

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

---

RIGORÓZNÍ PRÁCE

**PŘÍRODNÍ LÁTKY A JEJICH BIOLOGICKÁ AKTIVITA VIII.  
ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK  
NATI *RHODIOLA ROSEA* L.**



Vedoucí rigorózní práce: prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.  
Vedoucí katedry: prof. Ing. Lucie Cahlíková, PhD.

Hradec Králové, duben 2021

Mgr. Zbyněk Graja

CHARLES UNIVERZITY  
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE  
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY

---

RIGOROUS THESIS

**NATURAL SUBSTANCES AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY VIII.  
ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SUBSTANCES CONTAINED IN  
AERIAL PARTS OF *RHODIOLA ROSEA* L.**



Supervisor: prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.  
Head of Department: prof. Ing. Lucie Cahlíková, PhD.

Hradec Kralove, April 2021

Mgr. Zbyněk Graja

## PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi CSc. za odborné vedení, cenné připomínky, rady a vstřícnost při zpracování této rigorózní práce, Mgr. Jaroslavu Jenčovi, Ph.D., doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a ostatním pracovníkům katedry farmaceutické botaniky za vytvoření skvělého pracovního prostředí a přátelskou atmosféru při vypracovávání méj rigorózní práce.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

V Uherském Brodě, duben 2021

Mgr. Zbyněk Graja

## OBSAH

<b>I.</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>12</b>
<b>II.</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>16</b>
<b>III.</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>17</b>
<b>1</b>	<b>VOLNÉ RADIKÁLY</b> .....	<b>17</b>
1.1	Základní pojmy a definice .....	17
1.2	Reaktivní formy kyslíku .....	21
1.3	Reaktivní formy dusíku.....	24
1.4	Atomy přechodných kovů jako radikály.....	25
1.5	Fyziologická funkce volných radikálů v organismu .....	26
1.6	Oxidační stres .....	28
<b>2</b>	<b>ANTIOXIDANTY</b> .....	<b>32</b>
2.1	Rozdělení antioxidantů .....	33
2.2	Metody stanovení antioxidační aktivity <i>in vitro</i> .....	37
<b>3</b>	<b>PŘÍRODNÍ ANTIOXIDANTY</b> .....	<b>41</b>
3.1	Zdroje přírodních antioxidantů .....	41
3.2	Aktuální poznatky o významu antioxidantů ve výživě .....	44
<b>4</b>	<b>VÝZNAMNÉ FENOLOVÉ LÁTKY S ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITOU</b> .....	<b>46</b>
4.1	Fenolové kyseliny .....	46
4.2	Flavonoidy .....	48
4.3	Antioxidační účinky polyfenolů .....	53
4.4	Další biologická aktivita polyfenolů .....	54
4.5	Biodostupnost polyfenolů .....	55
<b>5</b>	<b>ROZCHODNICE RŮŽOVÁ RHODIOLA ROSEA L.</b> .....	<b>58</b>
5.1	Botanická charakteristika a výskyt .....	58
5.2	Využití v tradiční lidové medicíně .....	59
5.3	Obsahové látky .....	60
5.4	Biologická aktivita .....	66
<b>IV.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>73</b>
<b>1</b>	<b>VŠEOBECNÉ POSTUPY</b> .....	<b>73</b>
1.1	Rozpouštědla.....	73

1.2 Příprava silikagelu pro sloupcovou chromatografii .....	73
1.3 Sloupcová chromatografie .....	73
1.4 Kontrolní tenkovrstvá chromatografie (TLC) .....	73
1.5 Stanovení sušiny.....	74
1.6 Odpařování frakcí.....	74
1.7 Krystalizace látek.....	74
<b>2 POTŘEBY .....</b>	<b>75</b>
2.1 Rozpouštědla a plyny .....	75
2.2 Chemikálie.....	75
2.3 Činidla.....	76
2.4 Vytřípovací soustavy pro tenkovrstvou chromatografii .....	81
2.5 Chromatografické adsorbenty .....	81
2.6 Přístroje a software .....	81
2.7 Metody stanovení základních fyzikálně chemických charakteristik a struktury.....	82
2.8 Stanovení parametrů antioxidantů.....	83
<b>3 IZOLACE.....</b>	<b>91</b>
3.1 Schéma extrakce nati a sloupcové chromatografie diethyletherového výtřepku .....	91
3.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu .....	91
3.3 Vytřepávání <i>n</i> -BuOH.....	91
3.4 Vytřepávání odparku připraveného <i>n</i> -BuOH směsí ethyl-acetát+ethanol .....	92
3.5 Příprava srovnávacího extraktů pro HPLC stanovení izolovaných látek.....	94
3.6 Tenkovrstvá chromatografie .....	95
3.7 Sloupcová chromatografie .....	103
3.8 Výsledky sloupcové chromatografie – hmotnosti a popis spojených frakcí.....	108
<b>V. VÝSLEDKY .....</b>	<b>119</b>
<b>1 STANOVENÍ OBSAHU FENOLOVÝCH LÁTEK V EXTRAKTECH (VÝTŘEPCÍCH) A ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA .....</b>	<b>119</b>
<b>2 CHARAKTERISTIKA IZOLOVANÝCH LÁTEK .....</b>	<b>120</b>
<b>3 OBSAH GALLOVÉ KYSELINY A JEJÍCH ESTERŮ V ČERSTVÉ NATI VE DVOU TYPECH EXTRAKTŮ .....</b>	<b>121</b>
<b>4 PŮVODNOST IZOLOVANÝCH LÁTEK V ČERSTVÉ NATI .....</b>	<b>122</b>

<b>VI. DISKUSE .....</b>	<b>124</b>
<b>VII. LITERATURA .....</b>	<b>131</b>
<b>VIII. ABSTRAKT .....</b>	<b>142</b>
<b>IX. ABSTRACT .....</b>	<b>143</b>

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1	Vznik volných radikálů .....	19
Obr. 2	Endogenní zdroje RONS.....	20
Obr. 3	Exogenní zdroje RONS .....	21
Obr. 4	Generování různých ROS postupnou redukcí z tripletového kyslíku .....	21
Obr. 5	Oxidační poškození .....	29
Obr. 6	Kyselina skořicová, kyselina kávová, kyselina felurová .....	46
Obr. 7	Kyselina chlorogenová .....	47
Obr. 8	Kasuariktin .....	48
Obr. 9	Flavanoly, flavanony .....	48
Obr. 10	Flavony, flavonoly .....	49
Obr. 11	Proanthocyanidiny, anthocyanidiny .....	49
Obr. 12	Isoflavony.....	49
Obr. 13	Kvercetin, (+)- katechin.....	50
Obr. 14	(+)-Epikatechin.....	50
Obr. 15	Proanthocyanidin A, cyanidin.....	51
Obr. 16	Hesperetin .....	51
Obr. 17	Daidzein, genistein.....	52
Obr. 18	Resveratrol.....	52
Obr. 19	Hydroxytyrosol, oleuropein .....	53
Obr. 20	Vazebná místa pro kovy v molekulách flavonoidů .....	53
Obr. 21	Oxidace polyfenolů .....	54
Obr. 22	<i>Rhodiola rosea</i> L.....	58
Obr. 23	<i>Rhodiola rosea</i> L. – <i>radix</i> .....	59
Obr. 24	Rosavin.....	60
Obr. 25	Rosin .....	61
Obr. 26	Salidrosid .....	61
Obr. 27	Tyrosol .....	61
Obr. 28	Rodiolin .....	61
Obr. 29	Tricin .....	62
Obr. 30	Rosiridol.....	62
Obr. 31	Rosiridin .....	62
Obr. 32	Deukosterol .....	62
Obr. 33	$\beta$ -sisterol .....	63
Obr. 34	Kyselina chlorogenová .....	63
Obr. 35	Kyselina gallová.....	63
Obr. 36	HPLC/UV-Zelená: Kyselina gallová (ZG-3); Modrá: Methylester kyseliny gallové (ZG-2); Červená: Ethylester kyseliny gallové (ZG-1) .....	85
Obr. 37	Kyselina gallová .....	86
Obr. 38	Methylester kyseliny gallové .....	87



Obr. 39 Ethylester kyseliny gallové .....	87
Obr. 40 Kalibrační křivka kyseliny gallové .....	88
Obr. 41 Kalibrační křivka methylesteru kyseliny gallové.....	88
Obr. 42 Kalibrační křivka ethylesteru kyseliny gallové.....	89
Obr. 43 Chromatogram primárního ethanolového extraktu z nati Rozchodnice růžové ...	90
Obr. 44 Seprace extraktu z nati .....	93
Obr. 45 TLC 1 vodný podíl; 2 ethyl-acetátový podíl (EtOAc); 3 butanolový podíl ( <i>n</i> -BuOH) .....	95
Obr. 46 TLC 1 vodný podíl; 2 ethylacetátový podíl (EtOAc); 3 butanolový podíl ( <i>n</i> -BuOH)	96
Obr. 47 TLC 1 vodný podíl; 2 ethylacetátový podíl (EtOAc); 3 butanolový podíl ( <i>n</i> -BuOH)	97
Obr. 48 TLC 1 vodný podíl; 2 ethylacetátový podíl (EtOAc); 3 butanolový podíl ( <i>n</i> -BuOH)	98
Obr. 49 TLC 1 vodný podíl; 2 ethylacetátový podíl (EtOAc); 3 butanolový podíl ( <i>n</i> -BuOH)	99
Obr. 50 TLC 1 filtrát po sražení Et <sub>2</sub> O; 2 sediment po sražení Et <sub>2</sub> O; 3 filtrát po sražení CHCl <sub>3</sub> ; .....	100
Obr. 51 TLC 1 filtrát po sražení Et <sub>2</sub> O; 2 sediment; 3 původní EtOAc odparek .....	101
Obr. 52 TLC 1 filtrát po sražení Et <sub>2</sub> O; 2 původní EtOAc odparek .....	102
Obr. 53 TLC Frakce 1 – 111 po sloupcové chromatografii .....	110
Obr. 54 TLC Frakce 1 – 111 po sloupcové chromatografii .....	111
Obr. 55 TLC Frakce 1 – 111 po sloupcové chromatografii .....	112
Obr. 56 TLC Frakce 112 – 139 po sloupcové chromatografii .....	113
Obr. 57 TLC Frakce 112 – 139 po sloupcové chromatografii .....	114
Obr. 58 TLC Frakce 112 – 139 po sloupcové chromatografii .....	115
Obr. 59 TLC Frakce 39 – 67; ML 39 – 67; 74 – 76; ML 74 –76; 77 – 86; ML 77 – 86 po sloupcové chromatografii.....	116
Obr. 60 TLC Frakce 39; 40; 45; 46; 47 – 55; 79 – 86.....	117
Obr. 61 TLC Frakce 39; 40; 45; 46; 47 – 55; 79 – 86.....	118
Obr. 62 Číslování základního skeletu pro popis NMR .....	120
Obr. 63 TLC Původnost izolovaných látek v čerstvé nati.....	122
Obr. 64 TLC Původnost izolovaných látek v čerstvé nati.....	123

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1	Biologický poločas rozpadu některých RONS.....	17
Tab. 2	Reaktivní formy kyslíku .....	21
Tab. 3	Reaktivní formy dusíku .....	24
Tab. 4	Detoxikační účinek některých antioxidantů.....	33
Tab. 5	Antioxidační aktivita ORAC některých bylin, koření a plodů .....	41
Tab. 6	Antioxidanty identifikované v některých rostlinách .....	42
Tab. 7	Doporučené a přípustné dávky některých antioxidantů.....	45
Tab. 8	Parametry stanovení obsahu izolovaných látek.....	89
Tab. 9	Charakter výtřepků z nati <i>Rhodiola rosea</i> .....	92
Tab. 10	Sloupcová chromatografie frakcí 1-139 .....	103
Tab. 11	Spojené frakce ze sloupcové chromatografie .....	108
Tab. 12	Obsah izolovaných látek v čerstvé nati .....	121

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's Disease)
Ach	Acetylcholin
ADP	Adenosindifosfát
Arg	Arginin ((2S)-2-amino-5-guanidinovalerová kyselina)
ATP	Adenosintrifosfát
AO	Antioxidant
CCH	Civilizační choroby (chronické choroby)
CNS	Centrální nervový systém
COX	Cyklooxygenasa
CRF	Kortikoliberin – faktor uvolňující kortikotropin
CYP	Cytochrom P450
CVD	Kardiovaskulární choroby (Cardiovascular Diseases)
DA	Dopamin
DHA	Dehydroaskorbát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
DPPH	Metoda měření antioxidační aktivity (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl)
EC	Elektrochemická detekce
EPR	Mikrovláková spektroskopie (Electron Paramagnetic Resonance)
FR	Fentonova reakce
G	Guanin
GA	Kyselina gallová (Gallic acid)
GC	Plynová chromatografie
GPx	Glutathion peroxidasa
GSSG	Oxidovaný glutathion
Hcy	Homocystein
HDL	Vysokodenzitní lipoprotein (High Density Lipoprotein)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
LDL	Nízkodenzitní lipoprotein (Low Density Lipoprotein)
LPO	Lipoperoxidace
Met	Methionin
ML	Matečný louh (zbytek po vyloučení krystalů)
MS	Roztroušená mozkomíšní skleróza (Multiple Sclerosis)
NE	Norepinephrin
NOS	NO synthasa
ORAC	Metoda měření antioxidační kapacity (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
PD	Parkinsonova choroba (Parkinson's Disease)
PL A2	Fosfolipasa A2
PUFA	Nenasycené mastné kyseliny (Polyunsaturated Fatty Acids)
Q10	Ubichinon (koenzym Q)
RCIS	Reaktivní forma chlóru (Reactive Chlorine Species)
RNA	Ribonukleová kyselina
RNS	Reaktivní forma dusíku (Reactive Nitrogen Species)
ROS	Reaktivní forma kyslíku (Reactive Oxygen Species)

RSS	Reaktivní forma síry (Reactive Sulphur Species)
SAS	Sympato-adrenální systém
SEM	Rastrovací elektronový mikroskop (Scanning Electron Microscope)
SIA	Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis)
SOD	Superoxiddismutasa
TAS	Celková antioxidační kapacita (Total Antioxidant Status)
TCAs	Tricyklická antidepresiva (Tricyclic Antidepressant)
TCM	Tradiční čínská medicína
TE	Troloxový ekvivalent
TEAC	Metoda měření antioxidační kapacity (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
TLC	Tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
TRAP	Metoda měření antioxidační kapacity (Total Radical Antioxidant Parameter Assay)
UV	Ultrafialové záření
VMK	Vyšší mastné kyseliny
VNS	Vegetativní nervový systém (též autonomní nervový systém ANS)
VR	Volný radikál
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

## I. ÚVOD

Volné radikály (správně reaktivní formy kyslíku a dusíku) jsou spolu s toxickými noxami vnějšího prostředí nejcitovanějším zdrojem patologických vlivů na fyziologické procesy člověka a na vývoj degenerativních onemocnění (civilizačních chorob). Reaktivní formy kyslíku ROS a reaktivní formy dusíku RNS mohou nepříznivě změnit lipidy, proteiny, DNA a podílejí se na patogenezi různých lidských chorob a fyziologickém stárnutí. Zdravé tělo se dokáže s nepříznivými účinky volných radikálů prostřednictvím různých úrovní antioxidační ochrany vyrovnat. Pokud je však rovnováha mezi produkcí volných radikálů a antioxidační kapacitou organismu narušena např. účinkem vnějších, nebo vnitřních nepříznivých vlivů, dojde k nadprodukci volných radikálů, která je označována jako oxidační stres. Oxidační stres je rizikovým faktorem u řady nemocí, zejména u skupiny chorob označovaných jako chronické (civilizační) choroby <sup>1</sup>.

Tyto „civilizační“ choroby tvoří poměrně četnou skupinu neinfekčních, chronických chorob moderní doby, výrazně rozšířených zejména v průmyslově vyspělých zemích, postihujících významnou část tamní populace a vyznačujících se vysokou morbiditou a mortalitou <sup>2</sup>.

Nejčastější civilizační choroby:

a) Alzheimerova choroba (AD)

Neurodegenerativní onemocnění mozku způsobující pokles kognitivních funkcí (poruchy řeči, poruchy orientace, rychlost myšlení, ztrátu paměti a koncentrace) a postupnou demenci. Ačkoliv mechanismus vzniku a rozvoje choroby není zcela znám, je podporována hypotéza, že volné radikály, ROS a RNS způsobují degeneraci neuronů v určitých částech mozku a tím hrají významnou roli v rozvoji Alzheimerovy choroby <sup>2</sup>.

b) Parkinsonova choroba (PD)

Neurodegenerativní onemocnění centrální nervové soustavy způsobující narušení a ztrátu hybnosti, poruchy koordinace trupu a dolních končetin spojené s poruchou rovnováhy a poruchou artikulace. Choroba je charakteristická tzv. Parkinsonovým třesem (třes rukou v klidu). Často je spojena s Alzheimerovou chorobou. Jedna z teorií vzniku choroby pokládá za příčinu poškození lipidů plazmatické membrány

mozkových buněk volnými radikály a ROS a RNS, vedoucí k narušení jejich antioxidační ochrany<sup>3</sup>.

c) Roztroušená mozkomíšní skleróza (MS)

Neurodegenerativní autoimunitní onemocnění postihující centrální nervový systém. Projevem choroby je optická neuritida (zamlžené vidění, výpadky zorného pole, porucha barevného vidění), koordinační poruchy a sexuální dysfunkce. Mimo genetickou predispozici se prokazuje, že volné radikály se narušováním obranných mechanismů centrálního nervového systému podílejí na patogenezi roztroušené sklerózy<sup>4</sup>.

d) Ateroskleróza

Degenerativní chronické onemocnění způsobené ukládáním aterogenních látek (zejména lipidů, cholesterolu, fosfolipidů, triglyceridů) do stěn tepen. Dochází ke ztrátě pružnosti tepny, k zúžení průsvitu a ke vzniku trombu. Krev nemůže dostatečně proudit k orgánům, které má postižená tepna zásobovat. Ateroskleróza vede k řadě závažných onemocnění např. infarktu myokardu, či cévní mozkové příhodě a je nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích. Patogeneze aterosklerózy souvisí s oxidačním stresem. Oxidací modifikovaný LDL-cholesterol se spolu s makrofágy podílí na tvorbě tzv. pěnové buňky, která je základní fází aterosklerózy<sup>5</sup>.

e) Cukrovka (Diabetes mellitus I a II)

Chronické metabolické onemocnění provázené poruchou metabolismu sacharidů, lipidů a proteinů. K příznakům choroby patří polyurie (zvýšené močení), polydipsie (zvýšená žízeň), únava, hubnutí, špatné hojení ran doprovázené poškozením řady orgánů, jako očí, ledvin, nervového a cévního systému. Hyperglykemie je endogenní příčinou tvorby volných radikálů, které se zpětně podílejí na poškození lipidů, bílkovin a nukleových kyselin v organismu<sup>6</sup>.

f) Nádorová onemocnění

Imunitní systém ztrácí kontrolu nad tvorbou buněk, a tak dochází k nekontrolovanému množení nádorových buněk a k rozvinutí nádorového procesu. Benigní (nezhoubné) nádory rostou a utlačují okolní tkáň, ale nejsou schopny tvořit metastázy. Maligní (zhoubné) nádory dokážou šířit po těle nádorové buňky, které

se usazují v různých orgánech a tvoří sekundární nádorová ložiska (metastázy). Nádorový genotyp začíná změnami v chromozomech, které mohou být mimo jiné taky vyvolány oxidačním stresem <sup>7</sup>.

Civilizační choroby jsou způsobené zejména nezdravým životním stylem (nedostatek pohybu, nedostatek odpočinku, zvýšený stres, špatné stravovací návyky, kouření, konzumace alkoholu), zhoršením kvality životního prostředí (znečištění ovzduší průmyslovými exhaláty, elektromagnetický smog) a snížením kvality potravin (průmyslová produkce kaloricky bohatých potravin obsahujících často syntetická barviva, konzervanty, emulgátory atd.).

Počet diagnostikovaných zhoubných nádorů v ČR stoupá ročně až o 6 %. Délka života se sice prodloužila u mužů o 7,5 a u žen o 5,5 roku, tomu však neodpovídá shodné prodloužení života prožitého ve zdraví. Zdravá populace je motorem ekonomického růstu. Nárůst civilizačních nemocí zvyšuje náklady zdravotního a sociálního systému. Ani silné ekonomiky si nemohou dovolit dlouhodobě hradit tyto rostoucí výdaje. Cestou z této situace nebude zvýšení efektivity kauzálního a symptomatického léčení (nová léčiva, léčebné postupy, přístrojové vybavení atd.), ale prevence, která eliminuje příčiny vzniku civilizačních chorob. Účinná prevence však musí zahrnovat nejen zlepšení životního prostředí ale i lepší životosprávu a zdravý životní styl celé populace <sup>8</sup>.

Dostatek antioxidantů v potravě pomáhá snížit riziko oxidačního stresu. Vysoký obsah látek s antioxidačními vlastnostmi obsahuje čerstvá, tepelně a chemicky neupravená strava, především zelenina, ovoce, ořechy, obilniny. Ovoce a zelenina rostoucí na slunci se brání před volnými radikály z UV paprsků syntézou vyššího množství antioxidantů, ale vliv na jejich tvorbu má i složení půdy, roční období atd. Jejich účinek v našem těle závisí na dostatečném a pravidelném příjmu. Je snaha dávat přednost přirozeným zdrojům před syntetickými, nejen pro jejich vyšší účinnost, ale také proto, že příliš vysoké dávky syntetických antioxidantů mohou způsobit řadu vedlejších účinků, dokonce působit prooxidačně <sup>9</sup>.

