní *Oxycoccus macrocarpus*, české označení zdroje může přivádět do rozpaků. Nejen že názvy jako „brusinka kanadská“, „brusinka velkoplodá“ nebo „brusnice velkoplodá“ v české botanické nomenklatuře neexistují, odkazují také na zcela jiný druh – brusinku obecnou, *Vaccinium vitis-idaea* L. Brusinkový list se pro obsah antimikrobně působícího arbutinu může použít při zánětech močových cest, obdobně jako medvědice lékařská, která je lékopisnou součástí urologických čajových směsí (*Uvae ursi folium*)¹. Protože jsou dané extrakty dodávány zahraničními výrobci, je velmi pravděpodobné, že původní latinské označení zdroje je zachováno a že tímto zdrojem je skutečně *V. macrocarpon* - klikva velkoplodá, jak je popsána v odstavci 1 (botanická charakteristika druhu). Zůstává otázkou, zda nesprávné uvádění rostlinného zdroje je záměrné, a to pro větší popularitu brusinky mezi spotřebiteli, nebo pramení z neznalosti a nedostatečného zájmu výrobců a dovozců doplňků stravy o to, co ve skutečnosti nabízí a prodávají.

3. Analýza extraktu *Vaccinium macrocarpon* pomocí chromatografie na tenké vrstvě

3.1 Použité materiály

3.1.1 Rozpouštědla, chemikálie a pomůcky

Aceton p.a.

Ethanol absolutní p.a. (EtOH)

Chloroform p.a.

Isopropanol p.a.

Kyselina chlorovodíková p.p. 37%

Kyselina mravenčí p.a. 98%

Kyselina octová ledová p.a. 99,8%

Kyselina fosforečná 96%

Methanol p.a. 99,8% (MeOH)

Toluen p.a.

Voda z Millipore systému (Millipore, Molsheim, Francie)

3.1.2 Referenční látky

p-Arbutin Rotichrom® HPLC (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Německo), delfinidin.

3.1.3 Detekční činidla

Vanilinové činidlo (detekce procyanidinů, podle Wagnera 2001) - 1 g vanilinu rozpuštěný ve 100 ml 50% kyseliny fosforečné.

Detekce arbutinu: čerstvě připravený roztok 10 g chloridu železitého a 0,5 g hexakynoželezitanu draselného ve 100 ml vody ($\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$).

3.1.4 Rostlinný materiál

Extrakt z *V. macrocarpon*, poskytnutý společností Valosun®. Extrakt představuje hnědočervený jemný prášek s charakteristickou vůní a trpkou chutí. Podle přiložené specifikace, obsahuje minimálně 10 % PAC, extrakčním rozpouštědlem byla směs ethanolu a vody v neznámém poměru. Extrakční poměr je uveden jako 25 až 30:1, což v analogii s již uvedenými extrakty zřejmě představuje poměr čerstvé váhy ovoce a váhy získaného extraktu.

Extrakt z *Vaccinium myrtillus* (z plodů borůvky) dostupný na pracovišti, standardizovaný na obsah anthocyanů (25 %).

3.2 Příprava vzorků

Extrakty byly rozpouštěny v různých rozpouštědlech. Ve směsi EtOH a vody (1:1 v/v) - rozpouštědlo 1, nebo MeOH a vody (1:1 v/v) - rozpouštědlo 2, nebo ve směsi vody a 7% HCl (9:1 v/v) – rozpouštědlo 3. Složení jednotlivých vzorků je uvedeno u příslušného chromatogramu. Referenční látky byly rozpuštěny ve směsi EtOH a vody (1:1 v/v). Jednotlivé koncentrace: A – arbutin 0,5 mg/1 ml, D – delfinidin 0,5 mg/1 ml.

3.3 Popis metody

Stacionární fáze: hliníkové folie Silikagel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Německo) s tloušťkou vrstvy 0,2 mm, o velikosti 7 až 10 x 16 cm (podle počtu vzorků).

Vzorky byly nanášeny pomocí skleněné kapiláry jako 1cm čáry. Vyvíjení se provádělo vzestupně, v komoře nasycené párami mobilní fáze, při laboratorní teplotě. Chromatogramy

byly hodnoceny ve viditelné oblasti světla, před a po nanesení detekčního činidla, nebo pod UV lampou při 254 nm. Byly vyzkoušeny různé mobilní fáze, koncentrace nanášených vzorků a způsoby detekce. Metody, které poskytly výsledky, jsou uvedeny níže.

3.3.1 TLC-1

Mobilní fáze: ethylacetát/voda/kys. mravenčí (10:3:2 v/v/v, po protřepání použita horní fáze) (rozdělení anthocyanů podle práce⁵⁵ Krenna). Vzorky: V₁ - 100 mg extraktu Valosun na 1 ml rozpouštědla 1, V₂ - 200 mg extraktu na 1 ml rozpouštědla 1, detekce pod UV lampou při 254 nm.

3.3.3 TLC-2

Mobilní fáze: toluen/aceton/kys. mravenčí (3:3:1 v/v/v). Vzorky V₁ - 200 mg extraktu Valosun na 1 ml rozpouštědla 2, V₂ - 200 mg extraktu Valosun na 1 ml rozpouštědla 3, M - 1 mg extraktu *V. myrtillus* v 1 ml rozpouštědla 2, detekce vanilinovým činidlem.

3.3.4 TLC-3

Mobilní fáze: ethylacetát/kys. mravenčí/kys. octová/voda (75:3:2:20 v/v/v/v, použita horní fáze), (rozdělení oligomerních procyanidinů podle práce⁵⁸ Svedström). Vzorky: V₁ - 100 mg extraktu Valosun na 1 ml rozpouštědla 1, V₂ - 200 mg extraktu na 1 ml rozpouštědla 1, A - arbutin 5 mg/1 ml, D – delfinidin 5 mg/1 ml. Detekce ve viditelné oblasti, detekce při 254 nm, detekce vanilinovým činidlem.

3.3.5 TLC-4

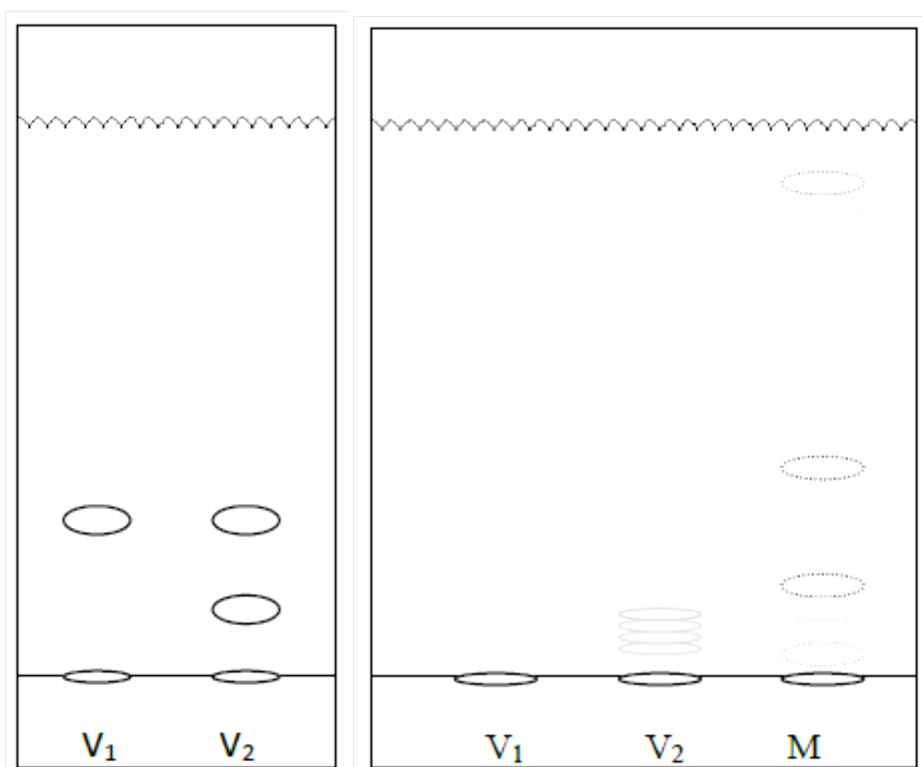
Mobilní fáze: chloroform/methanol (7:3 v/v). Vzorky: V - 200 mg extraktu na 1 ml rozpouštědla 1, A - arbutin 5 mg/1 ml, detekce pomocí činidla pro arbutin - postřík desky 8 ml roztoku, hodnocení ve viditelné oblasti.