Hledání účinných a bezpečných přírodních antioxidantů je proto v centru pozornosti mnoha výzkumných skupin. Jednou z těchto výzkumných skupin je také pracovní skupina ADINACO (**A**lzheimer **D**iseases and **N**atural **C**ompounds) Farmaceutické fakulty UK v Hradci

Králové, vedená prof. ing. Lucií Cahlíkovou, Ph.D. Pracovní skupina ADINACO se zabývá širším studiem látek izolovaných z rostlin a hub, z hlediska jejich účinku na patofyziologické procesy ovlivňující rozvoj AD. Provádí izolace a identifikace látek, stanovení biologické aktivity na skupiny enzymů v CNS. Ve spolupráci s jinými pracovišti skupina připravuje parciální deriváty těchto látek a také se zabývá studiem možnost použití látek v prevenci Alzheimerovy choroby v podobě doplňků stravy<sup>10, 11</sup>.



## II. CÍL PRÁCE

Tato práce je příspěvkem k fytochemickému výzkumu nati rozchodnice růžové, *Rhodiola rosea* L., který byl zahájen na katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Práce zahrnuje:

- 1) Přípravu sumárního extraktu z nati rozchodnice růžové v preparativním měřítku,
- 2) Přípravu několika typů výtřepků různými organickými rozpouštědly,
- 3) Izolaci hlavních obsahových látek,
- 4) Stanovení antioxidační aktivity (DPPH) a obsahu izolovaných látek,
- 5) Zhodnocení experimentů.

### III. TEORETICKÁ ČÁST

#### 1 Volné radikály

##### 1.1 Základní pojmy a definice

Teorii volných radikálů navrhl a rozpracoval Denham Harman v letech 1956–1987. Výzkum minulých čtyřiceti let ukazuje, že vědci původně opomíjená a často zpochybňovaná skupina volných radikálů hraje v biologických systémech nemalou roli. Volné radikály jsou jednou z příčin vzniku některých nemocí a taky primární příčinou fyziologického stárnutí. Jedním z důvodů, proč se volné radikály nacházely v pozadí zájmu, je jejich velká nestálost v prostředí a velmi krátký biologický poločas (Tab. 1), který dříve dostupnými metodami znemožňoval jejich zkoumání<sup>12</sup>.

**Tab. 1** Biologický poločas rozpadu některých RONS<sup>12</sup>

RONS	Vzorec	Biologický poločas
Superoxid	$O_2^{\bullet-}$	$1 \times 10^{-6}$ s
Hydroxylový radikál	$OH^{\bullet}$	$1 \times 10^{-9}$ s
Peroxid vodíku	$H_2O_2$	stabilní
Peroxy	$ROO^{\bullet}$	1-10 s
Hydroperoxid	$ROOH$	stabilní
Singletový kyslík	$^1O_2$	$1 \times 10^{-6}$ s
Ozon	$O_3$	1-10 s
Oxid dusnatý	$NO^{\bullet}$	1-10 s
Peroxyinitrit	$ONOO^-$	$1 \times 10^{-3}$
Oxid dusičitý	$NO_2^{\bullet}$	1-10 s

Volné radikály (VR) jsou atomy, molekuly, či ionty schopné přinejmenším krátkodobé samostatné existence, které mají ve svém elektronovém obalu jeden nepárový elektron, případně více nepárových elektronů. Snaží se proto získat další elektron a doplnit si tak elektronový pár do stabilní konfigurace. Z toho pramení jejich velká reaktivita a omezená doba existence. Reagují nejen s dalšími VR, ale i s intaktními molekulami (které nepárový elektron nemají) a tím vytvářejí další volný radikál. Tento děj má tendenci pokračovat formou řetězové reakce, která se šíří z buňky do svého okolí. VR mohou napadat lipidy v lipoproteinech a buněčných membránách, nukleové kyseliny, sacharidy i bílkoviny včetně enzymů, což může vést k těžkému poškození tkání a celých orgánů. Pro organismus jsou

nejdůležitější volné radikály kyslíku a dusíku. Dalšími přeměnami VR mohou vznikat jiné reaktivní látky, které však již nemají nepárový elektron (např. peroxid vodíku, kyselina chlorná). Tyto látky se spolu s volnými radikály označují společným názvem reaktivní formy kyslíku ROS (reactive oxygen species) či reaktivní formy dusíku RNS (reactive nitrogen species). Někdy se užívá souhrnné označení RONS<sup>13</sup>. Značnou úlohu v radikálových reakcích mají i přechodné (tranzitní) kovy, které mohou být donory i akceptory elektronu, a tím i účinnými iniciátory vzniku volných radikálů. V lidském organismu se uplatňují především ionty železa a mědi<sup>14</sup>.

Vznik VR<sup>15</sup>.

- |  |   |
|--|---|
| a) Homolytickým štěpením kovalentní chemické vazby | $R - H \rightarrow R^{\bullet} + H^{\bullet}$ |
| b) Oxidací výchozí látky                           | $O_2^{2-} - e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$  |
| c) Redukcí výchozí látky                           | $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$       |

Mnoho VR je nepřetržitě produkováno buňkami organismu v průběhu fyziologických nebo patologických procesů a hladina VR se zvyšuje přísunem z exogenních zdrojů.

### 1.1.1 Reakce volných radikálů<sup>16, 17</sup>

Průběh reakce VR v organismu rozdělujeme obvykle na tři fáze. Některá literatura uvádí dělení na čtyři fáze, kdy mezi propagací a terminací řadí další fázi – inhibici<sup>18</sup>.

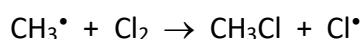
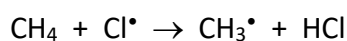
#### d) Iniclace

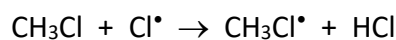
V této fázi dochází ke vzniku VR ze stabilních nepolárních sloučenin. Homolytická vazba je rozštěpena pomocí vhodného iniciátoru.



#### e) Propagace volných radikálů

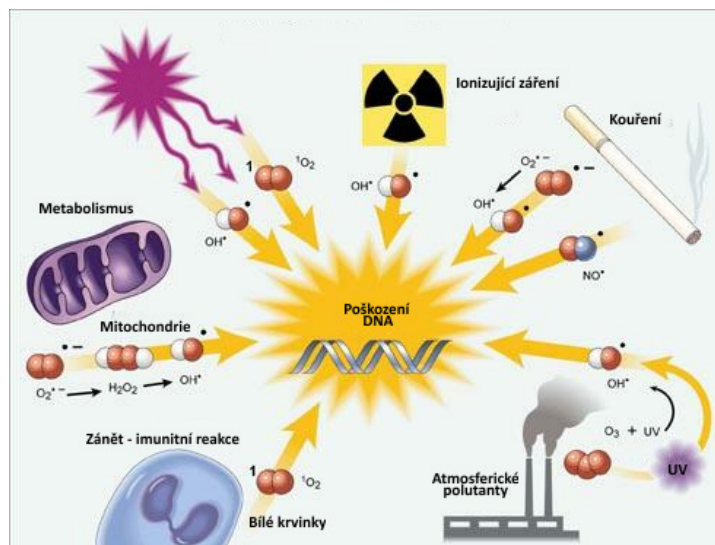
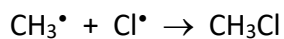
V této fázi velmi nestabilní VR, vytvořený v prvním iniciačním kroku, napadá další stabilní molekuly a vytváří z nich nové radikály. Vzájemné reakce se řetěží za vzniku nových VR. Dochází k množení VR, kde iniciátorem jsou již vytvořené VR z předchozích reakcí.





f) Terminace procesu

Zánik VR vstupem nepárových elektronů do chemické vazby.



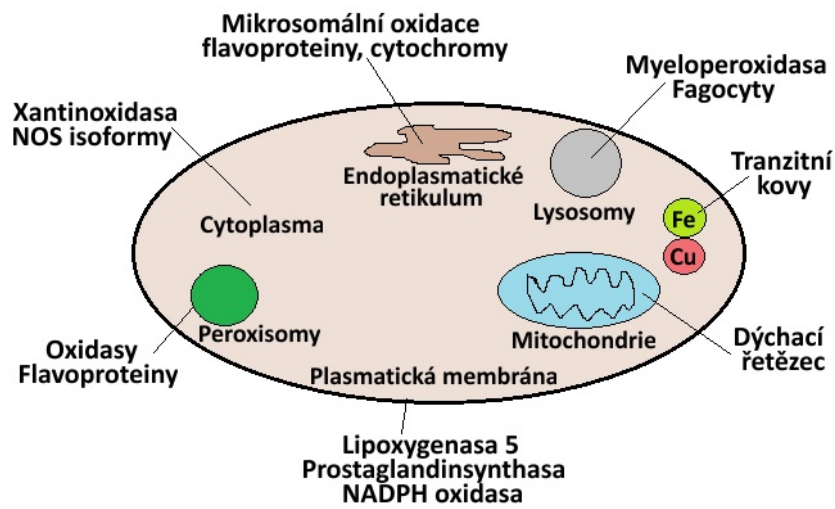
Obr. 1 Vznik volných radikálů <sup>19</sup>

### 1.1.2 Zdroje volných radikálů (Obr. 1) <sup>18</sup>

#### 1.1.2.1 Endogenní (Obr. 2)

- Průnik elektronů z respiračního řetězce v mitochondriích
- Vznik kyseliny močové pomocí enzymu xantinoxidasy
- NADPH – oxidasový systém (fagocyty, nefagocytární buňky)
- Některé enzymy (xantinoxidáza, cyklooxygenasa, lipoxygenasa)
- Vznik methemoglobinu
- Syntéza prostaglandinů
- Zvýšený metabolismus estrogenů
- Reperfuze po předchozí ischemii

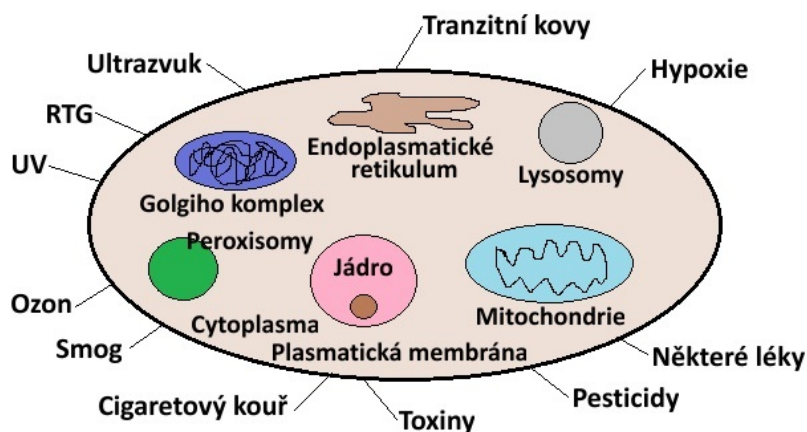
- i) Autooxidace thiolů
- j) Hyperglykemie.



**Obr. 2** Endogenní zdroje RONS <sup>19</sup>

### 1.1.2.2 Exogenní <sup>20</sup> (Obr. 3)

- a) Ionizující záření (UV záření,  $\gamma$ -záření, rentgenové záření), elektromagnetické záření
- b) Atmosférické polutanty
- c) Kouření
- d) Některá léčiva (anestetika, barbituráty atd.)
- e) Vysoký kalorický příjem
- f) Intoxikace (potravin, alkohol)

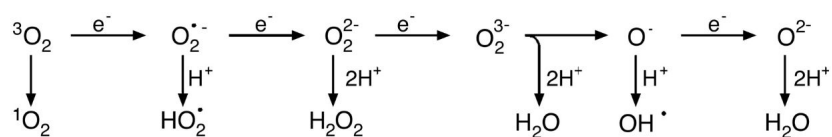


Obr. 3 Exogenní zdroje RONS <sup>19</sup>

## 1.2 Reaktivní formy kyslíku <sup>14</sup> (Tab. 2, Obr. 4)

Tab. 2 Reaktivní formy kyslíku <sup>15, 21</sup> (upraveno)

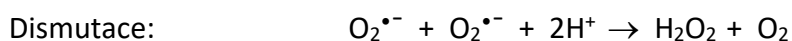
Reaktivní formy kyslíku ROS			
Volné radikály		Látky neradikálové povahy	
Superoxid	$O_2^{\cdot-}$	Peroxid vodíku	$H_2O_2$
Hydroxylový radikál	$HO^{\cdot}$	Ozon	$O_3$
Alkoxylový radikál	$RO^{\cdot}$	Singletový kyslík	$^1O_2$
Peroxylový radikál	$ROO^{\cdot}$	Kyselina chlorná	$HOCl$
Hydroperoxyl	$HO_2^{\cdot}$		



Obr. 4 Generování různých ROS postupnou redukcí z tripletového kyslíku <sup>22</sup>

### 1.2.1 Superoxid $O_2^{\bullet-}$

Vzniká redukcí v komplexech mitochondriálního dýchacího řetězce z koenzymů ubisemichinonu a semiflavinu, v endoplazmatickém retikulu vzniká z oxykomplexu cytochromu P450 a v leukocytech a v makrofázích je produkován NADPH oxidasou, obsaženou v cytoplasmatické membráně jako součást baktericidního ochranného systému. Má mnohem menší reaktivitu vůči látkám neradikálové povahy než  $HO^{\bullet}$ . Reaguje relativně rychle s jinými radikály. Působí jako oxidační i redukční činidlo (redukce cytochromu c, oxidace askorbátu). Přímé poškození biomolekul je vysoce selektivní a obvykle zahrnuje reakci s jinými radikály. Nepřímé poškození biomolekul usnadňuje vznik  $HO^{\bullet}$  a tvorbu peroxyinitritu po reakci s  $NO^{\bullet}$  <sup>15</sup>.



### 1.2.2 Hydroxylový radikál $OH^{\bullet}$

Nejreaktivnější radikál. Reaguje vysokou rychlostí se všemi molekulami přítomnými v organismu. Je to extrémně silné oxidační činidlo. Z důvodů velké nestability nedifunduje do okolí a v podstatě všechny reakce probíhají v místě jeho vzniku.

Vznik v organismu:

- a) Fentonova reakce, Haber-Weissova reakce
- b) Homolytickým štěpením vazby O-O v  $H_2O_2$  po ozáření UV světlem
- c) Ionizačním zářením
- d) Reakcí  $HOCl$  s  $O_2^{\bullet-}$
- e) Ultrazvukem při lithotrypsii (rozrušování ledvinových kamenů rázovou vlnou) <sup>23</sup>

### 1.2.3 Alkoxylový a peroxylový radikál $RO^{\bullet}$ , $ROO^{\bullet}$

Jsou to velmi účinná oxidační činidla. Jsou schopna odnímat  $H^{\bullet}$  z jiných biomolekul (lipoperoxidace).  $RO^{\bullet}$  se v organismu rychle přeměňuje na jiné typy radikálů.

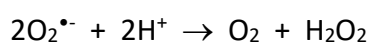
Vznik v organismu:

- a) Při lipoperoxidaci se tvoří  $RO_2^{\bullet}$ .

- b) Rozkladem organických hydroperoxidů (ROOH) účinkem tepla, UV zářením, nebo při setkání s ionty přechodných kovů <sup>23</sup>.

#### 1.2.4 Peroxid vodíku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Peroxid vodíku vzniká ve tkáni hlavně dismutací superoxidu nebo je tvořen také přímo působením oxidas, jako je monoaminoxidasa, glutathionoxidasa a xantinoxidasa. Je velmi málo reaktivní, ve vysokých koncentracích je cytotoxický. Při rozkladu katalyzovaném Cu/Fe poskytuje reaktivnější radikály <sup>24</sup>.



#### 1.2.5 Ozon O<sub>3</sub>

Molekula tvořená třemi atomy kyslíku je nestabilní. Stratosférický ozon brání pronikání škodlivého UV záření k zemskému povrchu. Spalováním fosilních paliv se v troposféře tvoří ozon, který působí škodlivě na živé organismy (poškozuje pokožku, sítnici oka a dýchací orgány) <sup>14, 15</sup>.

#### 1.2.6 Singletový kyslík <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

Je to molekulový O<sub>2</sub> se spárovanými spiny. Odstraněním spinové restrikce je reaktivnější než běžný O<sub>2</sub>. Vzniká při některých fotochemických reakcích (léčba novorozenecké žloutenky, psoriázy, fotodynamická terapie nádorů) a při znečištění atmosféry (NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, aj.). Způsobuje mutagenезi, peroxidaci lipidů a fotooxidaci aminokyselin.

Interakcí a chemickou reakcí s jinými molekulami vznikají hydroperoxydy a endoperoxydy z látek obsahujících jednu dvojnou vazbu, nebo konjugovanou dvojnou vazbu, či karbonylové sloučeniny z tryptofanu <sup>14, 20</sup>.

#### 1.2.7 Kyselina chlorná HOCl <sup>15</sup>

Je produkována enzymem myeloperoxidasou v aktivovaných neutrofilech. Je silným oxidantem, rozkládá se na Cl<sub>2</sub>.



Poškození biomolekul:

- a) Chlorace DNA bází (hlavně pyrimidinů).
- b) Oxidace thiolů, askorbátu a NAD(P)H.

Poškození proteinů:

- a) Při lipoperoxidaci se tvoří  $RO_2^\bullet$
- b) Převádí Met na Met sulfoxid (trombomodulin,  $\alpha_1$ -antiproteinasa)
- c) Chlorace Tyr za vzniku 3-chlorotyrosinu
- d) Poškození NH-skupin membránových proteinů

### 1.3 Reaktivní formy dusíku (Tab. 3)

**Tab. 3** Reaktivní formy dusíku <sup>15, 21</sup> (upraveno)

Reaktivní formy dusíku RNS			
Volné radikály		Látky neradikálové povahy	
Oxid dusnatý	$NO^\bullet$	Nitrosyl	$NO^+$
Oxid dusičitý	$NO_2^\bullet$	Nitroxid	NO
		Oxid dusitý	$N_2O_3$
		Kyselina dusitá	$HNO_2$
		Peroxyinitrit	ONOO
		Oxid dusičitý	$N_2O_4$
		Alkylperoxyinitrit	ROONO

#### 1.3.1 Oxid dusnatý $NO^\bullet$ <sup>15</sup>

Oxid dusnatý má v organismu mnoho důležitých funkcí. Vykazuje vasodilatační účinek a tím reguluje krevní tlak. Působí jako neurotransmitter v CNS a VNS. Podílí se na baktericidním účinku, produkují ho aktivované makrofágy při imunitních reakcích v organismu. Za určitých podmínek je extrémně toxický (tvorba peroxyinitritu ONOO<sup>-</sup>, nitrosothiolů RSNO a dalších RNS). Je rozpustný jak hydrofilním, tak hydrofobním prostředí a může procházet plazmatickou membránou i cytoplazmou.

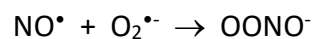


Zdroje NO• v organismu:

- a) Z terminálního atomu N argininu v přítomnosti O<sub>2</sub>.
- b) Reakce katalyzované synthasami oxidu dusnatého –NOS (I-mozková, II-makrofágová, III-endotelová).

### 1.3.2 Peroxynitrit ONOO<sup>-</sup> <sup>15, 23</sup>

Je to patologicky nejvýznamnější metabolit oxidu dusnatého. Vzniká reakcí oxidu dusnatého se superoxidem. Peroxynitrit je silné oxidační agens.

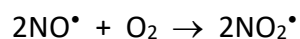


Toxické účinky:

- a) Deplece (snížení obsahu) –SH skupin a dalších antioxidantů.
- b) Oxidace a nitrace lipidů.
- c) Zlomy v DNA, nitrace a deaminace DNA bází (guanin).
- d) Inaktivace enzymů.
- e) Oxidace Met na sulfoxid.

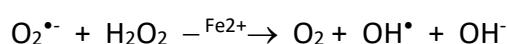
### 1.3.3 Oxid dusičitý NO<sub>2</sub>•

Je to silně oxidační radikál. Iniciuje a podporuje peroxidaci lipidů, včetně LDL, což vede ke zvýšení nitrotyrosinové formace <sup>15</sup>.



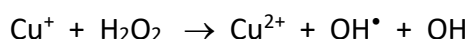
## 1.4 Atomy přechodných kovů jako radikály <sup>20</sup>

Jako radikály se mohou chovat i atomy přechodných kovů, jako např. Fe, Cu, Ni, Mn, Ti a další. Tyto kovy mají neúplně obsazenou předposlední slupku elektronového obalu, proto snadno reagují s ROS. K nejdůležitějším reakcím přechodného kovu s ROS patří Haber-Weissova reakce:



Fentonova reakce:





Ion přechodného kovu (obvykle Fe, nebo Cu) zde vstupuje jako katalyzátor a produktem je vysoce toxický hydroxylový radikál  $\text{HO}^\bullet$ . I když mědi je v organismu mnohem méně než železa, reaguje s peroxidem vodíku mnohem rychleji.

### 1.5 Fyziologická funkce volných radikálů v organismu <sup>15</sup>

VR mají ve zdravém organismu svůj nezastupitelný fyziologický význam, účastní se řady životně důležitých dějů, např. imunitních reakcí, zaujímají jistou signální funkci, dále jsou přítomny v dýchacím řetězci na enzymatickém komplexu cytochromoxidasy, kde se transformuje energie z přijatých živin do energie ve formě ATP.

Monooxygenasy využívají hydroxylový radikál k hydroxylačním reakcím např. při biosyntéze cholesterolu a žlučových kyselin nebo při detoxikaci různých xenobiotik. Fagocyty využívají VR k zabíjení mikroorganismů a nádorových buněk, VR mají význam při oplodnění vajíčka spermií, plní funkci mediátorů zánětlivé reakce.

#### 1.5.1 Buněčná signalizace <sup>25, 26</sup>

Buněčná signalizace zajišťuje koordinaci fyziologických pochodů v organismu. Buňky jsou geneticky naprogramovány tak, že mohou na signální látky reagovat selektivně, podle vývojového stadia organismu a typu buněk. Přenos signálu od signální molekuly do jádra je zprostředkován mnohastupňovým signalizačním systémem.

VR a jejich metabolity nalézají uplatnění také v řadě signálních dějů. Koncepty o mechanismech působení volných radikálů jako signálních molekul jsou stále diskutovány a nejsou ještě zcela objasněny. Antioxidační ochranné systémy nikdy neodstraňují ROS/RNS zcela, ale udržují jejich hladiny v určitých mezích. Některé buněčné kultury reagují na snížené hodnoty ROS zvýšenou proliferací, a naopak vyšší hodnoty mají inhibiční až cytotoxický efekt.

Redoxní změny také regulují aktivity transkripčních faktorů, například AP-1 a NF- $\kappa$ B. Vystavení určitých buněčných typů působení nízkých hladin ROS (zvláště  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) způsobuje aktivaci proteinkinasy (např. PKC). Jako důležitý regulační mechanismus zřejmě působí také vzájemné interakce mezi ROS a RNS. Zatímco  $\text{H}_2\text{O}_2$  aktivuje NF- $\kappa$ B,  $\text{NO}^\bullet$  jej inhibuje.

V cévním endotelu působí kyslíkové a dusíkové radikály také antagonisticky,  $O_2^{\bullet-}$  způsobuje cévní vazokonstrikci, naopak pod vlivem  $NO^{\bullet}$  hladký sval relaxuje. Rovnováha  $O_2^{\bullet-}/NO^{\bullet}$  je tedy pravděpodobně jedním z fyziologických mechanismů pro regulaci krevního tlaku.

### 1.5.2 Imunitní ochrana <sup>25</sup>

Neutrofilní leukocyty a makrofágy využívají reaktivní formy kyslíku k odstraňování zbytků mrtvých buněk a k zabíjení bakterií. Na jejich plazmatické membráně se nachází enzym NADPH-oxidasa, obsahující Flavocytochrom B 558. Redukovaného nikotinamid-adenindinukleotidfosfátu (NADPH) je využito jako substrátu pro přenos elektronů na kyslík za vzniku superoxidu a následně peroxidu vodíku. Ve fagosomu se uvolňují ionty železa pro Fentonovu reakci a tvoří se hydroxylový radikál. Celá reakce se nazývá respirační vzplanutí (oxidační vzplanutí), jelikož dochází k prudkému zvýšení spotřeby kyslíku v buňce, nikoli však činností mitochondrií.

V případě polymorfonukleárních buněk do systému vstupuje ještě myeloperoxidasa (MPO). Myeloperoxidasa je enzymem pouze neutrofilů, obsahujícím hemovou skupinu. Vykazuje nespecifickou peroxidasovou aktivitu a je schopna oxidovat celou řadu substrátů. V přítomnosti  $H_2O_2$  a  $Cl^-$  oxiduje MPO tyto chloridové ionty a vzniká kyselina chlorná  $HClO$ . Kyselina chlorná má silný antibakteriální účinek *in vitro* avšak panovaly pochybnosti o stejném účinku *in vivo* <sup>27</sup>. Bylo totiž zjištěno, že pacienti, trpící vrozeným deficitem neutrofilové myeloperoxidasy, vykazovaly pouze nepatrné snížení rezistence vůči bakteriální infekci, z čehož vyplývá, že při antibakteriální ochraně je pro organizmus mnohem důležitější systém respiračního vzplanutí. Navíc je kyselina chlorná schopna reagovat s  $O_2^{\bullet-}$  nebo s  $H_2O_2$  za vzniku  $OH^{\bullet}$  resp.  $^1O_2$ , tato reakce je však při pH 7,4 velmi pomalá a pravděpodobně nemá pro fagocyty velký význam.

### 1.5.3 Volné radikály jako prostředek oxidas a oxygenas <sup>15</sup>

Současné formy života potřebují na pokrytí svých energetických výdajů velké množství energie. Tu lze uvolnit pouze přenosem elektronů ze živin na kyslík. Funkčně posledním enzymem dýchacího řetězce ve vnitřní mitochondriální membráně je cytochromoxidasa, která přijímá elektrony pocházející ze živin a předává je na molekulární kyslík. Redukuje ho

čtyřmi elektrony za vzniku dvou molekul vody, přičemž se uvolní energie pro syntézu ATP. Redukce kyslíku na aktivním centru enzymu probíhá ve čtyřech stupních.

Podstatné je, že toxické meziproducty ( $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), zůstávají navázány na enzym. Mimo něj by ihned tvořily reaktivní metabolity a poškozovaly by okolní biomolekuly. Monooxygenasy podobným způsobem aktivují kyslík v endoplazmatickém retikulu nebo v mitochondriích nadledvin. V tomto případě je kyslík redukován třemi elektrony na úroveň hydroxylového radikálu, který je použit k hydroxylaci řady endogenních a exogenních látek, včetně léků (aromatické uhlovodíky, aminy, steroidy ad.).

Tato hydroxylace je významnou reakcí při syntéze cholesterolu a při jeho přeměně na žlučové kyseliny. Xenobiotika se po hydroxylaci mohou konjugovat s hydrofilními látkami, stanou se rozpustnějšími ve vodě a snadněji se vyloučí z těla.

## 1.6 Oxidační stres <sup>28, 30</sup>

Pokud dojde k narušení rovnováhy mezi tvořícími se reaktivními kyslíkovými radikály (ROS) spolu s reaktivními dusíkovými radikály (RNS) a obranným antioxidačním systémem organismu, a pokud jsou reaktivní částice v převaze a antioxidační systém organismu je nedokáže odstraňovat, vzniká oxidační stres.

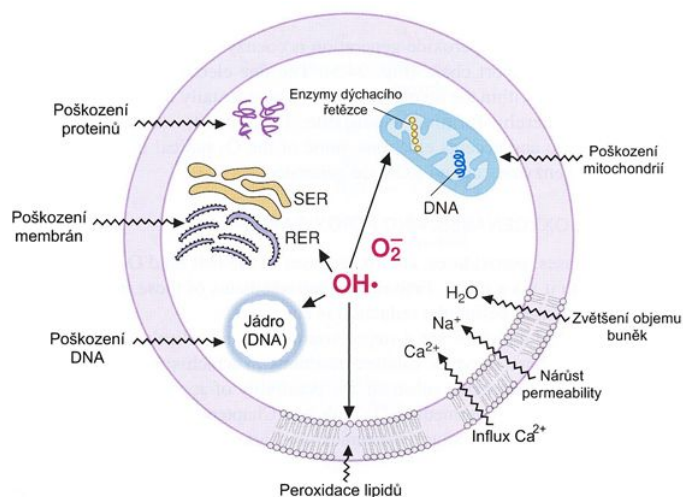
Oxidační stres je definován jako porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním RONS z organismu. Tato situace může být způsobena nadměrným příjmem RONS z vnějšího prostředí (např. cigaretový kouř, znečištěné ovzduší ad.), účinkem vnějších iniciátorů vzniku RONS (např. UV záření), nebo již probíhajícími patologickými procesy v organismu. Dále pak narušením tvorby a distribuce antioxidantů v organismu, nebo jejich kombinací.

Primárně působí volné radikály na biologicky důležité makromolekuly, zejména na bílkoviny, tuky a nukleové kyseliny. Reakce volných radikálů jsou doprovázeny vznikem nových vazeb uvnitř makromolekul, mezi jednotlivými řetězci makromolekul i mezi makromolekulami a sousedícími (makro)molekulami.

Oxidační stres může způsobit poškození buněčných struktur, a to především lipidů, ztrátu enzymatické aktivity a funkce proteinů, ztrátu informací u DNA (vznik nádorových buněk) a narušit správnou funkci kyseliny močové v organismu. Dalším důsledkem pak

bývají změny vlastností buněčných membrán, které mohou vést k poškození a zániku buněk a k poškození tkání a orgánů (Obr. 5).

Z uvedeného vyplývá, že oxidační stres způsobuje vznik a patogenezi onemocnění a podílí se na procesu stárnutí buněk organismu <sup>20</sup>.



**Obr. 5** Oxidační poškození <sup>29</sup>

### 1.6.1 Oxidační poškození lipidů <sup>30, 31</sup>

Lipidy jsou především důležitými stavebními složkami buněčných struktur, zejména membrán a mají ještě další biologické funkce. Lipidová peroxidace je proces, při kterém jsou polynenasycené mastné kyseliny lipidů poškozovány působením volných radikálů a kyslíku, za vzniku hydroperoxidů. V iniciaci peroxidace se připisuje hlavní úloha působení hydroxylovému radikálu, iniciaci však mohou vyvolat i radikály jiné. Z hydroperoxidů pak dalšími reakcemi vznikají následné sekundární produkty.

Lipoperoxidace je velmi destruktivní proces. Jednak přímo poškozuje fosfolipidy membrán, navíc však vznikající sekundární metabolity jsou velmi reaktivní a narušují strukturu dalších biomolekul. Toxické jsou především některé aldehydy (malondialdehyd, 4-hydroxynonenal), které se navazují na volné aminoskupiny proteinů. V důsledku toho se proteiny agregují, síťují a stávají se citlivější k proteolytické degradaci. Mění se fluidita membrán, zvyšuje se propustnost pro ionty, mění se membránový potenciál a dochází k lýze buněk.

### 1.6.2 Oxidační poškození proteinů<sup>31</sup>

Významným cílem reaktivních radikálů RONS jsou také proteiny. Oxidace aminokyselin v proteinech vede k nevratným fyziologickým změnám v proteinech samotných.

Methionin je účinkem ROS například oxidován na methioninsulfoxid, cystein na kyselinu cysteinovou, tryptofan na kynurenin. Při oxidaci prolinu dojde k otevření pyrrolidinového kruhu a k přerušení peptidového řetězce. V tomto případě nenastane start řetězové reakce jako při lipoperoxidaci, poškození se však znásobí tím, že proteiny ztratí svou enzymovou, signální nebo transportní funkci.

Řada aminokyselin je hydroxylována hydroxylovým radikálem a nitrována peroxyinitrem (tryptofan, fenylalanin, tyrosin). S většinou biomolekul peroxyinitrit reaguje pomalu, je selektivním oxidantem. V proteinech tento oxidant mění tyrosin na nitrotyrosin, který je velmi stálý.

S membránovými proteiny a proteiny lipoproteinových částic (LDL, VLDL) reagují kromě jednoduchých RONS též alkoxylové a peroxylové radikály lipidů ( $LO^*$ ,  $LOO^*$ ) vznikající při lipoperoxidaci. Další produkty lipoperoxidace – reaktivní aldehydy (malondialdehyd, 4-hydroxynonenal) se kovalentně váží na  $\epsilon$ - $NH_2$  lysinu. Následkem toho proteiny agregují, síťují, a stanou se citlivějšími k proteolytické degradaci.

Proteiny jsou poškozovány též železem koordinovaným na jejich strukturu. Lysylový zbytek v proteinu ( $R-CH_2-NH_2$ ) slouží jako jeden z mnoha ligandů schopných vázat  $Fe(II)$ , také katalyzuje Fentonovu reakci, při které vzniká z peroxidu vodíku hydroxylový radikál ( $HO^*$ ). Ten v místě svého vzniku vytvoří z  $R-CH_2-NH_2$  alkylový radikál  $R^*CH-NH_2$ . Přesun elektronu na  $Fe(III)$  regeneruje  $Fe(II)$  a z radikálu vznikne skupina  $R-CH=NH$ , která se spontánně hydrolyzuje na  $R-CHO$  a  $NH_3$ . Modifikovaný protein je substrátem řady nespecifických proteáz, které ho odstraní.

I řada dalších reakcí přeměňuje aminokyseliny proteinů na karbonylové deriváty; 4-hydroxynonenal (4-HNE) reaguje s histidinem, lysinem a thiolovými skupinami, čímž vnáší do molekuly proteinu karbonylové skupiny ( $-CO-$ ). Ty vznikají též při glykaci proteinů. Stupeň karbonylace proteinů lze stanovit a použít jako ukazatel oxidačního poškození těchto biomolekul. Následky uvedených reakcí jsou pro funkci buněk velmi závažné.

Enzymy mění svoji aktivitu, pumpy neudrží iontovou homeostázu buňky. V cytosolu se hromadí  $\text{Ca}^{2+}$ , čímž se aktivují proteasy a fosfolipasy. Modifikace aminokyselin vedou ke vzniku nových antigenních determinantů a k autoimunitním reakcím.

### 1.6.3 Oxidační poškození DNA <sup>32</sup>

ROS vznikající v průběhu aerobního metabolismu jsou hlavní příčinou genetického poškození DNA, které, pokud není opraveno, může vyvolat různé mutace a způsobit vyšší výskyt neoplastických procesů, či vést k předčasnému stárnutí.

Oxidační poškození DNA:	Důsledek:
a) Štěpení cukerného kruhu	→ Mutace.
b) Modifikace bází	→ Translační chyby.
c) Zlomy řetězce (SSB, DSB zlomy)	→ Inhibice proteosyntézy.

Oxidační poškození DNA může být způsobeno endogenními či exogenními zdroji. Mezi endogenní vlivy se řadí nestabilita DNA (např. depurinace), spontánní chyby v DNA během replikace a oprav, RONS a produkty peroxidace lipidů. Exogenní zdroje přispívající k poškození jsou např. ionizující a UV záření, řada genotoxických chemikálií, produkty pyrolýzy v potravě, nečistoty v ovzduší a ve vodě.

Rozsah endogenního poškození v důsledku ROS může být obrovský, jelikož každá lidská buňka metabolizuje přibližně  $10^{12}$  molekul kyslíku za den (1 % z kyslíkového metabolismu), což přispívá k tvorbě ROS. Bylo odhadnuto, že za den je v lidské buňce poškozeno přibližně 20 000 nukleotidů v DNA. Vyšší úroveň oxidativního poškození byla prokázána v případech deficitu stopových prvků v organismu <sup>15, 33, 34</sup>.



## 2 Antioxidanty <sup>28, 29, 35</sup>

Antioxidanty jsou definovány jako látky, které při působení v nízkých koncentracích významně inhibují, nebo zpomalují oxidační destrukci ostatních látek (resp. tkání). V posledních letech jsou antioxidačně účinné látky podrobeny velkému zájmu z důvodů jejich léčebného (nebo potravinářského) využití. Je to dáno spojováním vývoje řady lidských nemocí s oxidačním stresem. Volné radikály (resp. RONS) hrají důležitou úlohu např. v patogenezi stárnutí, různých kardiovaskulárních chorob, u diabetes melitus II typu, nebo u zhoubného bujení.

Mezi základní mechanismy antioxidačního působení se řadí zhášení volných radikálů, chelatace přechodných kovů, schopnost inhibovat prooxidační enzymy a ochrana stávajícího antioxidačního systému před vyčerpáním.

Protiváhu k volným radikálům v organismu tvoří antioxidanty. Jsou to látky, jejichž molekuly dokážou eliminovat aktivitu volných radikálů, inhibují, nebo významně zpomalují oxidační destrukci buněk organismu. Antioxidanty nepůsobí širokospektrálně, ale různé typy antioxidantů působí na různé typy volných radikálů v různých částech buněk (Tab. 4). Některé antioxidanty si vytváří naše tělo samo (enzymy, koenzymy), nebo mohou být syntetického, či přírodního původu.

Antioxidanty se rozumí látky, které neutralizují VR (RONS), nebo jejich účinky. Antioxidantem můžeme nazvat jakoukoliv sloučeninu, která je schopna zpomalovat, nebo zabraňovat degeneraci, bránit poškození, nebo zničení buněk, způsobené oxidací. Antioxidanty působí tak, že převádějí VR na látky nereaktivní, nebo na látky méně reaktivní povahy.

Příroda vybavila každou buňku odpovídajícím obranným mechanismem proti škodlivým účinkům VR. Obranné mechanismy organismu jsou tvořeny enzymatickými a neenzymatickým systémy. Díky těmto mechanismům je v buňkách udržována redoxní rovnováha důležitá pro správné fungování proteinů <sup>15</sup>.

**Tab. 4** Detoxikační účinek některých antioxidantů <sup>25</sup> (upraveno)

Antioxidant	Detoxikační účinek
<b>Enzymové AO</b>	
Cytochromoxidasa	95-99% O <sub>2</sub> v buňkách
Superoxiddismutasa	Superoxid
Katalasa	Peroxid vodíku
Glutathion peroxidasa	Peroxid vodíku
Peroxidasy	Peroxidy
<b>Neenzymové, vysokomolekulární AO</b>	
Ceruloplasmin	Superoxid, oxiduje Fe <sup>2+</sup> , inaktivuje Cu <sup>2+</sup>
Albumin	Hydroperoxydy
Ferritin	Chelátor Fe <sup>3+</sup>
<b>Nízkomolekulární, hydrofilní AO</b>	
Glutathion	OH <sup>•</sup> , <sup>1</sup> O <sub>2</sub>
Kyselina askorbová	O <sup>•-</sup> , OH <sup>•</sup> , <sup>1</sup> O <sub>2</sub> , organické radikály
Kyselina močová	O <sup>•-</sup> , OH <sup>•</sup> , <sup>1</sup> O <sub>2</sub> , chelátor iontů kovů
Cystein	O <sup>•-</sup> , <sup>1</sup> O <sub>2</sub>
Bilirubin	Peroxylový radikál
<b>Nízkomolekulární, lipofilní AO</b>	
Tokoferoly	OH <sup>•</sup> , ROO <sup>•</sup>
Karotenoidy	OH <sup>•</sup> , <sup>1</sup> O <sub>2</sub>
Ubichinol (koenzym Q10)	Peroxylový radikál

## 2.1 Rozdělení antioxidantů <sup>34</sup>

Antioxidanty tvoří různorodou skupinu látek, kterou lze rozdělit podle různých kritérií, vlastností, nebo původu.

### 2.1.1 Podle ovlivnění tvorby VR

- a) Primární – brání vzniku nových ROS.

Jedná se o inhibitory NADPH-oxidasy, xantinoxidasy a chelatační látky atd. Dále do této skupiny patří bílkoviny vážící přechodné kovy, které mohou reakcí s peroxidem vodíku poskytovat hydroxylový radikál. Pak se sem řadí proteiny, regulující aktivitu enzymů tvořících radikály a některé další látky (např. allopurinol inhibuje xantinoxidasu a tím brání vzniku superoxidu) nebo enzymy rozkládající aktivní formy

kyslíku. Jedná se například o odstranění peroxidu vodíku katalasou nebo peroxidasou, které se tak již není schopen přeměnit na hydroxylový radikál za katalýzy přechodnými kovy.

b) Sekundární – vychytávají již vzniklé VR.

Jedná se o látky s redukujícím účinkem jako např. vitamín C, vitamín E, koenzymy ubichinol (koenzym Q<sub>10</sub>), glutathion aj., patřící do skupiny tzv. lapačů (trappers), které předávají radikálu elektron, a přitom se samy mění na celkem stabilní a bezpečnější radikál. Enzym superoxidodismutasa (SOD), patří do skupiny tzv. vychytávačů (scavengers), zháší superoxidový radikál a mění ho na méně toxický peroxid vodíku.  $\beta$ -Karoten, patřící do skupiny tzv. zhášečů (quenchers), zháší singletový kyslík.

c) Terciální – opravují, nebo eliminují molekuly a zajišťují opravu DNA poškozené působením ROS.

Lze jmenovat lipofilní enzymy např. fosfolipasu A<sub>2</sub> (PL A<sub>2</sub>), které odštěpují oxidačně poškozené vyšší mastné kyseliny (VMK), proteolytické enzymy rozkládající poškozené proteiny a reparační endonukleasy opravující poškozenou DNA.

### 2.1.2 Podle původu

- a) Endogenní – jsou tvořeny v organismu (redukováný glutation GSH, kyselina močová, albumin aj.).
- b) Exogenní – přicházejí do organismu zvenčí.

### 2.1.3 Podle rozpustnosti

- a) Hydrofilní – rozpustné ve vodě, poměrně rychle pronikají do organismu, obtížně pronikají přes buněčné membrány (kyselina askorbová, kyselina močová, vyskytují se v krevní plasmě a cytosolu buněk).
- b) Lipofilní – rozpustné v tucích, na místo účinku se dostávají pomaleji, působí v lipoproteinech a membránách (vitamin E, karotenoidy, koenzym Q<sub>10</sub>, estrogeny, výskyt v buněčných membránách, tukové tkáni a lipoproteinech krevní plasmy).

- c) Amfofilní – mají vlastnosti hydrofilních i lipofilních antioxidantů (kyselina lipoová, melatonin, flavonoidy).

#### **2.1.4 Podle lokalizace v relaci s buňkou**

- a) Extracelulární.
- b) Intracelulární – mají rozhodující význam v ochraně před VR.

#### **2.1.5 Podle velikosti molekuly**

- c) Vysokomolekulární (bílkoviny) – významnou roli mají enzymy, které se podílejí zejména na intracelulární antioxidační ochraně (transferrin, hemopexin, laktoferrin, ferritin, haptoglobin, albumin, celuroplasmin, chaperon).
- d) Nízkomolekulární – (vitamin C, vitamin E, vitamin A, vitaminy skupiny B (foláty), kartenoidy, selen, koenzym Q10, melatonin, kyselina močová, bilirubin, fenolové kyseliny).