3.4 Výsledky

Chromatogram 1 - obr. 2. Jednotlivé zóny patrné jako temná místa na žlutozeleném podkladu chromatografické desky. Po detekci vanilinovým činidlem - postřík činidlem a zahřívání 10 min. při 100 °C – jednotlivé zóny patrné jako červenohnědé skvrny. Na chromatogramu

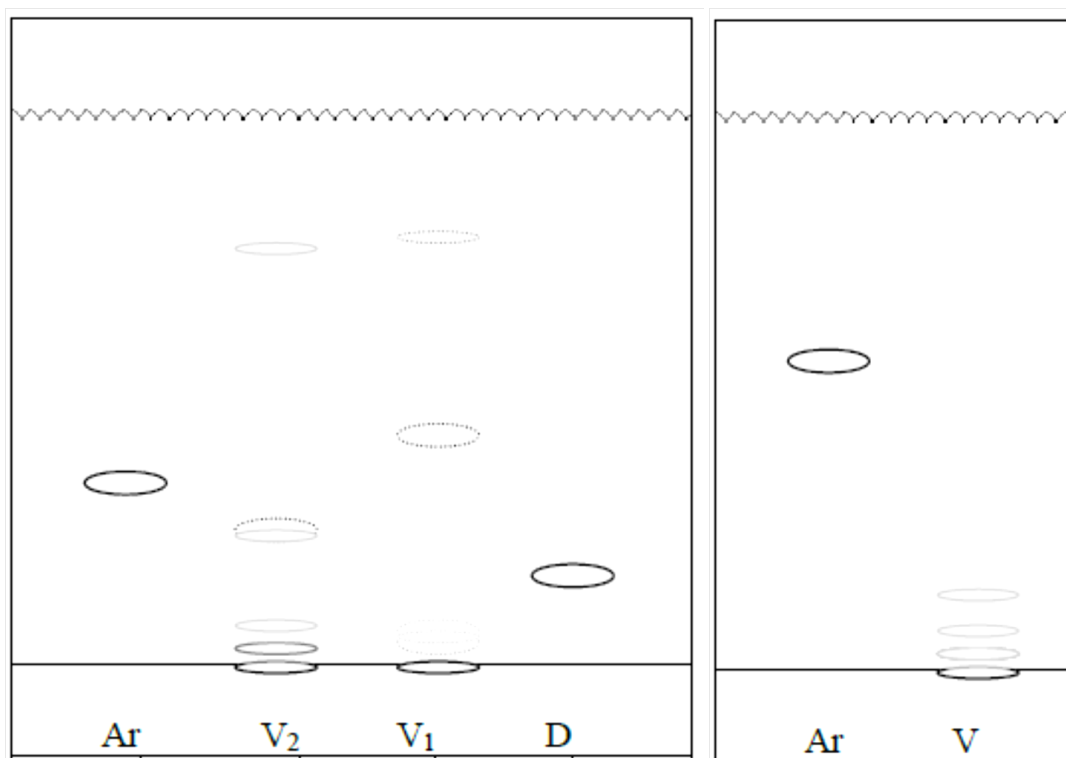
1 je patrné, že vyšší koncentrace vzorku poskytuje jednu zónu navíc oproti koncentraci nižší. Detekce ve viditelné oblasti je obtížná, objevuje se jen červená zóna s $R_f < 0,1$ a větší část nanášky zůstává na startu. Při detekci při 254 nm se ukazují dvě zóny jako tmavé skvrny. Nelze však určit, o které frakce extraktu se jedná, protože zhášení fluorescenčního podkladu vykazují všechny flavonoidy. Při detekci vanilinovým činidlem vanilin reaguje v kyselém prostředí s *m*-difenolem kruhu A flavan-3-olu za vzniku červeného chromoforu. Vznik červenohnědých zón ukazuje na přítomnost skupin procyanidinů. Podle R_f kolem 0,3 a 0,5 se dá odhadnout, že se jedná o tetra- až hexamery (odhad na základě chromatogramu procyanidinů z *Crataegi folium*⁵⁹).

Chromatogram 2 - obr. 3. Jednotlivé zóny patrné jako červenohnědé skvrny. K vyvíjení chromatogramu 3 byla použita méně polární mobilní fáze. I když anthocyanové frakce extraktu *V. myrtillus* byly odděleny poměrně dobře, tato mobilní fáze neposloužila k rozdělení extraktu *V. macrocarpon*.



Obr. 2 Chromatogram 1

Obr. 3 Chromatogram 2



Obr. 4 Chromatogram 3

Obr. 5 Chromatogram 4

Chromatogram 3 - obr. 4. Detekce ve viditelné oblasti – delfinidin patrný jako fialová skvrna. Na chromatogramu 4 je patrná již dříve popsaná zóna s $R_f < 0,1$, dále zóny s $R_f 0,2$ a $0,75$ u více koncentrovaného vzorku a zóny s $R_f 0,5$ a $0,8$ u vzorku méně koncentrovaného. Je možné, že větší koncentrace vzorku způsobuje větší matrix efekt a látky jsou více zadržovány na stacionární fázi. Dá se proto jen přibližně odhadovat, kterým oligomerům tyto zóny přísluší. V práci⁵⁸ Svedström, odkud bylo převzato složení mobilní fáze, $R_f 0,7$ příslušel dimerům.

Detekce při 254 nm – delfinidin, arbutin a $V_{1,2}$ patrné jako temné skvrny na žlutozeleném podkladu. Detekce vanilinovým činidlem - $V_{1,2}$ jako červenohnědé skvrny.

Chromatogram 4 - obr. 5. Arbutin se objevuje jako modrá skvrna. Vzorek V arbutin neobsahuje. Z chromatogramu 5 vyplývá, že náš extrakt neobsahuje detekovatelné množství arbutinu. Můžeme tedy říct, že se nejedná o extrakt z plodů brusinky. Klikva arbutin neobsahuje.

4. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC metoda byla převzata z práce⁵⁸ Svedström, kde se kvantitativně hodnotily oligomerní procyanidiny z rodu *Crataegus*.

4.1 Použité materiály

4.1.1 Rozpouštědla, chemikálie a pomůcky

Voda z Millipore systému

Acetonitril HPLC Far UV/gradient grade

Kyselina octová ledová p.a. 99,8 %

Methanol HPLC gradient grade J.T.Baker®

Analytické váhy Kern ALJ 220-4NM (Kern & sohn GmbH., Balingen, Německo)

Centrifuga

Mikropipety Acura® 825 (Socorex Isba S.A., Švýcarsko)

Stříkačkové filtry

Ultrazvuková lázeň

4.1.2 Referenční látky

Kyselina kávová, kyselina chlorogenová, hyperosid Rotichrom® HPLC (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Německo).

4.1.3 Rostlinný materiál

Extrakt z *V. macrocarpon*, poskytnutý společností Valosun®. Hodnocené doplňky stravy (tabulka III).

4.2 Příprava vzorků

Pro rozpouštění vzorků byla použita směs methanolu a vody (50:50 v/v). Jednotlivé formy přípravků byly pro optimální rozpuštění upraveny následným způsobem: tablety byly rozdrceny ve třecí misce k získání jemného prášku, obsah tobolek byl vysypán a taktéž rozdrcen, želatinové tobolky byly rozříznuty a jejich obsah byl vymýt rozpouštědlem.

Navážky jednotlivých přípravků a extraktu (všechny 500 mg) byly rozpuštěny v 5 ml rozpouštědla (směs methanolu a vody 50:50 v/v), směsi byly podrobeny ultrazvuku (20 min. při 30 °C) a odstředěny (10 min. při 3500 rpm). Vzorky byly odebrány ze supernatantní tekutiny. Vzorky se vždy připravovaly bezprostředně před analýzou.

4.3 Popis HPLC metody

Použitá HPLC sestava: kapalinový chromatograf Philips PU 4100 s UV/VIS detektorem Philips PU 4021 (Pye Unicam Ltd., Cambridge, Británie); kolona Purospher® RP-18 encapped (náplň silikagel), 250 x 4 mm (velikost částic 5 µm) (Merck KGaA, Darmstadt, Německo); software Eurochrom® Preparative Version 2,5 for Windows NT (Knauer, Berlin, Německo).

HPLC metoda: kvantitativní hodnocení oligomerních procyanidinů na reverzní fázi s gradientovou elucí. Složky mobilní fáze: složka A. 2,5% kyselina octová, složka B. methanol/2,5% kyselina octová (80:20 v/v). Složení mobilní fáze v závislosti na čase je uvedeno v následující tabulce.

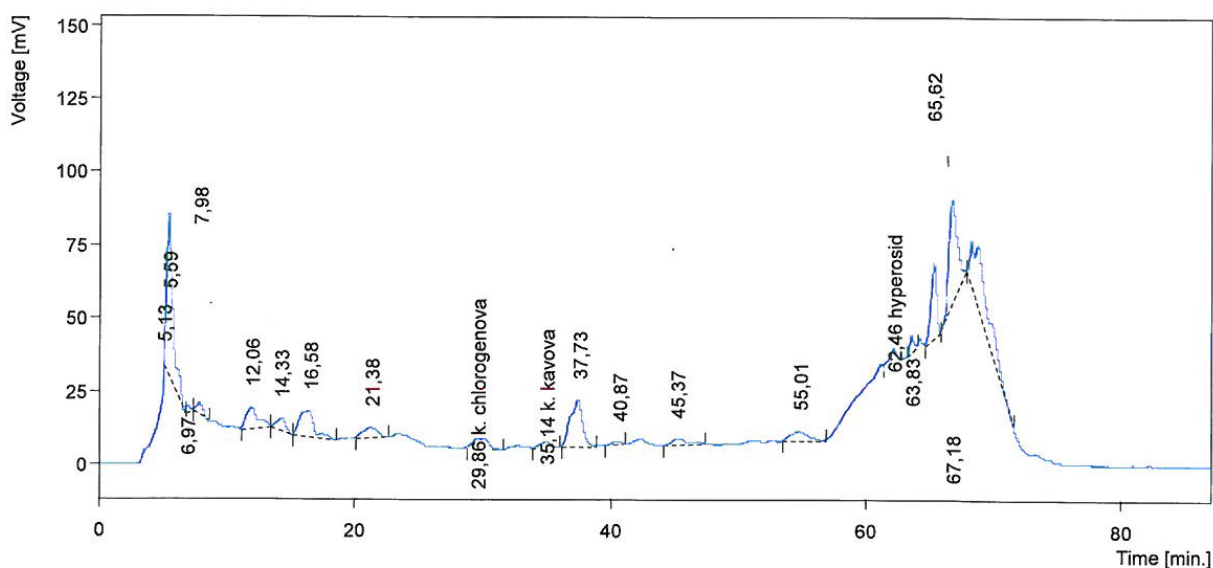
Tabulka IV
Profil gradientu při HPLC analýze

čas	složka A	složka B
0 min.	93 %	7 %
50 min.	80 %	20 %
60 min.	60 %	40 %
65 min.	0 %	100 %

Kolona byla po každé analýze propláchnuta a naplněna acetonitrilem. Mobilní fáze byly odplyněny. Rychlost toku mobilní fáze - 1 ml/min. Nástřikový objem vzorku činil 10 µl. Detekce byla prováděna při 279 nm. Analýza probíhala za laboratorní teploty.