#### **2.1.6 Podle mechanismu účinku**

- a) Katalyzátory (enzymy a určité metaloproteiny napodobující enzymy svým mechanismem účinku) – v reakci se nespotřebovávají.
- b) Chelatační látky – váží přechodné kovy (Fe, Cu, Ni aj.) a tím brání jejich uplatnění ve Fentonově reakci, stejně působí i některé bílkoviny (transferrin, haptoglobin, laktoferrin aj.).
- c) Inhibitory enzymů – kompetitivní inhibice, akompetitivní inhibice, nekompetitivní inhibice.
- d) Ostatní.

#### **2.1.7 Podle typu VR, na který působí a typu účinného antioxidantu**

- a) Superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ) – superoxiddismutasa (SOD), která mění superoxidový radikál na  $H_2O_2 + O_2$ .
- b) Hydroxylový radikál ( $HO^{\bullet}$ ) – albumin, cholesterol, mannitol, dopamin, probukol.
- c) Singletový kyslík ( $^1O_2$ ) – vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -karoten, histidin.

- d) Peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) – glutathion peroxidasa, katalasa.
- e) Oxid dusnatý (NO) – aminoguanidin.
- f) Kyselina chlorná (HClO) – sulfasalazin, histidin, methionin.

### 2.1.8 Podle typu na přirozené a syntetické

- a) Přirozené – v přírodě, nebo dané potravině se přirozeně vyskytující.
- b) Syntetické – uměle připravené.

#### 2.1.8.1 Přirozené antioxidanty

Přirozené antioxidanty jsou látky, které je člověk schopen vytvořit (enzymy) nebo přijímat v potravě a jež se zapojují do metabolismu. Vyskytují se v přírodě (ovoce, zelenina, lesní plody, byliny, ořechy, semena, zelený čaj atd.), v některých potravinách a nápojích (čokoláda, kakao, červené víno, pivo atd.) a jsou přítomny i v organismu ve formě enzymů. Dále je můžeme dělit:

- a) Hydrofilní antioxidanty.

Intracelulární:

Enzymové: superoxiddismutasa (SOD), katalasa (CAT).

Neenzymové: glutathion (GSH).

Extracelulární:

Vysokomolekulární: albumin a jiné bílkoviny obsahující SH skupiny, transferrin, hemopexin.

Nízkomolekulární: kyselina askorbová, kyselina močová, bilirubin, polyfenoly (rutin, cyanidin).

- b) Lipofilní (membránové) antioxidanty.

Mezi lipofilní nebo také membránové antioxidanty patří například vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol), karotenoidy ( $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, lykopen, lutein), koenzym  $Q_{10}$  estrogeny a některé další steroidy, v menší míře i vitamin A (retinol)<sup>36</sup>.

c) Amfofilní antioxidanty.

Jak hydrofilní, tak lipofilní části molekuly jsou obsaženy například v kyselině lipové či melatoninu a rovněž v určitých polyfenolových flavonoidech <sup>20</sup>.

### 2.1.8.2 Umělé antioxidanty

Do této skupiny patří antioxidanty vyráběné synteticky (např. butylhydroxyanisol, butylhydroxytoluen, dimethylsulfoxid, aj.). Mezi umělé antioxidanty lze řadit i látky, které byly pozměněny z přírodních antioxidantů. Jsou součástí některých léčiv, potravních doplňků (suplementů) a aditiv přidávaných do potravin (k zajištění trvanlivosti, k zabránění žluknutí tuků a olejů, k zabránění nežádoucích změn barvy atd.) Synteticky se však vyrábí i některé přírodní antioxidanty (např. vitamín C).

## 2.2 Metody stanovení antioxidační aktivity *in vitro* <sup>37</sup>

Klinické a epidemiologické studie prokazují korelaci mezi antioxidační aktivitou látek přijímaných v potravě a prevencí některých onemocnění např. kardiovaskulárních chorob, karcinogeneze, neurologických poruch nebo procesů stárnutí. Z uvedených důvodů vzrůstá zájem stanovit antioxidační aktivitu různých látek rostlinného původu.

Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl některými autory zaveden pojem celková antioxidační aktivita TAA (Total Antioxidant Activity). TAA je parametrem, který kvantifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály. Z velkého počtu popsaných metod mají při stanovení TAA nejčastější použití dále uvedené metody TEAC, FRAP a ORAC. Je třeba připomenout, že řada látek přijímaných v rostlinném materiálu podléhá metabolickým změnám již v trávicím traktu a jejich účinek v organismu je dále podstatně ovlivněn mírou resorpce a dalším metabolismem. Proto výrazná antioxidační aktivita zjištěná *in vitro* nemusí znamenat adekvátně významný účinek *in vivo*.

V literatuře lze nalézt velký počet metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity. Jejich rozmanitost vyplývá ze skutečnosti, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Nejčastěji jde o přímou reakci s radikály (zhášení, vychytávání) nebo reakci s přechodnými kovy. Přesnější chemické vymezení mechanismu jejich účinku je však

často problematické. Proto také postupy hodnotící míru antioxidačního působení jsou založeny na různých principech. Obecně mohou být kategorizovány do dvou skupin – na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a dále na metody posuzující redoxní vlastnosti látek.

### 2.2.1 Metody založené na eliminaci radikálů

Metody spočívají v hodnocení schopnosti vzorku vycytávat volné radikály. Radikály mohou být v reakční směsi generovány nebo jsou do reakční směsi přidávány.

a) Metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

TEAC odpovídá antioxidační aktivitě vzorku, která je vztažena ke standardní látce Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylové kyselině), což je rozpustný syntetický analog vitamínu E.

Vlastní metoda stanovení je založena na zhášení uměle připraveného stabilního radikálu ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina)). Působením persíranu draselného je ABTS převedeno na svůj stabilní radikál ABTS<sup>•+</sup>. Tento radikál má tyrkysově modrou barvu. Přidáním vzorku s antioxidační kapacitou dochází ke konverzi zpět na neutrální bezbarvou formu, přičemž celková barva přechází na světle zelenou až bezbarvou. Tato změna intenzity se měří fotometricky při vlnové délce 734 nm<sup>37</sup>.

Dalším stabilním radikálem vedle ABTS, který je používám k vyhodnocování antioxidační aktivity, je DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl); při kontaktu s analytem ochotným k redoxní reakci dochází ke „zhášení“ – fialový roztok se odbarvuje, dochází k poklesu absorpance (525 nm), což je v přímé souvislosti s koncentrací antioxidantu v analyzovaném vzorku; pro reálné měření mohou být použity jak klasické „stacionární“ spektroskopické metody, tak úsporné a rychlé moderní metody např. FIA<sup>38</sup>.

b) Metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)<sup>39</sup>.

Při použití metody ORAC se v testovaném systému generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence  $\beta$ -fykoerytrinu ( $\beta$ -PE) po ataku radikály. Pro

generaci peroxylových radikálů se používá AAPH (2,2'-azobis (isobutyrimidamid dihydrochlorid)), pro generaci hydroxylových radikálů pak systém  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^+$ . Vzhledem k tomu, že tyto radikály patří k nejreaktivnějším, patří test ORAC k důležitým parametrům charakterizujícím antioxidanty. Originální metoda ORAC, která používá jako sondu  $\beta$ -PE ( $\text{ORAC}_{\text{PE}}$ ), má široké využití a poskytuje významné informace o antioxidační kapacitě vzorků různého typu. Při stanovení antioxidační kapacity polyfenolů však byla popsána některá omezení, která se týkají vlastností  $\beta$ -PE (např. omezená fotostabilita).

### 2.2.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

Neenzymové antioxidanty mohou být charakterizovány jako redukční činidla, která reagují s oxidanty, redukuje je a tím je inaktivují. Z tohoto pohledu lze antioxidační aktivitu posuzovat na základě redukční schopnosti látky.

a) Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential)<sup>37</sup>.

Je založena na principu redoxní reakce, kde se využívá schopnost antioxidantů ve vzorku redukovat železité komplexy např.  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin), které jsou téměř bezbarvé a po redukcí na  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ vytváří intenzivně fialové produkty, které se měří při vlnové délce 593 nm. Výsledek se poté vyjádří pomocí kalibrační křivky na ekvivalentní množství iontů  $\text{Fe}^{2+}$ . Metoda má svoje limity, spočívající v tom, že měření probíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH (3,6), kdy nejsou zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenolové látky a thioley, navíc vznikající  $\text{Fe}^{2+}$  je *in vivo* jedním z reaktantů Fentonovy reakce. Metoda tak odráží pouze schopnost látek redukovat ion  $\text{Fe}^{3+}$  a s celkovou antioxidační aktivitou vzorku nemusí pozitivně korelovat.

b) HPLC metoda s elektrochemickou detekcí<sup>40</sup>.

Elektro-aktivní látky je možno velmi přesně a citlivě detekovat použitím ampérometrických nebo coulometrických detektorů při analýze HPLC (HPLC-ECD). Při této metodě se na pracovní elektrodu detektoru vkládá určitý kladný potenciál. Pík látky se projeví pouze tehdy, je-li látka při tomto potenciálu oxidována. Látku je tak možno charakterizovat nejen retenčním časem, ale také potenciálem, při kterém se oxiduje. To



umožňuje analyzovat komplexní směsi a identifikovat v nich jednotlivé účinné antioxidační komponenty na základě hodnoty potenciálu aplikovaného na elektrodu.

Jedním z významných ukazatelů antioxidační aktivity z hlediska predikce je přítomnost fenolových látek, jejichž kvantitativní obsah se zjišťuje sumárně stanovením pomocí Folin-Ciocalteuova činidla; výsledky jsou vyjadřovány jako ekvivalenty gallové kyseliny <sup>41</sup>. Tato metoda je velmi oblíbená, je používána dokonce v Českém lékopise a v řadě případů může být velmi dobrým vodítkem antioxidační aktivity.

### 3 Přírodní antioxidanty

#### 3.1 Zdroje přírodních antioxidantů<sup>42</sup>

V lidském organismu tvoří ochranu před oxidačním poškozením nejen antioxidanty syntetizované v těle, ale i ty, které přijímáme s potravou. V poslední době dochází ke zvýšení zájmu o přírodní antioxidanty. Přírodní antioxidanty (vitamin C, vitamin E, karotenoidy ad.) získáváme potravou hlavně z ovoce, zeleniny, obilovin, luštěnin, koření a nápojů. Antioxidační aktivitu vykazuje mnoho rostlinných druhů (Tab. 5).

**Tab. 5** Antioxidační aktivita ORAC některých bylin, koření a plodů<sup>42</sup>

Poživatina	ORAC [μmTE/100 g]
Bazalka (čerstvá)	4805
Bazalka (sušená)	61063
Majoránka (čerstvá)	27297
Oregano (čerstvé)	13970
Oregano (sušené)	175295
Šalvěj (čerstvá)	32004
Šalvěj (drcená)	119929
Rozmarýn (sušený)	165280
Černý pepř	34053
Tymián (sušený)	158380
Maliny	5065
Česnek (syrový)	5708
Cibule červená (syrová)	1521
Zázvor kořen (syrový)	14840

Ovoce patří k potravinám hodnoceným pro své dietetické a nutriční hodnoty. Obsahuje několik vitamínů, solí a pro tělo důležité vlákniny. Většina ovoce je zdrojem vitamínu C, karotenoidů a polyfenolů. Silné antioxidanty se nacházejí v bobulích, třešních, švestkách, citrusech, olivách a kiwi.

V zelenině patří k nejbohatším zdrojům antioxidantů rajčata, paprika, brukvovitá zelenina, cibule, česnek, brambory, špenát a červená řepa. Paprika se cení pro vysoký obsah vitamínu C a kryptoxanthinu, a rajčata jako zdroj lycopenu.

Obilniny a luštěniny nejsou příliš bohatým zdrojem antioxidantů, prakticky se v nich nachází pouze polyfenoly. Význam však nabývají svým velkým podílem v naší potravě.

Důležitým zdrojem antioxidantů jsou nápoje a pochutiny (čaj, káva, ovocné šťávy, pivo, víno atd.). Převažující fenolovou sloučeninou obsaženou v čaji jsou katechiny. Všeobecně, zelený čaj je bohatší na tyto sloučeniny než čaj černý. V kávě je dominantní chlorogenová kyselina. Velké množství fenolových sloučenin se nachází v kakaových bobech (resp. kakau a čokoládě). Procyanidiny tvoří z nich cca 60 %. Významné je i malé množství sloučenin na bázi sloučeniny vycházejících z kvercetinu. Pivo obsahuje hlavně fenolové sloučeniny, jejichž zdrojem je ječný slad a rovněž chmel. Vysoce aktivní antioxidanty byly nalezeny v olivovém oleji.

Mezi významné zdroje fenolových sloučenin patří rovněž koření (Tab. 6). Vždy tvořilo důležitou přísadu do pokrmů, kde plnilo úlohu chuti, aroma a barvy ale zajišťovalo i trvanlivost potravin. Koření se užívalo také jako baktericidní prostředek. Silice a netěkavé oleje obsažené v některém koření působí jako inhibitory bakterií a hub.

Řada koření obsahuje složky, které vykazují antioxidační účinek. Silné antioxidační vlastnosti má hřebíček, skořice, zázvor, černý pepř. Tradičním kořením je majoránka a kmín

43.

**Tab. 6** Antioxidanty identifikované v některých rostlinách <sup>43</sup> (upraveno)

Bylina	Fenolové diterpeny				Fenolové kyseliny			Silice			Fenolpropano- idy			Flavonoids			
	Rosmanol	Epi-isorosmanol	Rosmadial	Rosmaridifenol	Carnosic	Carnosol	Rosmarinová kys.	Jednoduché fenol. kys.	Kyselina kávová	1,8-cineol	$\alpha$ -thujien	$\alpha$ - $\beta$ -phien	Thymol		Eugenol	Carvacrol	p-cymen
Rozmarýn	•	•		•	•	•	•	•	•			•	•		•	•	
Dobromysl (Oregano)							•	•			•	•	•		•	•	•
Šalvěj	•	•	•		•	•	•	•									•
Tymián							•			•	•	•	•		•	•	•
Majoránka						•	•	•									•
Saturejka	•					•	•						•		•	•	•
Bobkový list							•			•		•					•
Bazalka					•		•	•	•	•	•						•

Další zdroje antioxidantů byly nalezeny v semenech a v různých dalších částech rostlin, například v listech (pohanka, zelený ječmen, atd.) a mořských rostlinách (chaluhy) <sup>44</sup>.

Míra konzumace přírodních antioxidantů se odvíjí od dostupnosti daného produktu a závisí na kulturních zvyklostech v dané oblasti. Vyskytují se proto významné rozdíly v množství i skladbě konzumovaných přírodních antioxidantů u různých národů <sup>45</sup>.

Nejvýznamnějšími přírodními antioxidanty jsou karoteny ( $\beta$ -karoten), tokoferoly (vitaminy E) a tokotrienoly, askorbová kyselina (vitamin C) a fenolové látky, především flavonoidy, fenolové kyseliny (chlorogenová, vanilová, ferulová, skořicová ad.), glykosidy, katechiny, lignany, stilbeny a třísloviny <sup>46</sup>. Při hodnocení výskytu těchto látek se zdá, že nejvíce zastoupenými antioxidanty v potravě jsou flavonoidy a fenolové kyseliny. Ukázalo se, že výrazný vliv na aktivitu antioxidantů, zvláště polyfenolů mají vnější faktory, složení suroviny, způsob jejího zpracování a skladování.

Velké rozšíření přírodních antioxidantů má své opodstatnění. Nedávné výzkumy prokázaly, že antioxidanty rostlinného původu mají velký význam jako léčebné prostředky u některých chorob vyvolaných oxidačním stresem. Mnohé syntetické antioxidační sloučeniny prokazují toxické, nebo mutagenní vlastnosti <sup>47</sup>. Rostlinná léčba je základem primární zdravotní péče pro 75-80 % světové populace, především v rozvojových zemích. Je to způsobeno kulturními zvyklostmi, dostupností, lepší kompatibilitou s lidským organismem a menšími vedlejšími účinky. Chemické komponenty přítomné v rostlinných přípravcích, nebo rostlinách jsou součástí fyziologických funkcí živých rostlin, a proto se věří, že jsou pro jejich organismus vhodnější. Drogy získané z rostlinného materiálu, jsou často účinnější a extrakty jsou ekonomicky výhodnější než syntetické přípravky, zejména v případě, kdy látky mají složitou strukturu, nebo je požadován komplexní účinek jednotlivých komponent obsažených v rostlinném materiálu. Přírodní drogy vykazují minimální toxicitu a nevýznamné vedlejší účinky.

Pravidelný příjem dostatečného množství přírodních antioxidantů v potravě je prevencí před chorobami doprovázejícími stárnutí (degenerativní onemocnění, plicní selhání, zhoubné bujení, kardiovaskulární choroby a pokles imunního systému) <sup>48, 49</sup>.

### 3.2 Aktuální poznatky o významu antioxidantů ve výživě <sup>49</sup>

Potravní antioxidanty se zejména považují za prostředky prevence a potlačování oxidačně podmíněných chorob. Laická veřejnost však často podléhá podbíživé reklamě a komerčnímu přístupu, které podněcují k masivnímu a nekontrolovanému užívání antioxidačních vitaminů a látek s podobnou aktivitou. Účelnost takové praxe vyvolává pochybnosti.

Představa, že antioxidanty jsou prostředky, které jednoznačně ochrání před rozvojem degenerativních chorob je mylná, ačkoliv se s ní setkáváme v širokém měřítku v různých reklamách, firemních sděleních a běžném neodborném tisku. Tyto látky mohou nepochybně zabrzdit rozvoj chorob, ale samotná progresse choroby není významně založena jen na přítomnosti antioxidantu. Zásadní roli zde hrají genetické faktory, vliv okolního prostředí a úroveň psychické pohody jedince <sup>50</sup>.

Aktuální poznatky vyplývající z epidemiologických a zejména experimentálních studií ukazují, že nadměrné dávky antioxidantů nezvyšují antioxidační účinek a mohou být i škodlivé a že také v tomto ohledu platí stará zkušenost, že příliš mnoho dobrého může škodit.

Pojem oxidační stres (tradičně definovaný jako převaha oxidačních faktorů nad antioxidačními v různých částech organismu i jeho buněk a také jako akumulace produktů oxidační destrukce biomolekul se zdravotně škodlivými účinky) je stále vnímán jako častá příčina chorob a ohrožení života. Tato definice je ale v určitém rozporu s objevy, které byly uskutečněny při novějším výzkumu oxidantů, zejména tzv. reaktivních forem kyslíku, dusíku, chlóru a síry (ROS, RNS, RCIS, RSS), jako jsou superoxidový anion, peroxid vodíku, hydroxylový radikál, kyselina chlorná aj., často majících radikálový charakter. Ukázalo se, že tyto látky nemají jen škodlivý účinek, ale hrají také nezastupitelnou roli v přenosu vnitrobuněčných i mezibuněčných signálů, které jsou důležité pro všechny fyziologické funkce. V řadě případů tak aktivně zasahují do regulace různých činností a do života buněk, zejména do pochodů jejich tvorby, zániku, rozmnožování a diferenciací. Často působí jako induktory antioxidačních enzymů, zejména superoxidodismutasy, katalasy a různých peroxidas. Jejich tvorba a přítomnost v buňkách má proto esenciální význam a nevhodné omezování jejich tvorby a aktivity může být pro organismus škodlivé.

V protikladu s tím jsou antioxidanty charakterizovány jako látky (nebo enzymy), které zabraňují v daných podmínkách oxidačnímu poškození cílové molekuly nebo ho zpomalují. Nověji je tato definice zpřesňována uvedením důležitých okolností, při kterých je antioxidační aktivita konkrétní látky testována, nebo k jakým specifickým strukturám se ochranný účinek vztahuje. Oxidanty se nyní také označují jako oxidační stresory a společně s antioxidanty jako oxidačně-redukční regulátory.

Pravidelné užívání velkých dávek antioxidantů založené na přesvědčení, že existuje lineární vztah mezi jejich dávkou a účinkem, může být proto kontraproduktivní a pro organismus nežádoucí a neodpovídá doporučení WHO <sup>51</sup>.

**Tab. 7** Doporučené a přípustné dávky některých antioxidantů <sup>49</sup>

<b>Antioxidant</b>	<b>Denní doporučená dávka</b>	<b>Nejvyšší denní přípustné množství</b>
L-Askorbová kyselina	60 mg	2000 mg
Tokoferoly	10 mg	100 mg
Kartenoidy	1,6 mg	25 mg
Pyknogenoly	20 mg	100 mg
Kurkuminoidy	neuváděno	20 mg
Flavanoidy	do 50 mg	neuváděno
Koenzym Q10	20 mg	60 mg
Selen	0,055 mg	0,2 mg
Zinek	15 mg	25 mg

Tento důležitý poznatek vyplývá zřetelně z metaanalýz výsledků významných epidemiologických studií, zpravidla prospektivního a intervenčního typu<sup>52</sup>. Doporučené a přípustné dávky antioxidantů jsou uvedeny v (Tab. 7).

## 4 Významné fenolové látky s antioxidační aktivitou <sup>53</sup>

Mezi účinné přírodní antioxidanty patří velká skupina látek označovaných souhrnně jako polyfenoly.

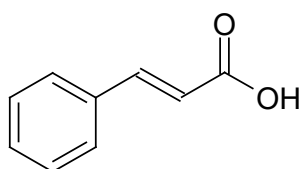
Polyfenoly se do popředí úvah o možné antioxidační terapii dostávají teprve v posledních letech <sup>54</sup>. Jsou to látky ubikvitární v rostlinné říši a jsou nejrozšířenějšími sloučeninami s redukčními účinky v naší stravě.