4.4 Výsledky

Obrázek 6 představuje spektrum naměřené pro extrakt Valosun.



Obr. 6 HPLC spektrum extraktu Valosun

5. Stanovení antioxidační aktivity

Ke zhodnocení antioxidační aktivity vzorků byla využita metoda⁶¹ dostupná na pracovišti. Je to kolorimetrická metoda založená na zhášení DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylového) radikálu - *relative DPPH scavenging capacity (RDSC) assay*. Tmavě fialově zbarvený DPPH radikál reakcí s antioxidačními (redukujícími) látkami poskytuje bezbarvý či lehce nažloutlý produkt difenylpikrylhydrazin. Antioxidační aktivita se stanovuje na základě poklesu absorbance měřeného roztoku.

5.1 Použité materiály

5.1.1 Rozpouštědla, chemikálie a pomůcky

Voda z Millipore systému (Millipore, Molsheim, Francie)

Ethanol absolutní p.a. 99,8% (EtOH)

2,2-Difenyl-1-pikrylhydrazyl (Sigma, St Louis, MO, USA. EC 217-591-8)

Hyperosid Rotichrom® HPLC (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Německo)

Kvercetin HPLC (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Německo)

5.1.2 Rostlinný materiál

Extrakt z *V. macrocarpon* (Valosun®). Hodnocené doplňky stravy (tabulka III) byly pro optimální rozpouštění upraveny způsobem popsáním v kapitole 4.2.

5.2 Postup stanovení

Navážky jednotlivých přípravků (všechny 500 mg) byly rozpuštěny v 5 ml rozpouštědla (směs ethanolu a vody 50:50 v/v). Byly podrobeny ultrazvuku (20 min. při 30 °C) a odstředěny (10 min. při 3500 rpm). Vzorky byly odebrány ze supernatantní tekutiny. Roztok extraktu Valosun byl připraven v koncentraci 1 mg/ml, roztok standardu kvercetinu - 0,5 mg/ml a hyperosidu - 1 mg/ml. Do jamek mikrotitrační destičky byly vpraveny vzorky, roztoky extraktu Valosun a roztoky standardů v postupném ředění 1 : 1 až 1 : 9 v množství 100 µl. Do každé jamky bylo následně přidáno 100 µl 0,2mM roztoku DPPH• v 50% ethanolu (w/w). Slepé vzorky byly tvořeny 200 µl 50% ethanolu, kontrolní vzorky byly tvořeny směsí 100 µl 50% ethanolu a 100 µl 0,2mM roztoku DPPH• v 50% ethanolu. Absorbance byla měřena při vlnové délce 525 nm a teplotě 37 °C po 40 minutách od přidání činidla.

5.3 Výpočet

I když se výsledky použité metody vyjadřují s použitím hodnot AUC (plocha pod křivkou) vypočítané z vnesení závislosti mezi časem reakce a množstvím redukovaných radikálů v procentech:

$$\% \text{ redukovaných DPPH}\bullet = [1 - (A_{\text{vzorku}} - A_{\text{slepého vz.}}) / (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{slepého vz.}})] \times 100$$

kde A jsou hodnoty absorbance,

pro naše účely byly výsledky vyjádřeny jako EC_{50} – efektivní koncentrace látky ve vzorku potřebné ke zhašení 50 % radikálů vypočítané ze závislosti množství redukovaných DPPH• na koncentracích vzorku.

Následně bylo pro každý vzorek vypočítáno, kolik procent DDD (denní doporučené dávky) přípravku tvoří 500 mg vzorku.

5.4 Výsledky

Výsledky měření antioxidační aktivity jsou shrnuty v tabulce V.

Tabulka V

Výsledky měření antioxidační aktivity

Standardy:	EC_{50} (μmol)	část DDD (%)
kvercetin	$94,08 \pm 0,51$	-
hyperosid	$89,2 \pm 0,1$	-
Vzorky:		
extrakt Valosun	$90,94 \pm 0,79$	-
vzorek 1	$94,78 \pm 0,11$	5,0
vzorek 2	$67,27 \pm 1,39$	40,3
vzorek 3	$27,08 \pm 0,75$	2,5
vzorek 4	$82,84 \pm 1,92$	19,3
vzorek 5	$88,91 \pm 0$	6,5
vzorek 6	$93,82 \pm 0,21$	46,0
vzorek 7	$93,92 \pm 0,11$	53,4

Největší antioxidační aktivitu vztaženou na DDD vykazoval přípravek č. 3 – $EC_{50} = 27,08 \mu\text{mol}$, 500 mg tvoří jen 2,5 % DDD. Nejmenší antioxidační aktivitu vykazoval přípravek č. 7 - $EC_{50} = 93,92 \mu\text{mol}$, 500 mg tvoří až 53,4 % DDD.

6. Kvantitativní stanovení PAC s využitím reakce s DMAC

DMAC (4-dimethylaminocinnamaldehyd) jako reakční činidlo pro stanovení flavanolů poprvé použili již v roce 1978 McMurrugh a McDowell⁶². Od té doby byl princip několikrát aplikován na různá měření – stanovení flavanolů v pivu, víně, plasmě, čokoládě⁵⁶, a s využitím různých technik – detekce po HPLC separaci hrubých extraktů⁶³, derivatizační metoda pro denzitometrické stanovení⁶⁴, kolorimetrické stanovení po kyselé hydrolyze⁶⁵. Byla též vyvinuta metoda⁶⁶ k analýze proanthocyanidinů v klikvových produktech.

6.1 Mechanismus a specifita reakce

DMAC poskytuje s flavanoly kondensační reakci za vzniku barevných produktů. Přesný mechanismus reakce není zatím přesně popsán, ale je známo, že reakce je podmíněna několika strukturálními rysy stanovovaného flavanolu: (1) meta-substituce dihydroxybenzenového kruhu, jako je tomu u katechinu a epikatechinu s 5,7-dihydroxysubstituovaným kruhem A, (2) jednoduchá vazba mezi uhlíky C-2 a C-3 a (3) absence karbonylu na C-4⁵⁶.

Z vyhodnocení specifity reakce provedené několika autory vyplývá, že reakce je specifická pro flavanoly, jejich galláty a některé indoly Naopak stilbeny, fenolické kyseliny, flavony, flavanony ani flavonoly s DMAC nereagují. Anthocyanidiny (cyanidin, delphinidin) poskytují jen slabou odpověď⁵⁶. Detekce reakčního produktu se navíc provádí při vlnové délce 640 nm, což minimalizuje interference s jinými látkami flavonoidní povahy přítomnými ve vzorku.

6.2 Výběr standardu

Z porovnání reakční selektivity ve skupině flavanolů vyplývá, že stejné koncentrace monomerních katechinu a epikatechinu poskytují přibližně stejnou odpověď, zatímco oligomerní procyanidiny (dimer B-2, trimery a tetramery) poskytují odpověď nižší⁵⁶. Například dimer B - 3 poskytuje za stejných reakčních podmínek o 50 % menší barevný výtěžek než katechin⁶². Použití katechinu nebo epikatechinu jako standardu pro stanovení tedy vede k podhodnocení celkového množství PAC ve vzorku. Výhodněji se dají použít na trhu dostupné procyanidiny B-1, B-2, A-2⁵⁶.

Omezením metody je snížená citlivost vůči polymerním PAC. Předpokládá, že DMAC reaguje jen s jednou monomerní jednotkou v molekule proanthocyanidinu, nebylo to však zatím spolehlivě zdokumentováno. Je ale zřejmé, že výtěžek reakce s velkými molekulami závisí na jejich strukturální konfiguraci a citlivost stanovení polymerních PAC není tak vysoká jako při stanovení PAC oligomerních⁶⁶.