V rostlinách bylo identifikováno několik tisíc fenolových látek s ohromnou rozmanitostí struktur. Společným rysem je to, že obsahují jedno nebo více aromatických jader substituovaných hydroxylovými skupinami. Mnohé z těchto látek jsou zastoupeny v běžných potravinách, zejména v ovoci, zelenině a některých nápojích. Celkový denní příjem polyfenolů byl odhadnut na 1 gram a je tedy vyšší než příjem antioxidačních vitaminů <sup>55</sup>. V řadě experimentálních studií bylo také prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolových látek je vyšší než účinek antioxidačních vitaminů.

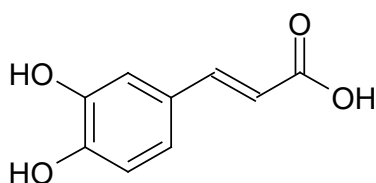
Fenolové látky přijímané ve výživě člověka lze rozdělit do tří základních skupin: na fenolové kyseliny, flavonoidy a skupinu stilbenů a lignanů, která je méně častá.

### 4.1 Fenolové kyseliny <sup>53</sup>

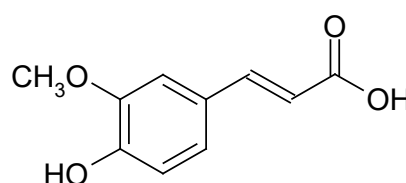
Fenolové kyseliny jsou přítomné v řadě potravin. Podle současných poznatků tvoří přibližně jednu třetinu polyfenolů v potravě. V naší stravě jsou fenolové kyseliny zastoupeny především hydroxyskořicovými kyselinami, převážně ve formě esterů. Nejčastěji je to kyselina kávová a její estery, dále pak kyselina ferulová (Obr. 6).



Kyselina skořicová



Kyselina kávová

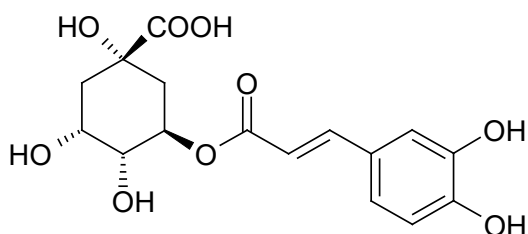


Kyselina ferulová

**Obr. 6**

Kyselina ferulová (Obr. 6) je obvykle asociována s potravní vlákninou a je v ní esterovou vazbou vázána k hemicelulóze. Jedním z hlavních zdrojů kyseliny ferulové jsou tak např. pšeničné otruby (5 mg/g).

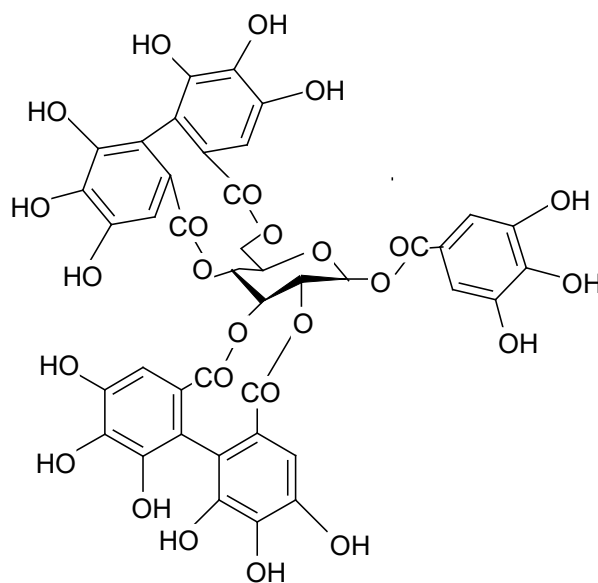
Nejběžnějším esterem kávové kyseliny je kyselina chlorogenová (5-kaffeoylchinová kyselina) (Obr. 7), která je přítomná v řadě druhů ovoce a zeleniny a v kávě. Šálek kávy obsahuje 50-150 mg kyseliny chlorogenové. Kromě kávy jsou bohatým zdrojem též brambory, jablka, hrušky, meruňky, broskve. Významný obsah chlorogenové kyseliny a jejích derivátů je rovněž v artyčoku, který v některých zemích patří k oblíbené zelenině.



**Obr. 7** Kyselina chlorogenová

Další fenolové deriváty patřící do této skupiny jsou hydrolyzovatelné a kondenzované třísloviny (taniny). Fenolové kyseliny jsou v nich esterifikovány polyhydroxysloučeninami, nejčastěji glukózou. Fenolovými kyselinami jsou jednak kyselina gallová v gallotaninech (mango), jednak ostatní fenolové kyseliny odvozené oxidací galloylových zbytků v ellagotaninech např. kasuariktinu (Obr. 8) v borůvkách, malinách, rybízu. Vysoké hladiny kondenzovaných taninů obsahuje také červené víno. Taniny obecně přispívají k adstringentním (svírajícím, stahujícím) vlastnostem ovoce.



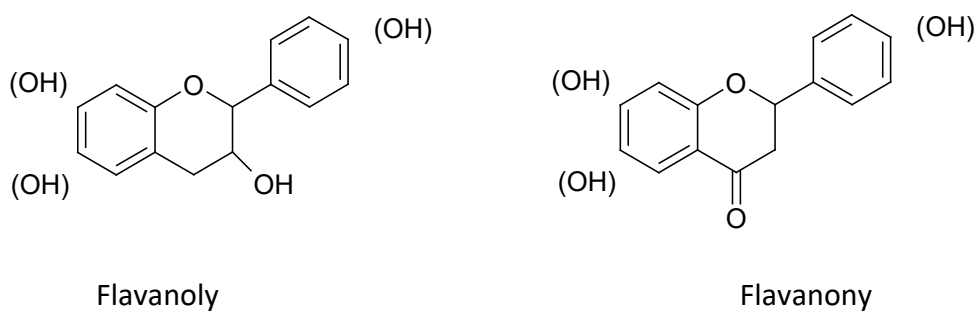


**Obr. 8** Kasuariktin

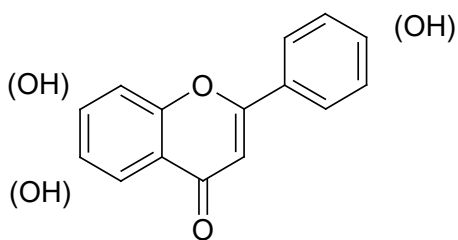
#### 4.2 Flavonoidy<sup>53</sup>

Nejčastěji se vyskytujícími se polyfenoly v naší výživě jsou flavonoidy. Odhadovaný příjem flavonoidů ve výživě člověka je v rozmezí několika desítek až stovek miligramů za den, v závislosti na výživových zvyklostech. Bylo např. prokázáno, že japonská populace má vyšší příjem flavonoidů, což je přičítáno konzumaci zeleného čaje a stravovacím návykům<sup>56</sup>.

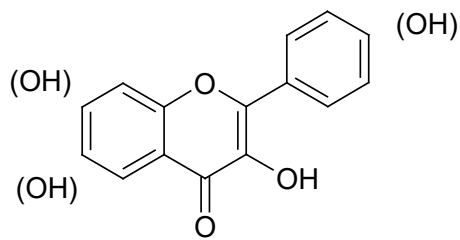
Mezi hlavní skupiny flavonoidů ve výživě člověka patří flavanoly, flavanony (Obr. 9), flavony, flavonoly (Obr. 10), proantocyanidiny, antocyanidiny (Obr. 11) a isoflavonoidy (Obr. 12).



**Obr. 9**

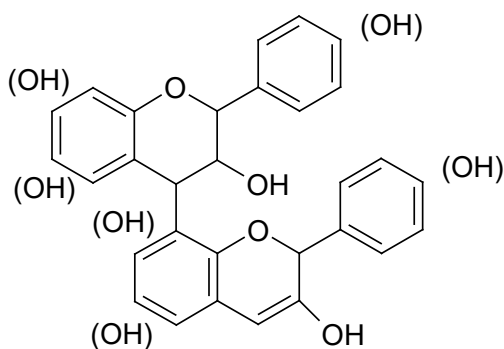


Flavony

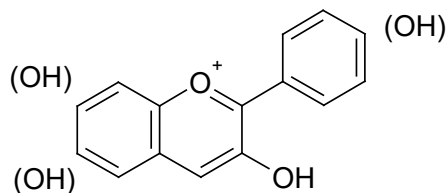


Flavonoly

Obr. 10

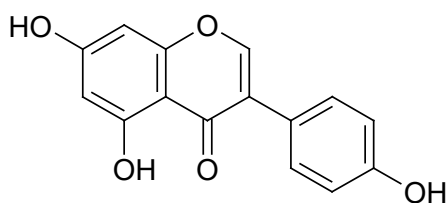


Proanthocyanidiny



Anthocyanidiny

Obr. 11

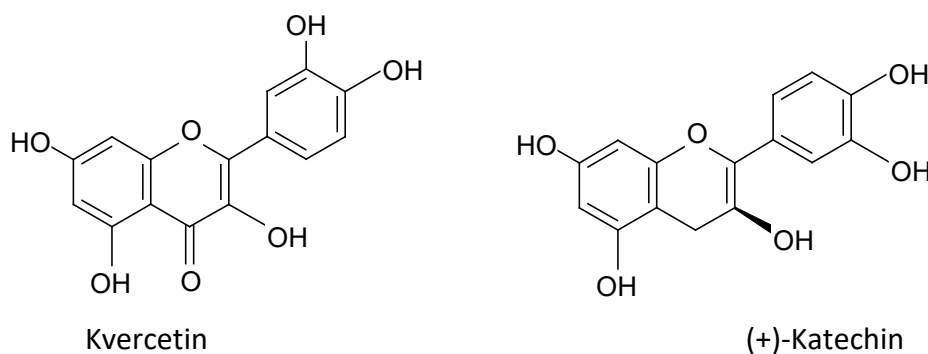


Obr. 12 Isoflavony

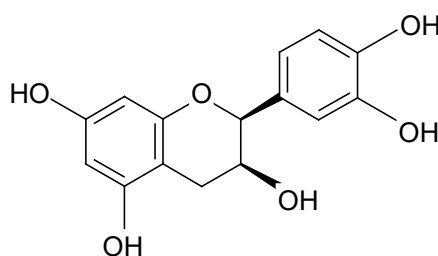
Velká část flavonoidů je glykosylována. Navázaný cukr bývá glukosa, rhamnosa, méně často galaktosa, arabinosa, xylosa, glukuronová kyselina a další cukry. Obvykle je navázána jedna cukerná jednotka, ale mohou být i dvě, tři či více. Cukry mohou být dále substituovány např. malonylovou skupinou.

Dominantním flavonoidem ve výživě člověka je flavonol kvercetin (Obr. 13). Kvercetin se nachází ve vysokých koncentracích v běžně přijímaných potravinách jako cibule (300 mg/kg

čerstvé váhy), jablka (21-72 mg/kg), kapusta (100 mg/kg), červené víno (4-16 mg/l) a zelený a černý čaj (10-25 mg/l běžného nálevu) <sup>57</sup>. V těchto zdrojích se nachází jednak ve formě volné, jednak vázán s cukernými jednotkami, např. jako kvercetin-3-*O*-glukosid, kvercetin-4'-*O*-glukosid, kvercetin-3-*O*-rhamnosid. Rutin (kvercetin-3-*O*-rhamnoglukosid) je součástí léků používaných jako venofarmaka. Snižuje permeabilitu (propustnost) a fragilitu cév a zlepšuje jejich vazodilataci <sup>58</sup>. Rutin je silným antioxidantem <sup>59</sup>.



**Obr. 13**



**Obr. 14** (+)-Epikatechin

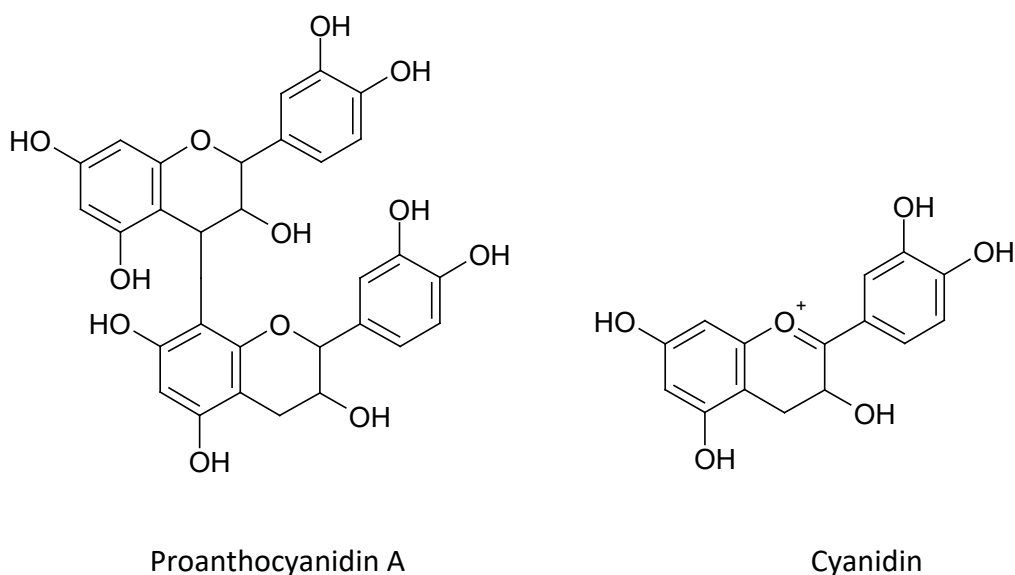
Hlavními flavanoly jsc **Obr. 14** (+)-Epikatechin **Obr. 13**), epikatechin (**Obr. 14**), epigallokatechin a jejich estery s kyselinou gallovou. Jsou hlavně přítomné v čaji. Nálev ze zeleného čaje obsahuje kolem 1 g/l katechinů. V černém čaji je obsah redukován asi na polovinu v důsledku oxidace na komplexnější polyfenoly během fermentace. Dalšími zdroji jsou červené víno (270 mg/l) a čokoláda.

Proanthocyanidiny (**Obr. 15**) jsou polymerní flavanoly. Jsou přítomny v rostlinách jako komplexní směsi polymerů s průměrným stupněm polymerace 4–11. Vyskytují se také vázány esterově s kyselinou gallovou nebo ve formě dvojité spojených dimerů. Jejich struktura je složitá, ale přesto v poslední době dochází ve výzkumu těchto látek k rozvoji, v souvislosti se zdokonalováním separačních a identifikačních metod <sup>60</sup>.

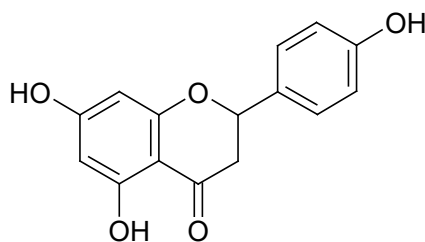
Vykazují adstringentní účinky a výskytem jsou obvykle asociovány s flavanolovými katechiny. Běžným zdrojem jsou jablka, hrušky, hrozny, červené víno, čaj, čokoláda, skořice, kakao.

Anthocyanidiny (anthocyany) jsou červená barviva např. v třešních, švestkách, rybízu. Obsah kolísá v rozmezí 0,15-4,5 mg/g čerstvého ovoce. Průměrný obsah ve vínu se udává 26 mg/l.

Flavanony jsou látky typicky se vyskytující v pomerančích a grapefruitech. K hlavním se řadí aglykony naringenin, hesperetin (které jsou ve formě glykosidů známy jako tzv. „citrusové flavonoidy“ (Obr. 16).



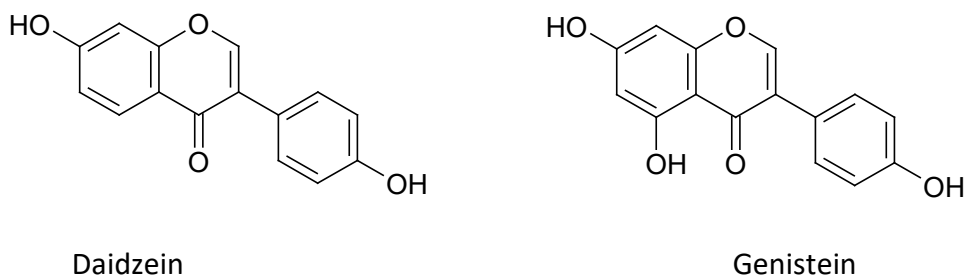
**Obr. 15**



**Obr. 16** Hesperetin

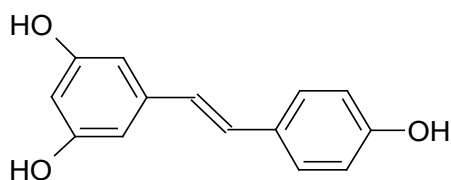
Zvláštní skupinu flavonoidů tvoří isoflavonoidy. Patří k nim především isoflavony daidzein a genistein (Obr. 17). Nacházejí se hlavně v luštěninách, vydatným zdrojem je hlavně sója (1–3 mg/g) a veškeré její druhotné produkty. Jejich průměrný příjem potravou

je v Japonsku vzhledem k vysoké konzumaci sóji 30–40 mg/den, zatímco u evropské populace jen 1-9 mg.



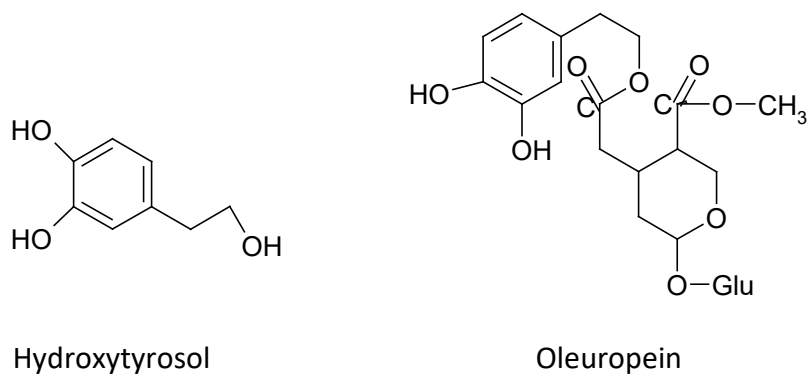
**Obr. 17**

K polyfenolům vyskytujícím se v potravě se řadí dále stilbeny. Nejsou v rostlinné říši příliš rozšířeny, avšak jeden z nich v nedávné minulosti vyvolal zvýšenou pozornost vědců. Jedná se o resveratrol (Obr. 18), který byl po určitou dobu dáván do souvislosti s tzv. francouzským paradoxem<sup>61</sup>. (Nápadně nízký výskyt kardiovaskulárních onemocnění v oblasti Středomoří a tato skutečnost byla vysvětlena zvýšenou konzumací červeného vína, za jehož hlavní účinnou složku byl považován právě resveratrol). Vzhledem k tomu, že koncentrace resveratrolu ve většině vín je podstatně nižší ve srovnání s ostatními polyfenoly, zdá se být jeho příspěvek k antioxidačním vlastnostem červeného vína nevýznamný. Určité pozitivní výsledky vykazuje studie karcinomu prsu<sup>62</sup>.



**Obr. 18** Resveratrol

Významný obsah polyfenolových látek byl prokázán také v olivovém oleji. Jsou to např. hydroxytyrosol, oleuropein (jeho základ je iridoidní), (Obr. 19) a jeho aglykon a některé fenolové kyseliny (kávová, vanilová, syringová, protokatechová). Jejich obsah se uvádí až 1 g/kg oleje, závisí však na odrůdě, podmínkách pěstování a způsobu zpracování. Přítomností těchto látek je rovněž přičítána nízká frekvence výskytu kardiovaskulárních onemocnění a některých druhů neoplazmat u obyvatel v oblasti Středomoří.

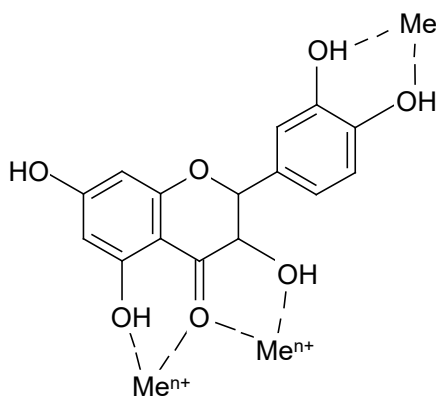


**Obr. 19**

### 4.3 Antioxidační účinky polyfenolů<sup>53</sup>

Antioxidační účinek polyfenolů je komplexní a lze jej přičíst několika mechanismům:

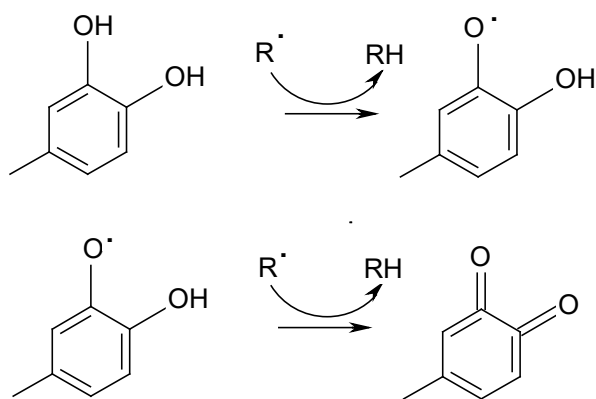
- a) Řada flavonoidů i dalších polyfenolů inhibuje enzymy zodpovědné za produkci superoxidového anion-radikálu (např. xantinoxidasu, proteinkinasu C). Inhibují i další enzymy, které se podílejí na tvorbě volných radikálů (cyklooxygenasa, lipoxigenasa, mikrosomální monooxygenasa atd.)



**Obr. 20** Vazebná místa pro kovy v molekulách flavonoidů

- b) Mnohé polyfenoly vytváří chelátové vazby s kovy (Obr. 20), především s mědí a dvojmocným železem. Volné ionty těchto kovů se účastní při tvorbě reaktivních kyslíkových forem např. při Fentonově reakci.

- c) Řada polyfenolů je snadno oxidovatelná (Obr. 21). Snadnost oxidace závisí na redoxním potenciálu. Látky s nízkou hodnotou redox potenciálu (<0,75 V) jsou schopny redukovat některé volné radikály s oxidačními účinky, např. superoxidový, peroxylový, alkoxylový a hydroxylový. Při reakcích poskytují vodík a samy se přitom většinou přeměňují na málo reaktivní fenoxylový radikál (FI-O<sup>•</sup>) nebo neradikálové chinoidní struktury. Význam reakce spočívá v tom, že radikály jsou eliminovány dříve, než reagují s dalšími buněčnými komponentami.



**Obr. 21** Oxidace polyfenolů

Je však třeba poznamenat, že za určitých okolností mohou některé fenolové látky působit i jako prooxidanty. Za přítomnosti zvýšeného množství přechodných kovů může aroxylový radikál (FI-O<sup>•</sup>) reagovat i s kyslíkem za vzniku superoxidu a chinonu.

#### 4.4 Další biologická aktivita polyfenolů<sup>53</sup>

V pokusech *in vitro* nebo na zvířatech byly prokázány i některé další biologické účinky polyfenolů. Polyfenoly z červeného vína, hroznů a hroznových slupek vyvolávaly vasorelaxační účinky prostřednictvím NO-cGMP dráhy. Deriváty kyseliny kávové snižovaly systolický krevní tlak u krys. V jiných pokusech vykazaly deriváty kyseliny kávové schopnost blokovat nitrobuněčné signály vyvolávané oxidovanými LDL částicemi a blokovaly tak jejich cytotoxický účinek. Byl popsán rovněž inhibiční účinek derivátů kyseliny kávové na jaderný transkripční faktor NF-κB.

Některé z flavonoidů působí jako inhibitory topoisomerasy a induktory apoptózy. V této souvislosti je studován jejich antikancerogenní účinek. Na druhé straně nelze vyloučit ani roli flavonoidů při karcinogenezi. Tato role je diskutována zejména ve vztahu k bezpečnému příjmu flavonoidů. Předpokládá se, že zátěž flavonoidy v běžných množstvích přijímaných potravou nepředstavuje pravděpodobně riziko vedlejších negativních účinků. Avšak suplementace antioxidantními preparáty a rostlinnými přípravky, které jsou obecně doporučovány v gramových množstvích, by mohla vyústit v dosažení potenciálně toxických hladin. Např. typické dávky kvercetinových potravních doplňků kolísají v rozmezí 500–1000 mg/den, což je 10× až 20× více než je konzumováno v běžné vegetariánské dietě. Nelze vyloučit, že neregulované podávání komerčně produkováných flavonoidních preparátů by v lidském organismu vedlejší účinky mohlo vyvolat.

Některé isoflavony (dadzein, genistein) se řadí do skupiny tzv. fytoestrogenů. Přestože nemají steroidní strukturu, vykazují mírnou estrogenní aktivitu a mohou proto vyvolávat podobné účinky jako estrogeny. Je sledována jejich možná role při prevenci vzniku nádorů prsů a osteoporózy.

#### **4.5 Biodostupnost polyfenolů** <sup>63, 64</sup>

Biologické účinky polyfenolů v organismu závisí na jejich biodostupnosti. Nepřímým důkazem jejich absorpce v trávicím traktu je zvýšení antioxidační kapacity plazmy po jejich konzumaci. To bylo pozorováno při podávání potravin jako čaj, červené víno nebo jablečný džus. Přímějším důkazem je potom měření koncentrace polyfenolů v plazmě a moči po jejich podání. V řadě případů přispívají k antioxidační kapacitě i jejich metabolity.

Rychlost a rozsah intestinální absorpce polyfenolů je závislá na jejich chemické struktuře a ta předurčuje i povahu metabolitů cirkulujících v plazmě a vylučovaných do moči. Různé studie ukázaly, že množství polyfenolů nacházejících v plazmě a v moči se liší od jedné fenolové sloučeniny ke druhé. Jsou významně nízká pro kvercetin a rutin, avšak vysoká pro katechiny ze zeleného čaje, isoflavony ze sóji, flavanony z citrusových plodů nebo anthocyanidiny z červeného vína. Byly pozorovány i individuální rozdíly (např. 5 až 57 % pro naringin z grapefruitového džusu).



Dříve se předpokládalo, že flavonoidy, které jsou převážně přijímány ve formě glykosidů, jsou prakticky neabsorbovatelné a že přes intestinální stěnu mohou pronikat pouze méně polární volné aglykony. Jevilo se pravděpodobně, že glykosidy flavonoidů se působením mikroorganismů v tlustém střevě štěpí v místě pyronového jádra a vznikají produkty jako fenylactová a fenylpropionová kyselina.

Toto štěpení v tlustém střevě skutečně probíhá, avšak bylo zjištěno, že aglykony polyfenolů mohou být uvolňovány z jejich mateřských sloučenin i glukosidasami přítomnými v tenkém střevě. Potenciální substráty pro endogenní lidské enzymy jsou polyfenoly s navázanou glukosou nebo xylosou či arabinosou. Naopak navázaná rhamnosa není substrátem pro lidské glukosidasu a je pravděpodobně odštěpena pouze rhamnosidasou přítomnou v mikroflóře tlustého střeva. Po odstranění cukerné složky může docházet k pasivní difuzi méně polárních aglykonů přes membránu kartáčového lemu enterocytů. Naproti tomu, některé polyfenoly jsou pravděpodobně z tenkého střeva resorbovány ve formě glykosidů pomocí transportních mechanismů pro monosacharidy. Tento typ transportu je diskutován např. pro glukosidy kvercetinu. Absorpce polyfenolů také závisí na jejich molekulové hmotnosti. Např. pokusy *in vitro* s anthocyanidiny ukázaly, že anthocyanidinový dimer a trimer mohou být absorbovány, na rozdíl od polymerů majících stupeň polymerace v průměru 7.

Volné aglykony mohou být dále před resorpcí konjugovány methylací, sulfatací, glukuronidací nebo jejich kombinací. Tyto konjugační reakce jsou zprostředkovány enzymy, které se v tenkém střevě uplatňují při konjugačních reakcích xenobiotik.

Další modifikace resorbovaných polyfenolů cestou konjugačních reakcí probíhá v játrech a případně v ledvinách. Vzhledem k tomu, že část metabolitů polyfenolů je vylučována žlučí, mohou se tyto již metabolizované polyfenoly dále zapojit do přeměn v tenkém střevě a podléhat enterohepatálnímu oběhu.

Ve většině experimentů sledujících účinnost resorpce polyfenolů se ukazuje, že koncentrace mateřského polyfenolu v plasmě je oproti podané dávce velmi nízká. Měření antioxidační kapacity plazmy však naznačuje, že na antioxidačních účincích plazmy se podílí řada dalších přítomných metabolitů fenolového charakteru, které vznikly působením střevní mikroflóry nebo metabolismem v játrech a dalších tkáních. Proto se jeví

potřeba tento metabolismus detailněji prozkoumat a popsat. Lepší porozumění příjmu a biodostupnosti polyfenolů v potravě bude do budoucna podstatné pro jejich hodnocení v roli prevence nemocí.

## 5 Rozchodnice růžová *Rhodiola rosea* L.

### 5.1 Botanická charakteristika a výskyt <sup>65</sup>

Rozchodnice růžová (často nazývaná Zlatý kořen), *Rhodiola rosea* L. je vytrvalá rostlina z čeledi tlusticovitých (*Crassulaceae*). Jedná se o vytrvalou rostlinu, s tlustým, krátkým, přímým oddenkem, pokrytým blanitými šupinami. Vyrůstá z něho několik přímých, nevětvených lodyh, vysokých 6–40 cm a 0,4–0,6 cm tlustých, hustě obalených modrozelenými, šťavnatě dužnatými listy. Jsou přisedlé, eliptické nebo podlouhle vejčité, celokrajné či s několika zuby u vrcholu, dlouhé 0,7–3,5 cm a 0,5–3 cm široké. V hustém hlávkovitém květenství se nacházejí malé, dvoudomé, čtyřčetné květy, se žlutavou, zelenavou nebo tmavě červenohnědě-fialovou korunou.

#### Obr. 22 *Rhodiola rosea* L.

Koruny samčích rostlin jsou 3–4 mm dlouhé, hypogynní samičí květy mají podlouhlé, vykrajované šupinky, jejich délka je 2–3krát větší než šířka. Tyto pestíkové květy jsou jen asi 2 mm velké nebo úplně zakrnělé. Plodem jsou měchýřky, přímé, zprvu nazelenalé a nachové, v době zralosti jsou hnědočervené. Semena jsou poměrně malá, 1,8–2 mm

dlouhá, 0,5–0,7 mm široká, hnědá (Obr. 22). Kořenový systém je tvořen hustou spleť primárních vřetenových kořenů a nitovitých postranních kořenů (Obr. 23).

Druh zaujímá rozptýlený euroasijský areál. V Ruské federaci se vyskytuje na Urale, Tarbagataji, v nejsevernějších oblastech evropské části a Dálného východu. Nejvíce je rozšířen v horách jižní Sibíře (Altaj, východní část Sajanského pohoří, Zabajkalsko) Vyskytuje se též v Mongolsku a Číně. V Evropě jsou to Alpy, Pyreneje a Karpaty a hornatá část Skandinávie. V ČR se vzácně vyskytuje v ledovcových kotlích Krkonoš (kriticky ohrožený druh)<sup>66</sup> a Jeseníků, na Slovensku ve Vysokých Tatrách a Malé Fatře. Jako vysokohorský druh roste v subalpínském až alpínském pásmu, do výšek 2400 m n. m., často ve společenství různých keřů a také na severních hřbetech v morénových částech pohoří. Rostlině se dobře daří v hlinité zemině s větším množstvím jílovitého podílu, na osluněných místech, dobře zásobených vláhou<sup>67</sup>.



**Obr. 23** *Rhodiola rosea* L. – radix

## 5.2 Využití v tradiční lidové medicíně

Tradiční lidová medicína používá léčebné přípravky z kořene *Rhodiola rosea* ke zvýšení fyzické odolnosti, zvýšení výkonnosti, dlouhověkosti, odolnosti proti výškové nemoci a léčbě únavy, deprese, anémie, pohlavní impotence. Nalezla uplatnění také u některých gastrointestinálních onemocnění, při léčbě infekcí a poruch nervového systému. Rostlina je

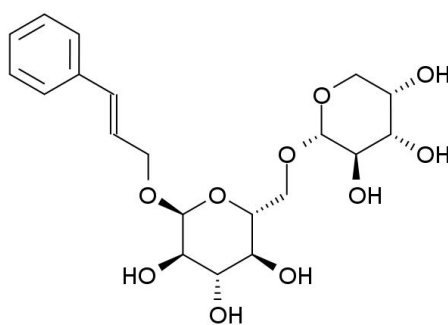
považována za přírodní adaptogen. V odlehlých horských vesnicích na Sibiři jsou manželské páry při uzavření sňatku stále obdarovávány svazkem kořenů *Rhodiola rosea* k posílení plodnosti a narození zdravých dětí. Čaj z kořene *Rhodiola rosea* je popisován jako nejúčinnější léčba chřipky a nachlazení během krutých zim Střední Asie. Mongolští lékaři předepisovali výtažky z *Rhodiola rosea* k léčbě tuberkulózy a nádorových onemocnění. Po staletí pouze rodinní příslušníci znali místa s výskytem divokých „zlatých kořenů“ a znali metody jejich extrakce <sup>69</sup>.

Carl von Linné uváděl přípravky z *Rhodiola rosea* jako svíravé, vhodné pro léčbu kýly, vaginálního výtoku, hysterie a bolesti hlavy. Již v roce 1755 byla *Rhodiola rosea* zařazena do prvního švédského lékopisu. Němečtí vědci popsali účinky *Rhodiola rosea* při léčbě bolestí, bolesti hlavy, hemeroidů, kurdějí a jako protizánětlivého prostředku <sup>68</sup>.

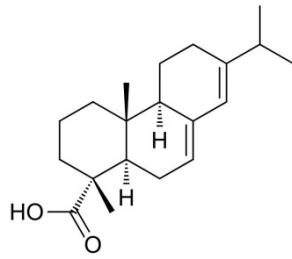
### 5.3 Obsahové látky

Fytochemickou analýzou kořenů s oddenkou *Rhodiola rosea* byla zjištěna přítomnost šesti skupin dominantních chemických sloučenin (nadzemní část dosud nebyla sledována):

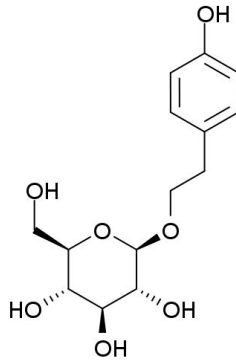
- a) Fenylypropanoidy: rosavin (Obr. 24), rosin (Obr. 25), rosarin.
- b) Fenyylethanoidy: salidroside (Obr. 26), tyrosol (Obr. 27).
- c) Flavanoidy: rodiolin (Obr. 28), rodionin, rodiosin, tricetin (Obr. 29), acetylrodalgin.
- d) Monoterpeny: rosiridol (Obr. 30), rosiridin (Obr. 31).
- e) Triterpeny: daukosterol (Obr. 32),  $\beta$ -sitosterol (Obr. 33).
- f) Fenolové kyseliny: chlorogenová (Obr. 34), gallová (Obr. 35), hydroxyskořicová.



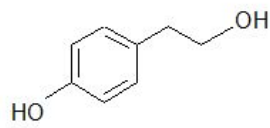
**Obr. 24** Rosavin



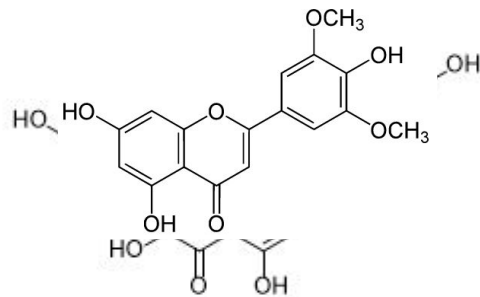
**Obr. 25** Rosin



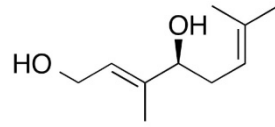
**Obr. 26** Salidroside



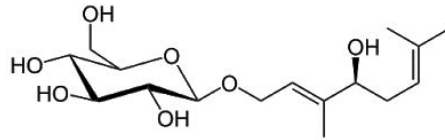
**Obr. 27** Tyrosol



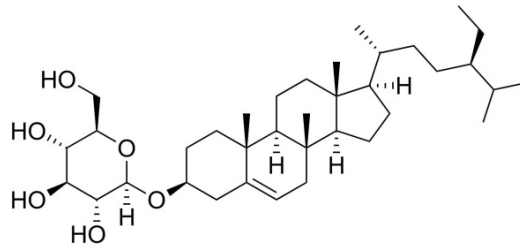
**Obr. 28** Rodiolin



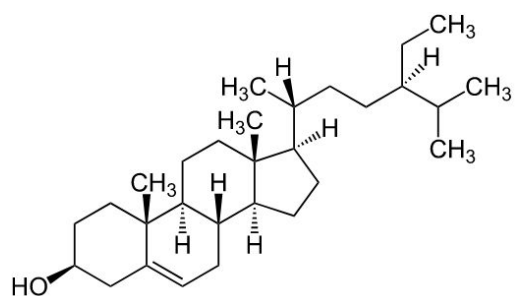
**Obr. 30** Rosiridol



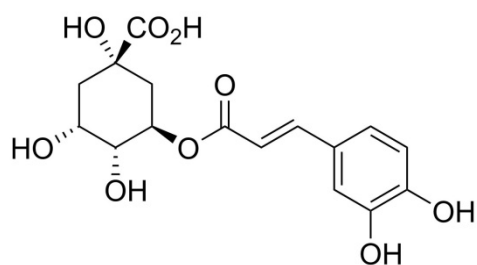
**Obr. 31** Rosiridin



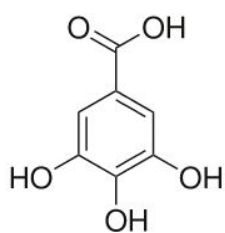
**Obr. 32** Deukosterol



**Obr. 33**  $\beta$ -sisterol



**Obr. 34** Kyselina chlorogenová



**Obr. 35** Kyselina gallová



V kořenech a oddencích bylo prozatím identifikováno přes 140 účinných látek<sup>69, 70</sup>. Hlavními obsahovými komponentami jsou čtyři skupiny látek: flavonoidy, sloučeniny odvozené od 2,6-oktadienu, glykosidy cinnamylalkoholu a 2-(4-hydroxyfenyl)ethanolu. Z těchto posledních derivátů je významný *p*-tyrosol a především jeho glykosid rhodiosid (salidrosid), který je nejvýznamnější obsahovou látkou. Z tohoto důvodu je těžiště výzkumu rozchodnice zaměřeno právě na salidrosid – nalezení jeho nových izolačních metod, kvantifikace v rostlinném materiálu či studium biologických účinků. Látky zodpovědné za charakteristickou vůni této drogy jsou geraniol, geranyl-formiát, geranyl- acetát, cinnamylalkohol, benzylalkohol a fenethylalkohol<sup>71, 72</sup>.

Z hlediska biologické aktivity jsou za nejdůležitější považovány rhodiosid, rosiridin, rodionin, triandrin<sup>73, 74</sup>.

Tým čínských pracovníků izoloval salidrosid z kalusové kultury kořenů rozchodnice, po jejich 1 min. trvající expozici mikrovlnným zářením. Salidrosid byl extrahován v průběhu 10 min. vodou, za laboratorní teploty. Ve srovnání s tradičními způsoby extrakce je tato metoda k obsahovým látkám šetrnější, odpadá zdlouhavé zahřívání a také izolovaný produkt vykazuje vyšší čistotu<sup>75</sup>.

K získávání salidrosidu či jeho důkazu v rostlinném materiálu, jsou také úspěšně používány rozmanité chromatografické metody. Prostřednictvím HPLC byla přítomnost salidrosidu a *p*-tyrosolu dokázána v podzemních částech rhodioly. Jednalo se o chromatografii na reverzních fázích, kdy stacionární fázi tvořil Nova-Pak C18, mobilní pak 6,5% roztok metanolu ve vodě. Detekce byla prováděna UV detektorem při 225 nm<sup>76, 77</sup>.

V těchto podzemních částech rostliny byly též sledovány změny v obsahu salidrosidu a tříslovin v průběhu ontogeneze rostliny<sup>78</sup>.

HPLC bylo též použito při studiu rostlin rostoucích v provincii Quinghai. Jako stacionární fáze byl použit Spherisorb C18 (5µm) na koloně 4,6 mm x 250 mm. Mobilní fázi tvořila směs methanol-voda (20:80), použita byla UV detekce při 223 nm. Tato metoda se ukázala jako jednoduchý a proveditelný způsob stanovení salidrosidu, navíc prokázala, že jeho obsah se v jednotlivých druzích rhodioly liší<sup>79</sup>. Obsah salidrosidu a lotaustralinu byl v *R. rosea* sledován též pomocí plynové chromatografie<sup>80</sup>.

Jednodušší a pohotovější metodou pro studium obsahu salidroside v rostlinném materiálu se ukázala tenkovrstvá chromatografie spojená s UV-spektrofotometrií, tzv. densitometrie<sup>81</sup>. Jelikož žádná chromatografická metoda se neobejde bez kvalitního standardu, byly též zkoumány možnosti přípravy referenčního standardu salidroside a *p*-tyrosolu<sup>82</sup>. Pro potvrzení chemické struktury byla na některých pracovištích provedena jeho totální syntéza<sup>83</sup>.

Kromě salidroside obsahuje *R. rosea* i celou řadu dalších biologicky aktivních látek. Týmu čínských vědců se podařilo izolovat z kořenů rozchodnice v té době nový flavonoid herbacetin-8-*O*- $\alpha$ -D-lyxopyranosid, jeho struktura byla potvrzena UV, IR, MS a <sup>13</sup>C-NMR spektrální analýzou. Mimo něj zde byly nalezeny 4'-methoxy-herbacetin, rhodiolin, dihydrokempferol, daukosterol, *p*-tyrosyl a salidroside<sup>84</sup>. Z kořenů tohoto druhu byl také izolován nový glukosid fastigitin A (derivát 3-methyl-methylpinalové kyseliny). Jeho struktura byla stanovena spektrálními metodami<sup>85</sup>.

V ethanolovém a butanolovém extraktu z kořenů s oddenkem rozchodnice volně rostoucích v Číně byl pomocí sloupcové chromatografie na polyamidu a silikagelu izolován glykosid cinnamylalkoholu – rosavin. Identifikován byl pomocí chemické analýzy a UV a <sup>13</sup>C-NMR spekter<sup>86</sup>.

U rozchodnic, rostoucích v provincii Xinjiang bylo sledováno množství stopových prvků a některých aminokyselin. Bylo zjištěno, že výskyt těchto látek je druhově proměnlivý a že optimální obsah stopových prvků a aminokyselin se nachází u druhu *R. rosea*, což koresponduje s jejím využíváním v TCM<sup>87</sup>.

Obsah stopových prvků v rostlinách byl sledován také spektrofotometricky ve studii s 52 druhy dalších rostlin. Bylo zjištěno, že asi v 56 % ze sledovaných druhů se tyto prvky vyskytují v hojné míře, hlavně skupiny Fe, Cu, Co, Cr a Mn. Bylo také zjištěno, že se tyto stopové prvky podílí jako katalyzátory na metabolismu řady fenolových látek, vyskytujících se v rostlinách<sup>88</sup>.