6.3 Reakční podmínky

Průběh reakce s DMAC závisí hlavně na dvou parametrech: (1) použitý poměr rozpouštědla a kyseliny ke zředění vzorku, (2) teplota. Voda zpomaluje reakci, proto se jako rozpouštědlo používá methanol nebo ethanol. K okyselení se používá kyselina chlorovodíková, a to v koncentraci kolem 10 %, nižší koncentrace zpomalují reakci.

6.4 Přesnost stanovení

Na základě několika prací, kde se provádělo stanovení PAC současně několika způsoby, se dá zhodnotit korelace DMAC stanovení a některých dalších metod. Gravimetrické stanovení po izolaci proanthocyanidinové frakce na Sephadex LH-20 koloně ukázalo ve srovnání s DMAC stanovením vyšší množství celkových PAC ve vzorcích s větším množstvím polymerních PAC⁶⁶. Stanovení založené na kyselé katalyzovaném štěpení interflavanových vazeb v butanolu (*acid butanol assay*) za použití cyanidinu jako standardu vykazovalo větší výnosnost ve srovnání s DMAC metodou. Anthocyany přirozeně se vyskytující ve vzorcích interferují se stanovením a nadhodnocují výsledky. Autoři zdůrazňují, že DMAC metoda je sice přesnější pro stanovení monomerních a oligomerních, ale podhodnocuje obsah polymerních PAC. Dále zdůrazňují, že výsledek reakce je silně ovlivněn poměrem mono/oligo/polymerů ve vzorku, proto DMAC metoda neposlouží k porovnávání obsahu PAC ve vzorcích z různých rostlinných zdrojů, které se výrazně liší tímto poměrem⁶⁷. V případě měření obsahu PAC v čokoládových produktech pomocí kapalinové chromatografie byly výsledky srovnatelné s DMAC metodou. Autoři však zdůrazňují, že standardizace LC metody je obtížná pro nedostupnost standardů jednotlivých PAC⁵⁶.

6.5 Vlastní stanovení

Byla využita standardní metoda pro stanovení proanthocyanidinů v klikvových produktech popsána v práci Ronalda L. Priora a kol. *Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders*. Metoda byla modifikována laboratořemi Brunswick Labs (Norton, MA, USA) a validována v 6 laboratořích.

6.5.1 Rozpouštědla, chemikálie a pomůcky

Voda z Millipore systému (Millipore, Molsheim, Francie)

Methanol HPLC gradient grade J.T.Baker® (Avantor™, Center Valley, U.S.A)

Ethanol (91%) HPLC grade

Aceton HPLC grade

Kyselina chlorovodíková p.p. 37% (HCl)

Kyselina octová ledová p.a. 99,8% (Penta, Praha, ČR)

4-Dimethylaminocinnamaldehyd, čistota ≥ 98 % (Sigma, St Louis, MO, USA. EC 228-267-0)

6.5.2 Referenční látky

Procyanidin A2, čistota > 99 % (Extrasynthese, Genay Cedex, Francie. Katalog No. 0985 S)

6.5.3 Rostlinný materiál

Extrakt z *V. macrocarpon*, poskytnutý společností Valosun®. Hodnocené doplňky stravy uvedené v tabulce III. Jako vzorky 9 a 10 byly navíc analyzovány další dva přípravky uvedené v tabulce VI.

Tabulka VI

Stručná charakteristika hodnocených doplňků stravy

Název	Forma	Obsah aktivní látky	Denní dávka
9. Apo-Brusinky Strong Profarma- Produkt	kapsle s obsahem CranRich™ (36:1)	extraktu 500 mg/kapsle ekvivalent 18 g ovoce	2 kapsle 1000 mg
10. Urinal Akut Walmark	tablety s obsahem CystiCran®	extraktu 90 mg /tableta 40 % PAC ekvivalent 423g ovoce	1 tableta

6.5.4 Pracovní roztoky a jejich složení

Rozpouštědlo pro extrakci PAC: aceton 75 ml, deionizovaná voda 24,5 ml, kyselina octová ledová 0,5 ml.

Okyselený ethanol: koncentrovaná HCl 12,5 ml, voda destilovaná 12,5 ml, ethanol 75 ml.

Ředící roztok: ethanol 80 ml, voda deionizovaná 20 ml.

DMAC činidlo 0,1%: DMAC 0,05 g byl rozpuštěn v 50 ml okyseleného ethanolu.

6.5.4.1 Příprava pracovního a kontrolního roztoku standardu

Procyanidin A2 (2 mg) byl zvážen a kvantitativně převeden do 20ml odměrné baňky. Obsah byl doplněn ethanolem (91%). Výsledná koncentrace pracovního roztoku A2 byla 100 µg/ml. Kontrolní roztok A2 byl připraven z 1 ml pracovního roztoku A2 přidáním 250 µl ethanolu (91%) a promícháním. Výsledná koncentrace kontrolního roztoku A2 byla 80 µg/ml.

6.5.5 Extrakce PAC a příprava vzorků

Jednotlivé lékové formy hodnocených přípravků byly k usnadnění rozpouštění upraveny způsobem již popsáním v kapitole 4.2. Vzorky byly odváženy (v množstvích 20 – 1000 mg) a převedeny do 50ml odměrných baněk. Ke vzorkům bylo přidáno 20 ml rozpouštědla pro extrakci PAC. Obsah byl promíchán a podroben ultrazvuku po dobu 30 min. při pokojové teplotě. Baňky byly následně protřepávány po dobu 1 hod. Obsah byl převeden do plastových zkumavek a centrifugován při zrychlení $2000 \times g$ po dobu 10 min. při teplotě 20 °C. Supernatantní tekutina byla odebrána k analýze.

6.5.6 Provedení analýzy

Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 70 μ l jednoho z následujících roztoků:

pracovní roztoky standardu A2 ve zředění 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 a 1 : 32,

roztoky zkoušených vzorků ve zředění 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4,

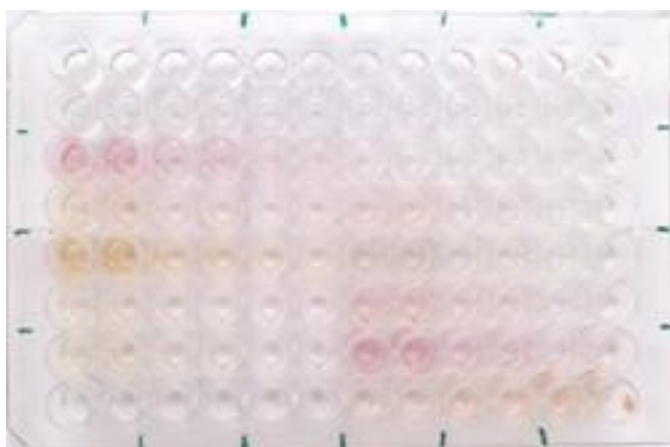
kontrolní roztok standardu A2,

slepý vzorek (ethanol 80%).

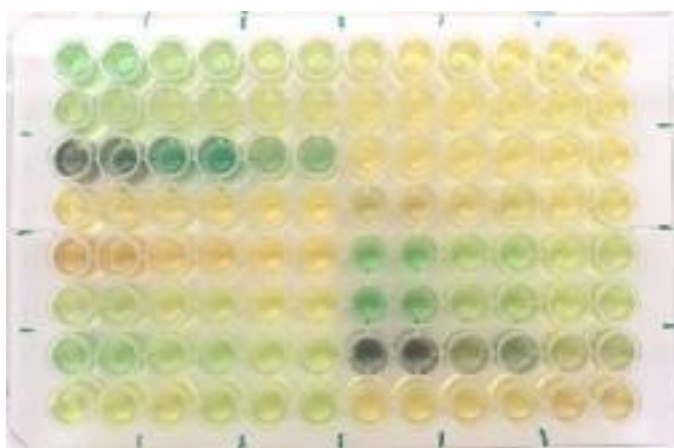
Do každé jamky bylo přidáno 210 μ l DMAC činidla. Výsledný objem každé jamky činil 280 μ l. Měření se zahájilo neprodleně po přidání činidla a promíchání, při vlnové délce 640 nm a teplotě 25 °C. Absorbance se odečítala každou minutu po dobu 30 min.

Měření bylo provedeno třikrát a se dvěma různými navážkami. Při každém měření byl vzorek v jednotlivém zředění pipetován dvakrát do dvou sousedních jamek, a to pro eliminaci náhodných chyb při pipetování a odchylek měření.

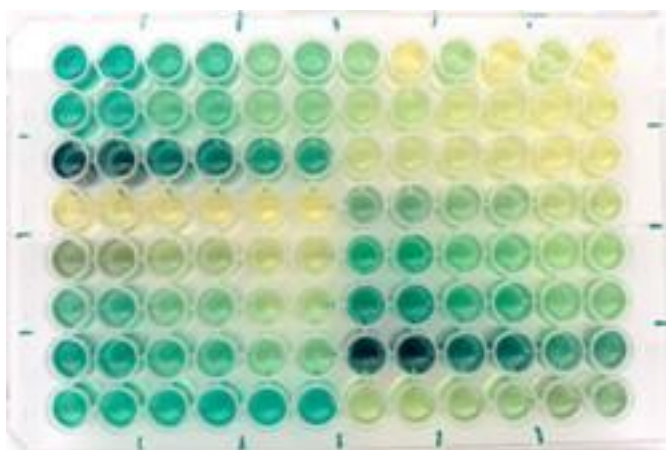
Následující obrázky znázorňují barevný přechod na mikrotitrační destičce během analýzy.



Obr. 7 Zbarvení vzorků před přidáním činidla DMAC



Obr. 8 Zbarvení reakčního prostředí po přidání činidla DMAC



Obr. 9 Zbavení reakčního prostředí po 30 minutách analýzy

6.6 Výpočet a výsledky

K výpočtu byly použity maximální hodnoty absorbance pro jednotlivé jamky. Objevovaly se v různém čase v závislosti na zředění vzorku. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce VII.

Tabulka VII

Maximální naměřené hodnoty absorbancí jednotlivých roztoků v různých zředěních (měření 2)

	1 : 1		1 : 2		1 : 4		1 : 8		1 : 16		1 : 32	
A2	1,637	1,75	1,008	1,005	0,606	0,562	0,35	0,336	0,212	0,189	0,128	0,121
1	3,542	3,532	2,91	2,964	1,752	1,738	-	-	-	-	-	-
2	0,338	0,407	0,203	0,205	0,134	0,135	-	-	-	-	-	-
3	0,078	0,083	0,071	0,071	0,053	0,054	-	-	-	-	-	-
4	0,73	0,737	0,449	0,454	0,252	0,261	-	-	-	-	-	-
5	1,488	1,547	0,82	0,838	0,445	0,492	-	-	-	-	-	-
6	0,866	0,795	0,465	0,5	0,296	0,329	-	-	-	-	-	-
7	0,977	0,972	0,514	0,521	0,277	0,284	-	-	-	-	-	-
8	3,015	3,275	1,948	1,896	1,099	1,175	-	-	-	-	-	-
9	0,86	0,879	0,535	0,549	0,27	0,305	-	-	-	-	-	-
	žádné zředění											
kontrola	1,444	1,496	1,491	1,562	1,485	-	-	-	-	-	-	-
blank	0,047	0,044	0,045	0,045	0,042	-	-	-	-	-	-	-

A2 – roztok standardu, kontrola – kontrolní roztok standardu, blank – slepý vzorek.

Z duplikátních hodnot absorbance pro jednotlivá zředění byl vypočítán průměr. Hodnoty byly dále upraveny odečtením absorbance slepých vzorků. Z výsledných absorbancí roztoků standardu A2 byla vynesena kalibrační křivka (Obr. 10). Koncentrace PAC ve zkoušených roztocích byly vypočítány na základě regresní analýzy ($y = kx + q$) mezi koncentracemi standardu A2 (y) v $\mu\text{g/ml}$ a příslušnými hodnotami absorbance (x).

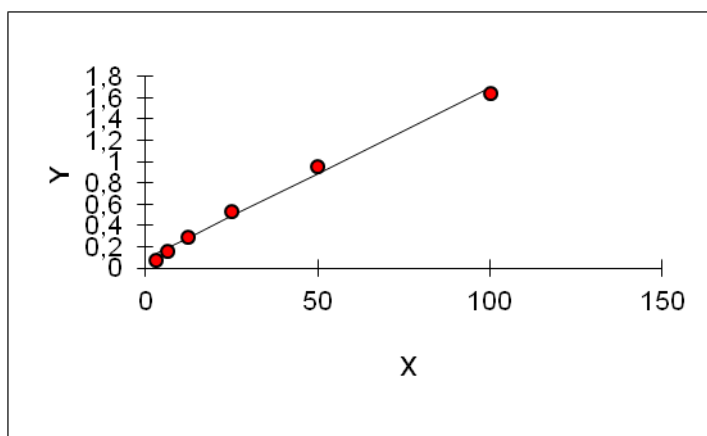
Výsledky analýzy pro měření 2. jsou uvedeny v tabulce VIII. Do řádku predikce byla vložena průměrná hodnota absorbance kontrolního vzorku (kontrola). Naměřené koncentrace kontrolního vzorku vyšly 88,0 $\mu\text{g/ml}$ (měření 1.) a 88,6 $\mu\text{g/ml}$ (měření 2), místo předpokládané koncentrace 80 $\mu\text{g/ml}$.

Tabulka VIII
Regresní analýza

Lineární regrese		
x(exper)	y(exper)	y(teor)
100,000	1,649	1,695
50,000	0,962	0,891
25,000	0,539	0,488
12,500	0,298	0,287
6,250	0,156	0,187
3,125	0,080	0,136

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	6,000	Odhad chyby
Směrnice	k =	0,016	± 0,001
Abs. člen	q =	0,086	± 0,034
Korelační koef.	r =	0,996	
Reziduální odch.	s =	0,059	
Predikce	y =	1,511	x = 88,576

X je koncentrace procyanidinu A2 v $\mu\text{g/ml}$, y je příslušná absorbance.



Obrázek 10

Kalibrační křivka z měření 2

Na ose x jsou koncentrace procyanidinu A2 v $\mu\text{g/ml}$, na ose y příslušné absorbance.

Koncentrace PAC ve zkoušených vzorcích byly vypočítány jako celkové PAC v mg ekvivalentů procyanidinu A2 na 1 g vzorku podle rovnice:

$$c \text{ (mg/g)} = \frac{C \text{ (mg/ml)} \times D \times V \text{ (ml)}}{S \text{ (g)}}$$

kde C značí koncentraci PAC ve zkoušeném roztoku vzorku vypočítanou z rovnice regrese (v mg/ml), D značí zředění roztoku ($D = 1, 2$ nebo 4), V značí objem extrakčního roztoku v ml (vždy 20 ml) a S je navážka vzorku v g. Z koncentrací vypočítaných pro jednotlivá zředění byl určen průměr.

Výsledky jednotlivých měření, průměrné hodnoty ze tří měření, směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce IX.

Tabulka IX

Výsledné koncentrace PAC ve vzorcích

vzorek	měření			průměr	SD	RSD (%)
	1	2	3			
1	4,988	4,738	6,555	5,427	0,804	14,819
2	0,559	0,260	0,115	0,311	0,185	59,456
3	0,0005	0,0000	0,0003	0,0003	0,0002	81,1143
4	2,079	1,468	1,905	1,817	0,257	14,146
5	2,945	2,387	2,720	2,684	0,229	8,542
6	2,030	1,659	1,364	1,684	0,273	16,179
7	5,096	3,851	4,597	4,515	0,511	11,325
extrakt Valosun	46,258	39,283	45,133	43,558	3,058	7,020
9	5,385	4,415	5,281	5,027	0,435	8,651
10	-	-	9,138	9,138	-	-
kontrola	87,983	88,576	-	88,280	0,296	0,336

Koncentrace jsou vyjádřeny v mg/g suché hmotnosti vzorku, s výjimkou vzorku 3, kde je koncentrace uvedena v mg/ml tekutého přípravku.

SD je směrodatná odchylka,

RSD je relativní směrodatná odchylka.

Z průměrných koncentrací ve vzorcích a hmotností jednotlivých lékových forem byl vypočítán obsah PAC v doporučené denní dávce přípravků. Výsledky shrnuje tabulka X.

Tabulka X

Obsah PAC ve vztahu k lékové formě přípravku

vzorek	koncentrace (mg/g)	hmotnost formy (g)	lékové množství v lékové formě (mg)	množství PAC v DDD (mg)
1	5,427	5,000	27,135	54,270
2	0,311	0,621	1,193	2,386
3	0,0003 mg/ml	20 ml	0,006	0,006
4	1,817	0,432	0,785	4,710
5	2,684	1,277	3,427	20,565
6	1,684	0,639	1,076	4,304
7	4,515	0,468	2,113	4,226
9	5,027	0,500	2,514	5,027
10	9,138	0,544	4,971	4,971

DDD je doporučená denní dávka.

Výsledné naměřené koncentrace PAC v komerčně dostupných přípravcích se pohybovaly v rozsahu 0,311 až 9,138 mg/g suché hmotnosti přípravku. U tekutého přípravku byla zjištěna koncentrace 0,0003 mg/ml. Koncentrace PAC v extraktu z *V. macrocarpon* poskytnutém společností Valosun® byla stanovena na 43,558 mg/g. Podle přiložené specifikace obsahuje minimálně 10 % PAC. Měřením byl zjištěn obsah 4,3 %.

Přípravek 5 obsahuje právě uvedený extrakt Valosun® v deklarovaném množství 130 mg v 1 tobolce. Z měření vyplývá, že v jedné tobolce je obsaženo 3,427 mg PAC, to by znamenalo 2,6% obsah PAC v daném extraktu.

Přípravek 4 (Urinal, Wallmark) obsahuje koncentrovanou sušenou šťávu NutriCran® s deklarovaným obsahem 0,95 % PAC v množství 200 mg, tedy 1,9 mg PAC v 1 tobolce. Naším měřením bylo zjištěno 0,785 mg PAC v tobolce.

Přípravek 10 (Urinal Akut, Wallmark) obsahuje extrakt CystiCran® s deklarovaným obsahem 40 % PAC, a to v množství 90 mg v 1 tabletě, tedy 36 mg PAC v 1 tabletě. Naším měřením bylo zjištěno 4,971 mg.