Dalšími látkami studovanými v kořenech v Norsku pěstovaného druhu *Rhodiola rosea*, byly terpeny a silice. Látky byly izolovány destilací s vodní parou a analyzovány pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrografie. Bylo zjištěno, že suchá droga obsahuje 0,05 % silice, složené z monoterpenů, terpenických a alifatických alkoholů. Z nich pak je

nejvíce zastoupen dekanol, geraniol a 1,4-*p*-methadien-7-ol. Bylo také zjištěno, že zde už dříve jmenované látky – geraniol, spolu s geranyl-acetátem, geranyl-formiátem a benzylalkoholem jsou zodpovědné za růžovou vůni extraktu <sup>89</sup>.

## 5.4 Biologická aktivita

Při sledování biologické aktivity rozchodnice (rozchodnic) byly sledovány kromě čistých látek v převažujícím počtu případů kořeny s oddenky, protože z lidového léčitelství se ukázalo, že právě tato morfologická část je biologicky (terapeuticky) účinná. Extrakty z nati, ani její obsahové látky popisovány nejsou.

### 5.4.1 Antioxidační aktivita

Schopnost reagovat s volnými kyslíkovými radikály, neutralizovat je a tím chránit organismus před jejich reaktivitou vykazuje řada látek přírodního původu. *Rhodiola rosea* je bohatá na fenolové látky, o nichž je známo, že mají silné antioxidační vlastnosti <sup>90, 91</sup>. Polarograficky byl sledován významný „neutralizační“ efekt extraktu z *Rhodiola rosea* (zvláště pak solidrosidu) na O<sub>2</sub><sup>•</sup> a OH<sup>•</sup> volné radikály <sup>92</sup>. Byla též provedena srovnávací studie fytochemických a farmakologických vlastností etanolových extraktů tohoto druhu. Studie prokazují, že extrakty z kořenů a oddenků obsahují zvýšené množství *o*-dihydroxyfenolů a vykazují vysokou antioxidační aktivitu <sup>93, 94</sup>.

Antioxidační aktivita byla také sledována u různých tkáňových kultur druhu *Rhodiola rosea*. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval ethanolový extrakt připravený z 1,5ročního kalusu, který dle následné HPLC analýzy obsahoval kyselinu kávovou a triandrin <sup>95</sup>.

Studie na zvířatech ukázaly, že *Rhodiola rosea* snižuje toxicitu cyklofosfamidu, rubomycinu a adriamycinu (léčiv proti zhoubnému bujení), přičemž zvyšuje jejich antikarcinogenní účinky <sup>96, 97</sup>.

Antioxidační aktivitou *Rhodiola rosea* se zabývala studie *in vitro* účinků vodného extraktu kořenů na lidské erytrocyty vystavené oxidačnímu stresu vyvolaném kyselinou chlornou (HClO). Chování lidských erytrocytů bylo sledováno v podmínkách zvyšujících se dávek vodného roztoku a v různých experimentálních podmínkách (ko-inkubace a následné

inkubace). Vyhodnocení antioxidační kapacity bylo provedeno pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM). Získané výsledky jsou v souladu s antioxidační aktivitou vodného extraktu *Rhodiola rosea* za přítomnosti oxidantu. Expozice extraktu bez přítomnosti indukovaného stresu však vyvolala závažné změny na erytrocytech <sup>98</sup>.

Byl studován účinek 75% etanolového extraktu *Rhodiola rosea* na kyslíkové radikály, chelataci některých kovových iontů a redukční aktivitu. 75% etanolový extrakt vykazoval vyšší účinek na 2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát) (ABTS) a RONS, než výluh. Aktivita v odstraňování hydroxylového radikálu (IC<sub>50</sub>) u vodného extraktu a 75% ethanolového extraktu byly 1,1 a 1,8 mg/ml, v daném pořadí, což ukazuje, že vodný extrakt odstraňoval hydroxylové radikály produkované Fentonovou reakcí účinněji než 75% ethanolový extrakt vzhledem k hydrofilní vlastnosti flavonoidových sloučenin ve vodném extraktu.

U kovo-chelatačních aktivit obou extraktů zvýšených lineárně v závislosti na koncentraci (5–10 mg/ml), vodný extrakt vykázal vyšší aktivitu než 75% ethanolový extrakt. Snížení účinku obou *Rhodiola rosea* extraktů se zvyšuje s rostoucí koncentrací v rozmezí 5–20 mg/ml, přičemž 75% ethanolový extrakt vykazuje větší snížení antioxidační aktivity než výluh. Silné antioxidační aktivity vodného a 75% ethanolového extraktu na Cu<sup>2+</sup> indukovanou oxidaci lidského lipoproteinu o nízké hustotě (LDL) byly pozorovány při koncentraci 20 mg/ml. Ochranné účinky obou extraktů na peroxylovým radikálem indukované poškození DNA vlákna jsou však mnohem slabší <sup>99</sup>.

#### 5.4.2 Adaptogenní aktivita

Definice adaptogenu:

- a) Adaptogen vyvolává nescifickou odpověď, tj. zvýšení odolnosti vůči několika stresovým faktorům zahrnujícím v to faktory fyzikální, chemické a biologické.
- b) Adaptogen má normalizující vliv na fyziologii bez ohledu na to, v jakém směru od normálu stresor působí.
- c) Adaptogen nezasahuje do normálního fungování organismu více, než je nutné ke zvýšení nescifické odolnosti <sup>100</sup>.

Při těchto studiích byly u pokusných zvířat sledovány změny metabolismu látek v mozku, játrech, krvi a kosterním svalstvu ve vztahu k podání testované látky. Při současné aplikaci extraktu a následné fyzické zátěži docházelo k snížení glykolýzy, snížila se hladina kyseliny mléčné ve svalech, naopak vzrostla hladina sacharidů v krvi a fosfolipidů ve svalech a játrech. Zlepšila se také fyzická výkonnost pokusných zvířat v jednotlivých experimentech. Ukázalo se, že proti dřívějším předpokladům, které přisuzovaly adaptogenní aktivitu pouze rhodiolosidu a *p*-tyrosolu, tuto aktivitu vykazuje i celá řada dalších látek, hlavně rosavin, rosarin, rosirin a cinnamylalkohol<sup>1</sup>.

Extrakt z rozchodnice růžové chrání mozek a srdce tím, že snižují sekreci kortikotropin uvolňujícího faktoru (CRF) při stresové zátěži<sup>101, 102</sup>.

Byl studován vliv extraktu z *Rhodiola rosea* u výkonostního testu na laboratorních zvířatech. Při testu plavání „na výdrž“ se doba plavání prodloužila o 135-159 %. Zvýšení výkonu se výrazně projevilo po celou dobu podávání extraktu<sup>103</sup>.

Dva pokusy naznačují možný přínos v zlepšení paměti a schopnostech učení laboratorních zvířat. Extrakt *Rhodiola rosea* byl podáván orálně, v dávce 0,1 ml/den, po dobu 10 dnů. Byla testována schopnost uchování informace v paměti pomocí testu pasivního obcházení překážek s elektrošoky<sup>104</sup>.

### 5.4.3 Neurotropní aktivita

Centrálně stimulační účinky extraktů různých druhů rozchodnic jsou známé již historicky z lidového léčitelství. Největší účinek měl sumární extrakt připravený 40% ethanolem, v některých případech byl účinnější než extrakt z ženšenu. Studium extraktu, rhodiolosidu a *p*-tyrosolu ukázalo, že účinnost v této řadě klesá, což naznačuje, že v extraktu jsou přítomny ještě další látky, potencující stimulační účinek<sup>1</sup>.

Některé látky získané z rozchodnice vykazovaly protektivní účinek na mozkové buňky. Rhodosin byl podáván laboratorním krysám s indukovanou Alzheimerovou chorobou. U krys pak byla sledována schopnost učit se a pamatovat si v několika standardních biologických testech naučené prvky chování. Po usmrcení byly zkoumány morfologické a

biochemické změny v mozkové tkáni. Experimenty ukázaly, že u krys s Alzheimerovou chorobou podávání rhodosinu významně zlepšilo jejich mentální schopnosti.

Biochemické studie pak prokázaly zvýšení obsahu acetylcholinu, acetylcholintransferasy a superoxiddismutasy v mozkové kůře, histologický výzkum pak ukázal zpomalení degenerace pyramidálních neuronů v mozkové kůře a hipokampu. Výsledky studie tedy ukazují, že rhodosin zpomaluje stárnutí mozkových buněk a dá se použít v prevenci a léčbě mozkové demence <sup>105</sup>.

Kromě pokusů na laboratorních zvířatech bylo prováděno i klinické testování u lidí. Skupině ruských studentů byl podáván rhodaxon, adaptogenní přípravek získaný extrakcí z kořenů *Rhodiola rosea*, byl prováděn zátěžový test na cyklotrenažéru a sledována jejich psychická výkonnost. Ukázalo se, že podáním rhodaxonu došlo k zvýšení fyzické výkonnosti, snížení psychického vyčerpání a zlepšení nálady <sup>106</sup>.

Byla provedena také klinická randomizovaná dvojitě zaslepená studie, kdy byl skupině vojenských kadetů podáván standardizovaný extrakt z rozchodnice ve dvou různých dávkách a byl sledován jeho vliv na mentální činnost v období psychického vypětí za současného měření základních fyziologických parametrů. Studie prokázala statisticky významné zlepšení mentálních funkcí u skupiny medikované extraktem z rozchodnice proti skupině užívající placebo <sup>107</sup>.

#### **5.4.4 Účinek na kardiovaskulární systém**

Bylo prokázáno, že *Rhodiola rosea* chrání před poškozením a dysfunkcí kardiovaskulární tkáně indukovaným stresem.

Na izolovaném krysím srdci byl prováděn experiment, při kterém byl podáván extrakt z *Rhodiola rosea* v dávce 3,5 mg/kg extrakt příznivě ovlivňoval prokrvení koronárních cév myokardu v kontrakční fázi. Taktéž zlepšoval prokrvení a kontraktilitu myokardu po ischemii. I. v. podání naloxonu celkově zrušilo pozitivní účinky extraktu na perfuzi i kontraktilitu myokardu. Usuzuje se, že protektivní účinek extraktu z *Rhodiola rosea* může být spojen se zvýšením hladiny endogenních opioidů <sup>108</sup>.

Jedna pracovní skupina se také zabývala studiem vlivu extraktu na srdeční arytmie vyvolané podáním epinefrinu. Byl zaznamenán významný antiarytmický efekt extraktu. Po blokádě  $\mu$ - a  $\delta$ -opioidních receptorů byl antiarytmický účinek extraktu redukován. Předpokládá se, že tyto účinky extraktu jsou spojeny s aktivací opioidního systému a stimulací  $\kappa$ -opioidních receptorů <sup>109</sup>.

Tým čínských vědců testoval účinek salidrosidu na buňky hladké svaloviny pulmonální arterie krys, po experimentálně navozené 24hodinové hypoxii. Ukázalo se, že salidrosid má schopnost inhibovat hypoxií navozenou proliferaci těchto buněk; mechanismem účinku je pravděpodobně zabránění zvyšování hladiny intracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  iontů uvolňujících se při hypoxii <sup>110</sup>.

Byl také studován vliv extraktu z rozchodnice na hladinu krevních lipidů u krys s dietou obsahující 20 % kyseliny linolenové. Výzkum ukázal, že testovaná skupina, které byl podáván lyofilizovaný extrakt z *Rhodiola rosea*, vykazuje zvýšení aktivity některých jaterních enzymů, snížení hladiny cholesterolu v plasmě spolu se zvýšenou exkrecí cholesterolu do stolice. Výsledky tedy podporují teorii, že extrakt z *Rhodiola rosea* může být úspěšně používán v prevenci i léčbě krevní dyslipidemie <sup>111</sup>.

#### 5.4.5 Hepatoprotektivní aktivita

Krysám s experimentálně vyvolanou toxickou hepatitidou, byl podáván rozchodnicový extrakt (*Rhodiola rosea*) a byla sledována funkčnost jejich jater. Extrakt prokazoval normalizující účinek na aktivitu enzymů jako je aspartát aminotransferasa a alkalická fosfatasa <sup>112</sup>.

Stejně tak příznivě ovlivňoval hladinu peptidů se střední molekulovou hmotností, močoviny a bilirubinu, a naopak snižoval aktivitu alaninaminotransferasy a glutathion-S-transferasy v krevní plasmě krys <sup>112</sup>. Relativně výrazné hepatoprotektivní vlastnosti byly zjištěny u jednotlivých čistých látek – jsou seřazeny dle vzrůstající aktivity: rhodiolosid, extrakt, rosin, rosavin, daukosterin, rosiridin a cinnamylalkohol <sup>1</sup>.

#### 5.4.6 Ostatní účinky

U testované skupiny krys, kterým bylo podáváno několik druhů antioxidantů a rostlinných extraktů včetně extraktu z *Rhodiola rosea*, byly po následné expozici rentgenovým zářením sledovány morfologické a biochemické změny na tenkém střevu testovaných krys. Ukázalo se, že extrakt z rozchodnice vykazuje protektivní účinek na buňky tenkého střeva a chrání je před poškozením působením Roentgenova záření <sup>113</sup>.

Jiný experiment se zabýval studiem inhibiční aktivity extraktu z *Rhodiola rosea* na uvolňování histaminu z buněk peritonea, indukovaného reakcí antigen-protilátka. Z methanolového extraktu z kořenů rozchodnice, který vykazoval tuto inhibiční aktivitu, byl izolován nový kyanogenní glykosid – rhodiokyanosid D a dva nové monoterpenické glykosidy - sakranosid A a B. Dále bylo izolováno dalších 8 již známých látek kyanogenních glykosidů. Rhodiocyanosid A, heterodendrin, lotaustralin (kyanogenní glykosid odvozený od aminokyselin valinu a isoleucinu), rhodiolosid, 2-phenylethyl alpha-L-arabinopyranosyl(1-->6)-beta-D-glucopyranosid, 2-methyl-3-buten-2-yl beta-D-glucopyranosid, kenposid A, and rhodioctanosid. Biologické testy ukázaly, že nejsilnější inhibiční účinek na uvolňování histaminu mají z izolovaných látek lotaustralin a rhodioctanosid <sup>114</sup>.

V experimentální farmakologii bylo požíváno kromě čistých izolovaných látek také několik typů extraktů z oddenků, např. tinktury, rodozin (jedná se o částečně vyčištěný extrakt) a vodně alkoholické extrakty s různým obsahem alkoholu. Jako nejúčinnější se ukázal tekutý extrakt připravovaný perkolací drogy 40% ethanolem, jak už zde bylo na jednom místě řečeno. Těžiště jeho použití pak spočívá jako stimulans CNS u pacientů trpících neurastenií, neurózami či depresemi, pro zlepšení vnímání, paměti, u pacientů v rekonvalescenci po chirurgických zákrocích, při léčbě parkinsonismu, u lehké formy diabetu nebo při zvýšené psychické zátěži <sup>65</sup>.

*Rhodiola rosea* se ukázala být užitečná i pro řadu nemedicínských použití. Pro své inhibiční vlastnosti na enzymy tyrosinasy a hyaluronidasu obsažené v kůži a pro svou antioxidační aktivitu, je extrakt z rhodioly používán jako součást kosmetických, dermatologických přípravků využívaných v péči o pokožku <sup>115</sup>. Extrakt rovněž slouží jako



přísada pro přípravu bioaktivních a nealkoholických nápojů <sup>116</sup>. Kořeny *Rhodiola rosea* jsou také součástí některých čajových směsí <sup>117</sup>.

## **IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **1 Všeobecné postupy**

#### **1.1 Rozpouštědla**

Rozpouštědla pro běžnou chromatografii a další práci byla použita komerční; před zahájením experimentů však byla znova destilována. Po odstranění předního podílu a při konstantní tabulkové teplotě varu bylo jímáno 95-97 % objemu kapaliny.

Rozpouštědla pro HPLC byla použita komerční, bez dalších úprav.

#### **1.2 Příprava silikagelu pro sloupcovou chromatografii**

Silikagel byl aktivován v sušárně při 160 °C ve vrstvě nižší než 2 cm po dobu 4 hod. Horký adsorbent byl umístěn do dobře těsnící zabroušené baňky a po vychladnutí byla provedena deaktivace adsorbentu přidávkem 10 % destilované vody.

#### **1.3 Sloupcová chromatografie**

Chromatografická kolona byla připravena nalitím suspenze adsorbentu připravené ve vhodném rozpouštědle při současně mírně otevřeném odtoku kolony. Po naplnění byl na hladinu nanesen suchý roztěr vzorku s adsorbentem. Sloupcová chromatografie byla prováděna způsobem stupňovité eluce.

#### **1.4 Kontrolní tenkovrstvá chromatografie (TLC)**

Byla prováděna vzestupným způsobem v chromatografických komorách, sycených cca 30 min. parami eluční soustavy. Byly použity komerční chromatografické desky Silica gel® Merck 200 x 200 mm s indikátorem pro UV 254 nm nebo bez něho; destičky potřebné velikosti byly připraveny nastřiháním.

### **1.5 Stanovení sušiny**

Asi 10 g zmražené čerstvé rostlinné části nařezané na cca 2-3 mm kousky bylo přelito tekutým dusíkem. Při občasném promíchání a odpaření dusíku byla zmražená čerstvá tkáň rozemleta rychle na vysokoobrátkovém mlýnku IKA A11 Basic za přídavku malého množství dusíku. Po 2 minutách (odpaření zbytku kapalného dusíku) byl odvážen 1 g homogenátu přesně do váženek a provedeno stanovení sušiny obvyklým způsobem při 105 °C po dobu 120 minut.

### **1.6 Odpařování frakcí**

Roztoky byly odpařovány za sníženého tlaku (cca 1,6 kPa) a teploty do 50 °C na vakuové rotační odparce, nebo v destilační aparatuře za použití kapiláry.

### **1.7 Krystalizace látek**

Látky v právě potřebném množství pro analýzu byly krystalizovány z nasycených roztoků v ampulce snížením teploty a s využitím Svobodovy krystalizační techniky.

Látky byly sušeny za sníženého tlaku (při tlaku cca 1 – 1,4 kPa) nad vysušenými perlami silikagelu jako sušidla, buď v exsikátoru anebo v sušícím zařízení dle Abderhaldena.

## 2 Potřeby

### 2.1 Rozpouštědla a plyny

Aceton č. (Me<sub>2</sub>CO) (Penta s. r. o.)

Acetonitril p. a. (MeCN) (Sigma-Aldrich)

Butan-1-ol (*n*-Butanol) č. (BuOH) (Penta s. r. o.)

Destilovaná voda

Diethylether č. (Et<sub>2</sub>O) (Penta s. r. o.)

Ethanol (denaturovaný 5 % methanolu) č. (EtOH) (Lihovar Kolín)

Ethylester kyseliny octové (Ethyl-acetát č.; EtOAc) (Penta s. r. o.)

Ethylester kyseliny mravenčí (Ethyl-formiát č.; HCOOEt) (Penta s. r. o.)

Chloroform č. (CHCl<sub>3</sub>) (Penta s. r. o.)

Methanol č. (MeOH) (Penta s. r. o.)

Toluen p. a. (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>) (Penta s. r. o.)

Argon 5.0 (Linde Technoplyn, Hradec Králové)

Dusík 5.0 (Linde Technoplyn, Hr. Králové)

### 2.2 Chemikálie

2,6-dibromchinonchlorimid p. a. (Sigma-Aldrich)

4-aminoantipyrin p. a. (Sigma-Aldrich)

Anhydrid kyseliny octové p. a. (Penta s. r. o.)

Anilin p. a. (destilovaný) (Sigma-Aldrich)

Bromkresolová červeň č. (Sigma-Aldrich)

Bromkresolová zeleň č. (Sigma-Aldrich)

DPPH č. (Sigma-Aldrich)

Dusitan sodný p. a. (Penta s. r. o.)

Ethylester kyseliny gallové p. a. (Sigma-Aldrich)

Ferrikyanid draselný p. a. (Penta s. r. o.)

Glukosa ČsL 4 (Dr. Kulich Pharma s. r. o.)

Hydroxid sodný p. a. (Penta s. r. o.)

Chlorid antimonitý p. a. (Sigma-Aldrich)  
Chlorid hlinitý p. a. (Penta s. r. o.)  
Chlorid železitý hexahydrát p. a. (Penta s. r. o.)  
Chlorid hydroxylamonný p. a. (Sigma-Aldrich)  
Kyselina fosfomolybdenová p. a. (Sigma-Aldrich)  
Kyselina fosfowolframová p. a. (Sigma-Aldrich)  
Kyselina gallová monohydrát p. a. (Sigma-Aldrich)  
Kyselina chlorovodíková 36% p. a. (Penta s. r. o.)  
Kyselina mravenčí 85% p. a. (HCOOH) (Penta s. r. o.)  
Kyselina mravenčí 100% pro LC/MS (VWR)  
Kyselina *p*-toluensulfonová p. a. (Sigma-Aldrich)  
Kyselina sírová 98% p. a. (Penta s. r. o.)  
Kyselina sulfanilová p. a. (Sigma-Aldrich)  
Manganistan draselný p. a. (Penta s. r. o.)  
Methanol pro LC/MS (VWR)  
Methylester kyseliny gallové p. a. (Sigma-Aldrich)  
Peroxid vodíku 35% p. a. (Dr. Kulich Pharma s. r. o.)  
Síran sodný p. a. (Penta s. r. o.)  
Síran vápenatý dihydrát č. (Penta s. r. o.)  
Uhličitan draselný p. a. (Penta s. r. o.)  
Uhličitan sodný p. a. (Penta s. r. o.)  
Vanilin p. a. (Sigma-Aldrich)  
Voda superčistá pro HPLC (FaF UK)

## 2.3 Činidla

### 2.3.1 Detekční činidla

#### D 1: Vanilinové činidlo <sup>118</sup>

Činidlo bylo připraveno těsně před detekcí smícháním roztoku 1% vanilinu v 95% EtOH s 98% kyselinou sírovou v poměru 10 : 1. Po postřiku činidlem byl chromatogram zahříván při teplotě 120 °C asi 7 min. Pozitivní reakce se projevují různým zbarvením skvrn.