Přípravky 7 a 9 (Apo-Brusinky a Apo-Brusinky Strong, Profarma Product) jsou vlastně totožné přípravky s různými názvy. Každý s obsahem 500 mg extraktu CranRich™ v 1 kapsli. Měřením byly zjištěny podobné koncentrace 4,515 a 5,027 mg/g suché hmotnosti přípravku.

Pro odlišnost formulací přípravků a jejich dávkování není možné porovnávat přípravky na základě koncentrace. Proto byl vypočten obsah PAC v doporučených denních dávkách. Pohyboval se mezi 0,006 a 54,27 mg. Jediné dva přípravky, které se tímto obsahem přiblížily doporučené denní dávce 36 PAC, byl přípravek 1 - Cys Control® Arkopharma (54 mg) a přípravek 5 - Uroval® biotic Valosun (21 mg).

V. DISKUSE

1. Analýza extraktu *Vaccinium macrocarpon* pomocí TLC

Pro nedostupnost standardních látek ze skupiny proanthocyanidinů jsme při TLC analýze využili extrakt poskytnutý společností Valosun. Při přípravě vzorků bylo pro stanovení optimální rozpustnosti daného extraktu vyzkoušeno několik rozpouštědel. PC se často extrahují vodnými organickými rozpouštědly. Jak uvádí různé zdroje^{55,57}, 60% methanol se zdá být nejlepším rozpouštědlem pro oligomerní procyanidiny, zatímco 70% aceton nejlépe extrahuje zejména polymerní PC. Extrakt Valosun, podle předpokladů tvořený nejen PC, ale i dalšími flavonoidy, se dobře rozpouštěl v 50% methanolu a 50% ethanolu, ovšem do určité koncentrace (100 mg/ml). Ve vzorku se po odstátí tvořila sedlina, zřejmě obsahující polymery o vysoké molekulové hmotnosti. Vzorek ponechaný po několik dní na laboratorním stole postupně hnědnul. To potvrzuje již zmiňované intenzivní oxidační reakce v klikvových produktech a vznik polymerních pigmentů. Ve vodě se extrakt rozpouštěl velmi nepatrně, za vzniku růžové tekutiny s výraznou sedlinou. Po okyselení roztoků se výrazněji projevila červená barva, což ukazuje na přítomnost anthocyanů. Extrakt *V. myrtillus* s vysokým obsahem anthocyanů jsme při TLC analýze využili k porovnání. Vyzkoušeli jsme různé mobilní fáze a snažili se najít metodu vhodnou k dostatečnému rozdělení složek extraktu Valosun.

Technika TLC se zejména hodí pro hrubé rozdělení směsi oligomerních procyanidinů podle stupně polymerizace a molekulové hmotnosti, a to až do velikosti hexamerů. Větší molekuly mají menší R_f , monomery (katechin) mohou mít R_f až 0,8^{57,58,59}. Ovšem velmi žádoucí je nejdříve oddělit procyanidinovou frakci od ostatních flavonoidů a také hydrofóbních kontaminantů (tuky, terpeny) přítomných v celkovém extraktu. V opačném případě můžeme očekávat nadbytečné zadržování polárních látek na startu (matrix efekt), nejednotnou migraci oddělovaných zón a špatnou výpovědní hodnotu chromatogramů, s čímž jsme se setkali v naší analýze. K rozdělení extraktů by bylo vhodné použít sloupcovou chromatografii na polyamidových nebo Sephandex-LH kolonách, kdy methanolvý/ethanolvý eluát obsahuje flavonoidní frakce, eluát získaný vodným methanolem obsahuje dimerní a oligomerní PAC a eluát získaný směsí acetonu a vody (7:3) obsahuje PAC polymerní^{57,59,60}. V takovém případě by TLC mohla představovat vhodnou techniku k porovnání klikvových extraktů na základě profilů mono/oligo/polymerních PAC.

2. Analýza extraktu pomocí HPLC

Získané chromatogramy poskytly jen hrubou představu o složení vzorků. V mrtvém objemu se nejspíše eluovaly sloučeniny polymerního charakteru.

3. Stanovení antioxidační aktivity přípravků

Protože koncentrace hyperosidu a kvercetinů ve vzorcích nejsou známy, nemůžeme porovnávat hodnoty EC_{50} standardů a vzorků. Můžeme ale porovnat vzorky mezi sebou. Vyšší antioxidační aktivita přípravku č. 3 může být vysvětlena obsahem antioxidačně působících pomocných látek sorbanu draselného a disiřičitan draselného.

3. Kvantitativní stanovení PAC s využitím reakce s DMAC

Stejně jako v předchozích pracích^{56,66} byla zjištěna lineární závislost mezi absorbancí a koncentrací standardu – proanthocyanidinu A2 – v rozmezí 3,125 až 100 $\mu\text{g/ml}$. Korelační koeficienty závislostí zjištěných v jednotlivých měřeních byly 0,999, 0,996 a 0,998.

Autoři metody⁶⁶ ve své práci analyzovali komerčně dostupné suché extrakty získané z *Vaccinium macrocarpon*, nikoliv doplňky stravy s jejich obsahem. Naměřené koncentrace byly v rozsahu 0,63 až 177 mg/g suché hmotnosti extraktu. S tímto výsledkem můžeme porovnat jedině extrakt z *V. macrocarpon* poskytnutý společností Valosun®, kde byla koncentrace stanovena na 43,558 mg/g .

Autoři jiné práce⁶⁷ analyzovali doplňky stravy s obsahem *Vaccinium macrocarpon* pomocí stejné metody a zjistili koncentrace v rozsahu 0,3 až 73 mg/g přípravku, což je rovněž řádově porovnatelné s našimi výsledky - 0,311 až 9,138 mg/g .

Variabilita výsledků zjištěná ze tří měření vyjádřená jako relativní standardní odchylka byla v rozmezí 0,3 až 16 %. Hodnoty RSD výsledků pro vzorky 2 a 3 byly příliš vysoké - 59 a 81 %. Také naměřené koncentrace PAC byly u těchto vzorků nejmenší. Navážka vzorků nebyla upravená tak, aby výsledná koncentrace spadala do lineárního rozmezí kalibrační křivky. Hodnoty absorbancí použitých k výpočtu byly příliš nízké - v rozsahu 0,365 až 0,095 a 0,078 až 0,054, přičemž dobré opakovatelnosti měření se dosahuje v rozmezí 0,2 až 0,8. Výsledky pro vzorky 2 a 3 nemůžeme považovat za směrodatné. Bylo by třeba provést jejich analýzu ještě jednou a s většími navážkami.

Nedostatkem našeho měření je doba použitelnosti přípravků, která byla v době analýzy překročena. Přípravky byly uchovávány v lednici a nebyly vystavovány záření. Ale jak již bylo řečeno, proanthocyanidiny snadno podléhají oxidaci. Musíme proto při interpretaci výsledků s tímto faktem počítat. Zajímavé je potom srovnání se dvěma nově zakoupenými přípravky 9 a 10, u kterých byla doba použitelnosti v pořádku. Starý vzorek 7 a nový vzorek 9 jsou dva totožné přípravky se stejným složením a formulací, liší se jen v názvech (Apo-Brusinky a Apo-Brusinky Strong, Profarma Product). Měřením byly zjištěny podobné koncentrace 4,515 a 5,027 mg/g, což vypovídá buď o dobré stabilitě produktu, nebo o tom, že výrobce mění složení v průběhu času a složení přípravků z různých šarží není konstantní. U další dvojice produktů – 4 a 10 (Urinal a Urinal Akut, Wallmark) byl obsah PAC v denní doporučené dávce stanoven na 4,710 mg (6 tablet) a 4,971 mg (1 tableta). Denní dávky těchto přípravků se tedy shodují, jen se liší formulací – přípravek 10 je v koncentrovanější formě.

Obecně k metodě je třeba zdůraznit, že naměřené koncentrace PAC se týkají nejen proanthocyanidinů typu A, které jsou předpokládány účinnými složkami přípravků, ale i typu B. Nemůžeme tak s jistotou říct, že PAC zjištěné ve vzorcích pochází ze stejného zdroje a že tímto zdrojem je skutečně *Vaccinium macrocarpon*.

Metoda také podhodnocuje obsah polymerních PAC, protože činidlo DMAC pravděpodobně reaguje jen s koncovou jednotkou polymeru. Procentuální zastoupení polymerních PAC v našich vzorcích neznáme - může se lišit podle typu použitého extraktu a formulace přípravku. To poněkud ztěžuje objektivní porovnání vzorků.

Avšak jediný vztah mezi množstvím PAC a účinkem proti infekcím močových cest, který je klinicky podložený a schválený zdravotnickou autoritou, vychází z dávky 36 mg PAC stanovené právě pomocí této metody. Byla použita k doložení průkaznosti zdravotních tvrzení souvisejících s klikvovými produkty předložených francouzskému úřadu pro kontrolu potravin (kapitola 5.1 teoretické části).

Je specifická, rychlá a snadno proveditelná. Autoři doporučují celosvětové použití metody pro snadno reprodukovatelné výsledky a možnost uniformní standardizace klikvových produktů.

VI. ZÁVĚR

Byl vytvořen ucelený přehled o problematice doplňků stravy s obsahem *Vaccinium macrocarpon*. Na základě rešerše dostupných informací bylo zjištěno, že proanthocyanidiny z *Vaccinium macrocarpon* skutečně disponují potenciálem potlačovat infekce močových cest.

Hlavní účinnou skupinou jsou proanthocyanidiny typu A, které jsou v plodech *V. macrocarpon* přítomné v nezvykle velkém množství. Mechanismus působení těchto látek zatím není dostatečně vysvětlen. Pravděpodobně ovlivňují schopnost bakterií *E.coli* přilnout k epitelu močových cest.

Toto působení je především preventivní, a to při pravidelném užívání. Dávka doporučená na základě několika klinických studií je 36 mg proanthocyanidinů denně.

Doplňky stravy byly analyzovány s cílem najít a vyhodnotit obsah účinných proanthocyanidinů. Hlavním problémem při analýze proanthocyanidinů byla komplexnost jejich směsí v rostlinném materiálu, velká strukturní rozmanitost, různý stupeň polymerizace a nedostatek komerčně dostupných standardů.

K analýze bylo vyzkoušeno několik technik. Použité metody HPLC a TLC sice umožnily vytvořit si hrubou představu o vlastnostech a složení rostlinného materiálu, nevedly ale k dosažení hlavního cíle práce.

Byla vyzkoušena metoda kolorimetrického stanovení na základě reakce s činidlem DMAC. Umožnila nám stanovit koncentrace proanthocyanidinů ve vzorcích. Přes některé nedostatky se tato metoda dobře hodí k posouzení obsahu proanthocyanidinů v doplňcích stravy.

Mezi hodnocenými přípravky byly zjištěny velké rozdíly nejen v obsahu účinných látek, ale i v povaze doprovodných informací. Je třeba zdůraznit chybné uvádění botanického původu použitého materiálu.

Doplňky stravy s obsahem *Vaccinium macrocarpon* dostupné na českém trhu by mohly představovat vhodnou alternativní možnost léčby pro pacienty s infekcemi močových cest. Je ovšem nutné, aby byly dobře a jednotně charakterizované s hlediska obsahu účinných látek, a aby byly doprovázeny adekvátními informacemi o správném užívání.

VII. POUŽITÁ LITERATURA

1. Jahodář L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2006.
2. Agricultural Research Service (ARS): *Germplasm Resources Information Network (GRIN)* [online databáze]. United States Department of Agriculture (USDA). Dostupné z: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/econ.pl> (vid. 11. 4. 2012).
3. Natural Resources Conservation Service (NRCS): *The PLANTS Database* [online databáze]. United States Department of Agriculture (USDA). Dostupné z: <http://plants.usda.gov> (vid. 10. 4. 2012).
4. Université de Montréal Biodiversity Centre: *Database of Canadian Vascular Plants (VASCAN)* [online databáze]. Dostupné z: <http://data.canadensys.net/vascan> (vid. 10. 4. 2012).
5. Sprague T. A., Sprague M. S.: *The Herbal of Valerius Cordus*. J. Linn. Soc. London, Bot. 52, 1–113 (1939).
6. Suda J.: *Taxonomická studie rodu Oxycoccus Hill v České republice a přilehlých územích*. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha 1997.
7. Takhtajan A.: *Flowering Plants*. Second Edition. Springer, New York 2009.
8. Elisens W. J.: *Flora of North Amerika north of Mexico*. Oxford University Press, New York 2009.
9. Danihelka J., Chrtek J., Kaplan Z., Wild J.: *Seznam jmen cévnatých rostlin použitých v nálezové databázi květeny České republiky* [online seznam]. Botanický ústav AV ČR. Dostupné z: <http://www.ibot.cas.cz/index.php?p=seznam> (verze z 23. 1. 2011).
10. Koževnikov J. P.: *Žižň rastěnij. Sěmějstvo vereskovyje (Ericaceae)*, str. 88 – 89. Prosvešeniye, 1981.
11. Aiton W.: *Hortus Kewensis. A catalogue of the plants cultivated in the Royal Botanic Garden at Kew*. Printed for George Nicol, Bookseller to his Majesty, London 1789.

- 12.** Cape Cod Cranberry Growers' Association: *Cranberries. History* [webové stránky]. Dostupné z: <http://www.cranberries.org> (vid. 24. 5. 2012).
- 13.** National Agricultural Statistics Service (NASS): *Cranberry Production – States and United States: 2010, 2011, and Forecasted 2012* [online dokument]. United States Department of Agriculture (USDA). Dostupné z: <http://www.usda.gov/nass/PUBS/TODAYRPT/cran0812.pdf> (vid. 24. 5. 2012).
- 14.** United States Pharmacopeia (USP 32)
- 15.** Côte J., Caillet S., Doyon G., Sylvain J. - F., Lacroix M.: *Bioactive Compounds in Cranberries and their Biological Properties*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 50, 666 (2010).
- 16.** Pappas E., Schaich K. M.: *Phytochemicals of cranberries and cranberry products: Characterization, potential health effects, and processing stability*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 49, 741 (2009).
- 17.** Guay D. R. P.: *Cranberry and urinary tract infections*. Drugs 69, 775 (2009).
- 18.** Kolečkář V., Řeháková Z., Brojerová E., Kuča K., Jun D., Macáková K., Opletal L., Drasář P., Jahodář L., Chlebek J., Cahlíková L.: *Proanthocyanidiny a jejich antioxidační aktivita*. Chem. Listy 106, 113 (2012).
- 19.** Agriculture Research Service (ARS): *National Nutrient Database for Standard Reference. Release 26* [online databáze]. United States Department of Agriculture (USDA). Dostupné z: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/list> (vid. 9. 9. 2013).
- 20.** Zuo Y., Wang C., Zhan J.: *Separation, characterization, and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS*. J. Agric. Food Chem. 50, 3789 (2002).
- 21.** Anjou K., von Sydow E.: *The aroma of cranberries II. Vaccinium macrocarpon Ait.* Acta chem. Scand. 21, 2076 (1967).
- 22.** He X., Rui H. L.: *Cranberry phytochemicals: Isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities*. J. Agric. Food Chem. 54, 7069 (2006).
- 23.** Krenn L., Steitz M., Schlicht C., Kurth H., Gaedcke F.: *Anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts of berries in food supplements - analysis with problems*. Pharmazie. 62, 803 (2007).

- 24.** Santos-Buelga C., Scalbert A.: *Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health.* J. Sci. Food Agric. 80, 1094 (2000).
- 25.** Neto C.C.: *Cranberries: ripe for more cancer research?* J. Sci. Food Agric. 91, 2303 (2011).
- 26.** Shmueli H., Ofek I., Weiss E., Ronen Z., Houry-Haddad Y.: *Cranberry components for the therapy of infectious disease.* Curr. Opin. Biotechnol. 23, 148 (2012).
- 27.** Jepson R. G., Craig J. C.: *A systematic review of the evidence for cranberries and blueberries in UTI prevention.* Mol. Nutr. Food Res. 51, 738 (2007).
- 28.** Pérez-López F. R., Haya J., Chedraui P.: *Vaccinium macrocarpon: An interesting option for women with recurrent urinary tract infections and other health benefits.* J. Obstet. Gynaecol. Res. 35, 630 (2009).
- 29.** Uberos J., Nogueras-Ocana M., Fernandez-Puentes V., Rodriguez-Belmonte R., Narbona López E., Molina-Carballo A., Munoz-Hoyos A.: *Cranberry syrup vs trimethoprim in the prophylaxis of recurrent urinary tract infections among children: A controlled trial.* Open Access J. Clin. Trials 4, 31 (2012).
- 30.** Afshar K., Stothers L., Scott H., MacNeily A. E.: *Cranberry Juice for the Prevention of Pediatric Urinary Tract Infection: A Randomized Controlled Trial.* J. Urol. 188, 1584 (2012).
- 31.** Foo L. Y., Lua Y., Howell, A. B., Vorssa, N.: *The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated Escherichia coli in vitro.* Phytochemistry. 54, 173 (2000).
- 32.** Howell A. B., Reed J. D., Krueger Ch. G., Winterbottom R., Cunningham D. G., Leahy M.: *A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity.* Phytochemistry. 66, 2281 (2005).
- 33.** Liu Y., Black M. A., Caron L., Camesano T. A.: *Role of cranberry juice on molecular-scale surface characteristics and adhesion behavior of Escherichia coli.* Biotechnol. Bioeng. 93, 297 (2006).
- 34.** Ou K., Percival S. S., Zou T., Khoo Ch., Gu L.: *Transport of cranberry A-type procyanidin dimers, trimers, and tetramers across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells.* J. Agric. Food Chem. 60, 1390 (2012).

- 35.** Valentová K., Stejskal D., Bednář P., Vostálová J., Číhalík Č., Večeřová R., Koukalová D., Kolář M., Reichenbach R. et al.: *Biosafety, antioxidant status, and metabolites in urine after consumption of dried cranberry juice in healthy women: A pilot double-blind placebo controlled trial.* J. Agric. Food Chem. 55, 3217 (2007).
- 36.** Rajbhandari R., Peng N., Moore R., Arabshahi A., Wyss J. M., Barnes S., Prasain J. K.: *Determination of cranberry phenolic metabolites in rats by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* J. Agric. Food Chem. 59, 6682 (2011).
- 37.** Gupta K., Chou M. Y., Howell A., Wobbe C., Grady R., Stapleton A. E.: *Cranberry products inhibit adherence of p-fimbriated Escherichia coli to primary cultured bladder and vaginal epithelial cells.* J. Urol. 177, 2357 (2007).
- 38.** Lavigne J. - P., Bourg G., Combescure C., Botto H., Sotto A.: *In-vitro and in-vivo evidence of dose-dependent decrease of uropathogenic Escherichia coli virulence after consumption of commercial Vaccinium macrocarpon (cranberry) capsules.* Clin. Microbiol. Infect. 14, 350 (2008).
- 39.** Howell A. B., Botto H., Combescure Ch., Blanc-Potard A. B., Gausa L., Matsumoto T., Tenke P. et al.: *Dosage effect on uropathogenic Escherichia coli anti-adhesion activity in urine following consumption of cranberry powder standardized for proanthocyanidin content: a multicentric randomized double blind study.* BMC Infect. Dis. 10, 94 (2010).
- 40.** European Commission: *EU Register on nutrition and health claims* [online registr]. Dostupné z: <http://ec.europa.eu/nuhclaims/> (vid. 6. 9. 2013).
- 41.** Beerepoot M. A., ter Riet G., Nys S. et al.: *Cranberries vs antibiotics to prevent urinary tract infections: a randomized double-blind noninferiority trial in premenopausal women.* Arch. Intern. Med. 171, 1270 (2011).
- 42.** Stothers L.: *A randomized trial to evaluate effectiveness and cost effectiveness of naturopathic cranberry products as prophylaxis against urinary tract infection in women.* Can. J. Urol. 9, 1558 (2002).
- 43.** Therapeutic Research Faculty: *Natural Medicines Comprehensive Database: Cranberry* [online databáze]. Dostupné z: <http://naturaldatabase.therapeuticresearch.com/home.aspx?cs=&s=ND> (vid. 3. 6. 2011).

44. Terris M. K., Issa M. M., Tacker J. R.: *Dietary supplementation with cranberry concentrate tablets may increase the risk of nephrolithiasis*. *Urology* 57, 26 (2001).
45. Gettman M. T., Ogan K., Brinkley L. J., Adams-Huet B., Pak Ch., Pearle M. S.: *Effect of cranberry juice consumption on urinary stone risk factors*. *J. Urol.* 174, 590 (2005).
46. Williamson E., Baxter K., Driver S.: *Stockley's Herbal Medicines Interactions*. Pharmaceutical Press, London 2009.
47. Kim E., Sy-Cordero A., Graf T.: *Isolation and identification of intestinal cyp3a inhibitors from cranberry (Vaccinium macrocarpon) using human intestinal microsomes*. *Planta Med.* 77, 265 (2011).
48. Předpis č. 110/1997 Sb. *Zákon o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů*. Sbírka zákonů ČR 1997, částka 38/1997, str. 2178.
49. Předpis č. 225/2008 Sb. *Vyhláška, kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin*. Sbírka zákonů ČR 2008, částka 71/2008, str. 3230.
50. Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1924/2006 *o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin*. Úřední věstník Evropské unie 30. 12. 2006, L 404/9.
51. Nařízení Komise č. 1167/2009 *o zamítnutí schválení určitých zdravotních tvrzení při označování potravin, která se týkají snížení rizika onemocnění a vývoje a zdraví dětí*. Úřední věstník Evropské unie 1. 12. 2009, L 314/29.
52. White B. L., Howard L. R., Prior R. L.: *Impact of different stages of juice processing on the anthocyanin, flavonol, and procyanidin contents of cranberries*. *J. Agric. Food Chem.* 59, 4692 (2011).
53. Tarascou I., Mazaauric J.-P., Meudec E. et al.: *Characterisation of genuine and derived cranberry proanthocyanidins by LC-ESI-MS*. *Food Chem.* 128, 802 (2011).
54. Harrison J. E., Oomah D., Diarra M. S., Ibarra-Alvarado C.: *Bioactivities of pilot-scale extracted cranberry juice and pomace*. *J. Food Process. Preserv.* 37, 356 (2012).
55. Krenn L., Steitz M., Schlicht C., Kurth H., Gaedcke F.: *Anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts of berries in food supplements – analysis with problems*. *Pharmazie* 62, 803 (2007).

- 56.** Payne M. J., Hurst W. J., Stuart D. A., Ou B., Fan E., Ji H., Kou Y.: *Determination of total procyanidins in selected chocolate and confectionery products using DMAC.* J. AOAC Int. 93, 89 (2010).
- 57.** Prior R. L., Gu L.: *Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet.* Phytochemistry 66, 2264 (2005).
- 58.** Svedström U.: *Isolation and analysis of oligomeric procyanidins in Crataegus laevigata.* Disertační práce. Katedra farmakognosie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Helsinky, Helsinky 2000.
- 59.** Wagner H., Bladt S.: *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas.* Second Edition. Springer, Heidelberg 2001.
- 60.** Côte J., Caillet S., Doyon G., Sylvain J. - F., Lacroix M.: *Analyzing cranberry bioactive compounds.* Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 50, 872 (2010).
- 61.** Cheng Z., Moore J., Yu L.: *High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay.* J. Agric. Food Chem. 54, 7429 (2006).
- 62.** McMurrough I., McDowell J.: *Chromatographic separation and automated analysis of flavanols.* Anal Biochem. 91, 92 (1978).
- 63.** Treutter D.: *Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde.* J. Chromatogr. 467, 185 (1994).
- 64.** Glavnik V., Simonovska B., Vovk I.: *Densitometric determination of (+)catechin and (-)epicatechin by 4-dimethylaminocinnamaldehyde reagent.* J. Chromatogr. 1216, 4485 (2009).
- 65.** Waterhouse A. L., Ignelzi S., Shirley J. R.: *A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts.* Am. J. Enol. Vitic. 51, 383 (2000).
- 66.** Prior R. L., Fan E., Ji H., Howell A., Nio Ch., Payne M. J., Reed J.: *Multi-laboratory validation of standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders.* J. Sci. Food Agric. 90, 1473 (2010).
- 67.** Sánchez-Patán F., Bartolomé B., Martín-Alvarez P. J., Anderson M., Howell A., Monagas M.: *Comprehensive assessment of the quality of commercial cranberry products. Phenolic characterization and in vitro bioactivity.* J. Agric. Food Chem. 60, 3396 (2012).

VIII. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Autor: Vlada Kazaková

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Název diplomové práce: Fytochemická studie vybraného rostlinného taxonu. Procyanidiny *Vaccinium macrocarpon* v doplňcích stravy.

Cíl: Hlavním cílem práce byla analýza doplňků stravy s obsahem *Vaccinium macrocarpon*, a to zejména zhodnocení obsahu látek, které se považují za klíčové z hlediska účinnosti proti infekcím močových cest.

Metody: K analýze přípravků byly použity techniky TLC, HPLC, stanovení antioxidační aktivity založené na zhášení DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyllového) radikálu. Obsah proanthocyanidinů byl stanoven s využitím reakce s DMAC (4-dimethylaminocinnamaldehydem).

Výsledky: Byl vytvořen přehled o problematice doplňků stravy s obsahem *Vaccinium macrocarpon*. V přípravcích byly stanoveny koncentrace proanthocyanidinů. Zjištěný obsah v doporučené denní dávce přípravků byl v rozmezí 4,2 mg až 54,3 mg.

Závěr: Proanthocyanidiny *Vaccinium macrocarpon* ovlivňují schopnost bakterií přilnout k epitelu močových cest. Vhodnou metodu jejich stanovení představuje stanovení s využitím reakce s DMAC. Doplňky stravy dostupné na českém trhu se významně liší obsahem těchto účinných látek. Některé z nich by mohly představovat vhodnou alternativní možnost léčby pro pacienty s infekcemi močových cest.

Klíčová slova: *Vaccinium macrocarpon*, doplňky stravy, infekce močových cest, proanthocyanidiny, DMAC (4-dimethylaminocinnamaldehyd).

IX. ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Author: Vlada Kazaková

Supervisor: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Title of master's thesis: Phytochemical study of a selected plant taxon. Proanthocyanidins of *Vaccinium macrocarpon* in food supplements.

Background: The main objective of this work was to analyze food supplements containing *Vaccinium macrocarpon*, especially to evaluate the content of substances that are considered to be effective against urinary tract infections.

Methods: Preparations were analyzed by TLC and HPLC techniques, tested for antioxidant activity by method utilizing DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging. Proanthocyanidins content was determined by using method based on the reaction with DMAC (4-dimethylaminocinnamaldehyde).

Results: An overview of the issue of food supplements containing *Vaccinium macrocarpon* was created. Concentrations of proanthocyanidins in samples were determined. The content in recommended daily dose of preparations ranged from 4,2 mg to 54,3 mg.

Conclusions: Proanthocyanidins from *Vaccinium macrocarpon* affect the ability of bacteria to adhere to epithelium of the urinary tract. Suitable method of their determination is method based on reaction with DMAC. Results revealed that supplements available in the Czech market widely differ in content of these active substance. Some of them could be appropriate alternative treatment option for patients with urinary tract infections.

Keywords: *Vaccinium macrocarpon*, food supplements, urinary tract infections, proanthocyanidins, DMAC (4-dimethylaminocinnamaldehyde).