**D 2:** Ferrikyanid draselný – chlorid železitý <sup>119</sup>

Bezprostředně před použitím byla smíchána stejná objemová množství 1% roztoku ferrikyanidu draselného a 2% roztoku chloridu železitého. Pozitivní reakce se projevuje po postřiku modrým zbarvením skvrn.

**D 3:** Kyselina fosfomolybdenová <sup>118, 119</sup>

Po postřiku 10% ethanolovým roztokem kyseliny fosfomolybdenové byl chromatogram zahříván při teplotě 120 °C asi 5 min. Pozitivní reakce se projevuje vznikem modrých skvrn na žlutém pozadí.

**D 4:** Paulyho činidlo <sup>118, 119</sup>

4,5 g kyseliny sulfanilové bylo za tepla rozpuštěno ve 4,5 ml kyseliny chlorovodíkové koncentrace 12 mol/l) a zředěno vodou na 500 ml. 10 ml tohoto roztoku bylo ochlazeno v chladničce a pak bylo k němu přidáno 10 ml ochlazeného 4,5% roztoku dusitanu sodného. Získaný roztok byl ponechán 15 min v chladničce. Bezprostředně před použitím byl smíchán s 20 ml 10% roztoku uhličitanu sodného. Pozitivní reakce se projevuje vznikem oranžově až červeně zbarvených skvrn.

**D 5:** Bromkresolová zeleň <sup>118, 119</sup>

Jedná se o 0,3% roztok bromkresolové zeleně v 80% metanolu. Do roztoku bylo přidáno několik kapek 30% vodného roztoku hydroxidu sodného (na 100 ml činidla cca 8 kapek) až do změny barvy – vzniku sodné soli. Kysele reagující látky se projevují vznikem žlutých skvrn na zeleném pozadí.

**D 6:** Hydroxid draselný <sup>118, 120</sup>

Po postřiku 5% p. a. roztokem hydroxidu draselného byl chromatogram detekován ozářením UV světlem o vlnové délce 254 nm. Pozitivní reakce se vyznačuje zelenou až tmavě modrou fluorescencí po ozáření UV světlem.

**D 7:** Bromkresolová červeně <sup>118, 119, 120</sup>

0,04 g bromkresolové červeně bylo rozpuštěno v 50% ethanolu a pH upraveno na hodnotu 10,0 použitím roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,1 mol/l. Chromatogramy byly po vyvinutí zahřívány 10 min při teplotě 100 °C a po vychladnutí postříkány činidlem. Pozitivně reagující látky vytvářejí žluté skvrny na modrém pozadí.

**D 8:** Peroxid vodíku <sup>118, 119, 120</sup>

Činidlo je tvořeno 0,3% vodným roztokem peroxidu vodíku. Pozitivní reakce se projevuje intenzivním modrým zbarvením skvrn po postřiku.

**D 9:** Glukóza – anilin <sup>118, 120, 121</sup>

Činidlo bylo připraveno smísením 20 ml roztoku A a 20 ml roztoku B těsně před detekcí a zředěním na 100 ml n-butanolem. Roztok A je 10% vodný roztok glukosy, roztok B je 10% ethanolový roztok anilinu. Po postřiku byl chromatogram zahříván 10 min při 125 °C. Pozitivní reakce se projevuje vznikem hnědých skvrn na béžově-šedém pozadí.

**D 10:** Chlorid hlinitý <sup>118, 119, 120</sup>

Jedná se o 1% roztok chloridu hlinitého v ethanolu. Po postřiku a ozáření UV světlem o vlnové délce 366 nm vykazují skvrny žlutou fluorescenci.

**D 11:** 4-Aminoantipyrin – ferrikyanid draselný<sup>118, 119, 120</sup>

Roztok A je 2% 4-aminoantipyrin v ethanolu.

Roztok B je 8% vodný roztok ferrikyanidu draselného.

Chromatogram byl postříkán nejdříve roztokem A a poté roztokem B. Následně byl v chromatografické komoře vystaven parám 25% hydroxidu amonného. Pozitivní reakce se projevuje vznikem červenooranžových skvrn na bledě žlutém pozadí.

**D 12:** Manganistan draselný neutrální<sup>118, 119, 120</sup>

Jedná se o 0,05% vodný roztok manganistanu draselného. Po postřiku chromatogramu se pozitivní výsledek projevuje vznikem okrových skvrn na růžovém pozadí.

**D 13:** Kyselina *p*-toluensulfonová<sup>119, 121</sup>

Činidlo je tvořeno 20% roztokem kyseliny *p*-toluensulfonové v chloroformu. Chromatogram byl po postřiku zahříván několik minut při teplotě 100 °C. Pozitivní reakce se projevuje žlutou fluorescencí při ozáření UV světlem o vlnové délce 366 nm.

**D 14:** Hydroxylamin – chlorid železitý<sup>119, 121</sup>

Roztok A: 20 g hydroxidu draselného bylo rozpuštěno v 50 ml destilované vody a doplněno do 200 ml ethanolu.

Roztok B: 50 g hydroxidu draselného bylo rozpuštěno v destilované vodě a doplněno do 500 ml ethanolu.

1. Postřík: Roztoky A a B byly smíchány v poměru 1 : 2 a vysrážený chlorid draselný byl odfiltrován.

2. Postřík: 10 g hexahydrátu chloridu železitého bylo rozpuštěno v 20 ml 36% kyseliny sírové a protřepáno s 200 ml diethyletheru.

Po aplikaci 1. postřiku byl chromatogram usušen při pokojové teplotě a následně byl použit 2. postřík. Pozitivní reakce se projevuje vznikem fialově zbarvených skvrn.



**D 15:** 2,6-Dibromchinonchlorimid <sup>119, 121</sup>

Činidlo je tvořeno 0,4% ethanolovým roztokem 2,6-dibromchinonchlorimidu. Po postřiku byl chromatogram vložen do komory s parami 25% roztoku hydroxidu amonného. Pozitivní reakce se projevuje vznikem modře zbarvených skvrn.

**D 16:** Chlorid antimonitý <sup>119, 121</sup>

25 g chloridu antimonitého bylo rozpuštěno v 7,5 g chloroformu. Po postřiku byl chromatogram zahříván 10 min. při teplotě 100 °C. Pozitivní reakce se projevuje různě zbarvenou fluorescencí po ozáření UV světlem o vlnové délce 366 nm.

**D 17:** Fosfowolframová kyselina <sup>119, 121</sup>

Činidlo tvoří 20% roztok kyseliny fosfowolframové. Po postřiku byl chromatogram zahříván při teplotě 120 °C. Pozitivní reakce se projevuje vznikem různě zbarvených skvrn.

**D 18:** Anhydrid kyseliny octové - kyselina sírová <sup>119, 121</sup>

Činidlo bylo vytvořeno smícháním 5 ml acetanhydridu s 5 ml kyseliny sírové za průběžného míchání a chlazení. Roztok byl doplněn do 50 ml ethanolu. Chromatogram byl po postřiku zahříván 10 min při teplotě 100 °C. Pozitivní reakce se projevuje barevnou fluorescencí po ozáření UV světlem o vlnové délce 366 nm.

### 2.3.2 Činidla pro kvantitativní analýzu

Činidlo Folin-Ciocalteuovo (Sigma-Aldrich)

Ethanol 50% v/v

## 2.4 Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S 1: Tol – HCOOEt - HCOOH = 5 : 4 : 1

S 2: Tol – CHCl<sub>3</sub> – Me<sub>2</sub>CO = 40 : 25 : 35

S 3: CHCl<sub>3</sub> – EtOH – C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> = 90 : 10 : 5

S 4: CHCl<sub>3</sub>

## 2.5 Chromatografické adsorbenty

Oxid hlinitý neutrální 0,1 – 0,3 mm, st. Akt. III. (Brockmann)

Silikagel L 0,1 – 0,2 mm (Lachema), desaktivovaný na 10% obsah vody

Silikagel použitý k chromatografii byl upraven z obchodního preparátu. Byl přesítován, vyčištěn chloroformem p. a. a vysušen. Poté 4 hod aktivován v sušárně při teplotě 160 °C. Po vychladnutí byl desaktivován na 10% obsah vody.

Silikagel LS 5/40 μm

Silikagel LS byl připraven homogenizací směsi 87 g silikagelu L a 13 g hemihydrátu síranu vápenatého.

Silikagel LS 5/40 μm s UV indikátorem pro λ=254 nm

Silikagel byl připraven z 96,5 g Silikagelu LS 50/40 a 3,5 g indikátoru pro UV λ=254 nm.

Silica gel Merck® UV 254 nm, bez indikátoru, základní desky 200 x 200 mm

## 2.6 Přístroje a software

FIALab 3000 (FIALab Instruments Inc., USA)

Kapalinový chromatograf Waters Autopurification™ HPLC MS Systm (Milford, USA)

Mikrovýhřevný stolek Boetius (Wägetechnik Rapido, Dresden)

Mlýnek IKA A11 Basic (Fisher Scientific)

Rotační vakuová odparka Heidolph – Hei-Vap G1 (Fisher Scientific)

Spectrophotometer Shimadzu UV-1601 (Shimadzu)

Spectrometer Varian S500 (Palo Alto, USA)

Ultrazvuková lázeň Sonorex 10P (Fisher Scientific)

FIALab software for Windows

Prism 5.02 Statistical Software (GraphPad)

UV Probe software for Spectrophotometer Shimadzu UV-1601

## **2.7 Metody stanovení základních fyzikálně chemických charakteristik a struktury**

### **2.7.1 Měření teploty tání**

Teplota tání byla stanovena na mikrovýhřevném stolku Boetius a je nekorigovaná. Izolované látky i odpovídající referenční substance byly vysušeny ve vakuovém exsikátoru po dobu 24 hod. a tlaku cca 1,5 kPa.

### **2.7.2 Hmotnostní spektrometrie izolovaných látek**

Způsob provedení je uveden v oddíle IV/2.8.3.

### **2.7.3 Nukleární magnetická rezonance**

Měření bylo provedeno na spektrometru Varian S500 (499,87 MHz pro  $^1\text{H}$  jádra, 125,70 pro  $^{13}\text{C}$  jádra) v roztocích v  $\text{CDCl}_3$ . K ozáření a detekci signálu byla použita OneNMR širokopásmová dvoukanálová gradientová sonda s regulací teploty. Chemické posuny byly měřeny jako hodnoty  $\delta$  (ppm) a byly nepřímo vztaženy k TMS jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Hodnoty chemického posunu pro  $\text{CDCl}_3$  jsou u atomů  $^1\text{H}$   $\delta = 7,26$  ppm a u atomů  $^{13}\text{C}$   $\delta = 77,0$  ppm. Zkratky jsou následující – *s*: singlet, *d*: dublet, *t*: triplet, *q*: kvartet, *brs*: široký singlet.

## 2.8 Stanovení parametrů antioxidantů<sup>38</sup>

### 2.8.1 Stanovení celkových fenolových látek (FC)

Obsah tohoto typu sekundárních metabolitů v jednotlivých typech extraktů a výtřepků byl stanoven Folin-Ciocalteuovým činidlem (viz kap. III/2.2) a výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalenty kyseliny gallové. Pro přípravu kalibrační křivky se 0,25 ml alikvotních koncentrací 0,025-0,25 mg/ml ethanolových roztoků kyseliny gallové (50% EtOH) bylo smíseno s 1,25 ml 10x zředěného činidla FC a 1,0 ml 7,5 % roztoku uhličitanu sodného. Absorbance byla odečtena po 30 min. při obvyklé teplotě místnosti při 765 nm (Spectrophotometer Shimadzu UV-1601, software UV Probe). 0,25 ml ethanolového roztoku extraktů (výtřepků) o koncentraci 1,0 mg/1,0 ml, 50% EtOH) bylo smícháno se stejnými činidly, jak jsou uvedena výše a měření provedeno za stejných podmínek (30 min., obvyklá teplota, 765 nm). Všechna měření byla provedena třikrát. Celkový obsah fenolových látek byl zjištěn z kalibrační křivky s využitím software UV Probe a vyjádřen jako ekvivalenty kyseliny gallové na 1 mg extraktu (GAE/mg).

### 2.8.2 DPPH test

Radikálová zhášecí aktivita extraktů (výtřepků) byla hodnocena DPPH testem (2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál) pomocí SIA metody (PC\_kontrolovaný systém sekvenční injekční analýzy vyvinuté na Farmaceutické fakultě UK v Hr. Králové)<sup>122</sup>. Tato automatizovaná metoda je založena na známé reakci stabilního DPPH radikálu s antioxidanty; při zhášecí reakci dochází ke snížení intenzity zbarvení roztoku radikálu, resp. poklesu absorbance (525 nm), což koreluje s koncentrací antioxidantu v analyzovaném roztoku.

Zásobní roztok analyzované látky (1,0 mg/1,0 ml; 50% EtOH); 50% EtOH byl použit pro potřebné ředění zásobního roztoku (0,5; 0,25; 0,1 mg/ml roztoku). 0,1 mM roztok DPPH byl připraven rozpuštěním 3,90 mg DPPH ve 100 ml 50% EtOH. Všechna rozpouštědla použitá pro analýzu byla degasována 10min. sonikací na přístroji Sonorex 10P při stupni sonikace 10.

Aktivita zhášení DPPH radikálů DPPH radikálu byla měřena na analyzátoru FIALab 3000 (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA) řízeném PC (prostřednictvím softwaru FIALab pro Windows), vybaveném 2,5 ml injekční pumpou, šestibranovým volicím ventilem, USB2000-UV/VIS spektrofotometrem se světelným zdrojem LS-1 (Ocean Optics, USA) a průtokovou kvyetou SMA-Z (délka dráhy 1 cm); objem zadržovací cívky byl 0,6 ml a připojovací trubice PTFE (Watrex, Praha, ČR) měla průměr 0,72 mm.

Zhášecí aktivita byla matematicky vyjádřena zhášecím indexem (Quenching index) %QDPPH vyjadřujícím procentuální pokles absorbance roztoku DPPH po přidání antioxidantu. %QDPPH byl vypočten podle vzorce:

$$\%Q_{DPPH} = \frac{(1 - A_x)}{A_0} \times 100$$

kde  $A_0$  je maximální absorbance slepého vzorku (nosný proud místo testovaného vzorku) a  $A_x$  je maximální absorbance po přidání extraktu. Všechna měření byla provedena v trojím opakování. Aktivita zachycování radikálů DPPH byla vyjádřena jako  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), což je množství vzorku nutné ke snížení absorbance světla o 50 %. Hodnoty byly vypočteny statistickým softwarem GraphPad Prism 5.02.

### **2.8.3 Stanovení obsahu hlavních izolovaných látek ZG-1, ZG-2, ZG-3**

Z každé referenční a izolované látky byl připraven zásobní roztok o koncentraci 0,20 mg/1,00 ml methanolu pro LC-MS kvality.

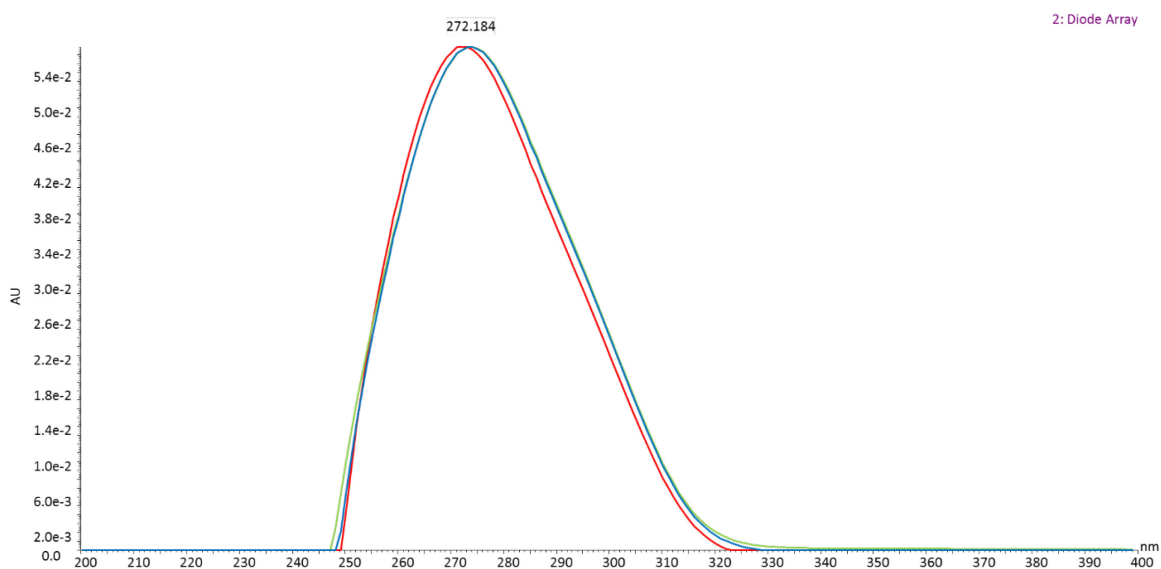
#### **2.8.3.1 Chromatografický systém**

K chromatografické analýze byl využit přístroj na preparativní/analytickou kapalinovou chromatografii, firmy Waters (Waters Corporation, Milford, USA). Chromatograf se skládal z automatického dávkovače vzorků spojeného s kolektorem frakcí – Waters Sample Manager 2767, s volitelným nástřikem v rozsahu 1–20  $\mu\text{l}$ , který byl vybaven 20  $\mu\text{l}$ , 1 ml, 5 ml a 10 ml injekční smyčkou.

Součástí přístroje byl kolonový selektor – System Fluidics Organizer s možností přepínání mezi 3 analytickými a 3 preparativními kolonami, binární gradientová pumpa

Waters 2545, která operuje v rozsahu 0,5 až 150 ml/min s maximálním tlakem 42MPa. K detekci byl využit detektor s diodovým polem – Waters 2998, se sběrem absorbance v rozsahu od 190 do 800 nm a hmotnostní spektrometr – Waters Acquity qDa, schopný sběru dat v rozsahu od 30 do 1250 m/z, při rychlosti až do 20 Hz s elektro-sprejovou ionizací. Jednotlivé extrakty a standartní látky byli analyzované při laboratorní teplotě. K analýze byla využita kolona XSelect® CSH™ Fluoro-Phenyl (100 mm x 4,6 mm i.d., 5 μm), od firmy Waters (Waters Corporation, Milford, USA).

Při optimalizaci podmínek UV detekce bylo postupováno tak, aby byla získána co největší odezva signálu pro všechny sledované analyty. Všechny analyzované látky vykazovaly nevyšší absorbanci v rozmezí  $272 \pm 4$  nm (Obr. 36). Proto byla tato hodnota zvolená ke kvantifikaci.



**Obr. 36** HPLC/UV-Zelená: Kyselina gallová (ZG-3); Modrá: Methylester kyseliny gallové (ZG-2); Červená: Ethylester kyseliny gallové (ZG-1)

Při optimalizaci podmínek hmotnostní detekce bylo postupováno podobně jako v předchozím případě, tj. tak, aby byla získána co největší odezva signálu pro všechny sledované analyty. Citlivost detektoru byla ponechána na hodnotě 1. Detektor pracoval v negativním módu elektro-sprejové ionizace v kontinuálním režimu. Nastavení sledování celkového počtu iontů (TIC) s ohledem na molekulové hmoty analytů bylo zvoleno v rozmezí 150–200 m/z. Rychlost sběru dat byla 20 Hz. Veškeré další parametry, tj. napětí na kapiláře, teplota sondy a napětí na kuželi byly optimalizovány v celém rozsahu.

### 2.8.3.2 Finální podmínky chromatografické analýzy

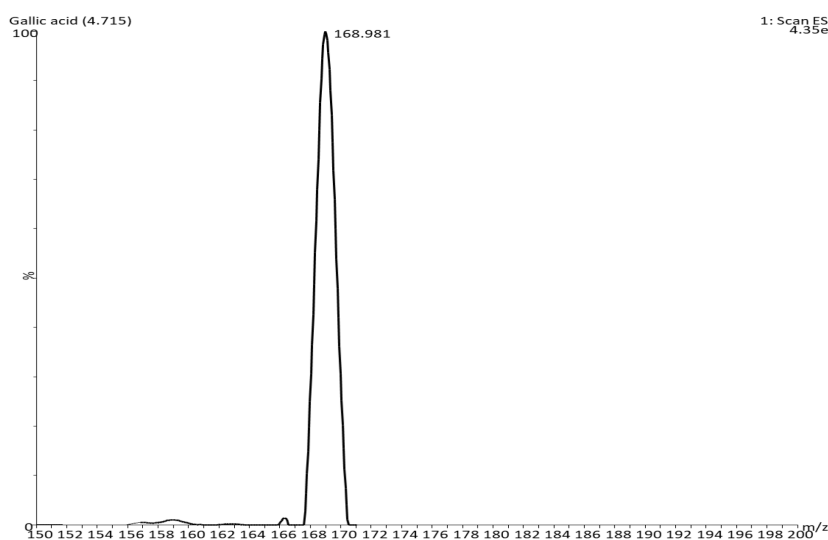
LC systém: Waters Autopurification HPLC/MS/PDA system

Kolona: XSelect® CSH™ Fluoro-Phenyl (100 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) (Waters Corporation, Milford, USA).

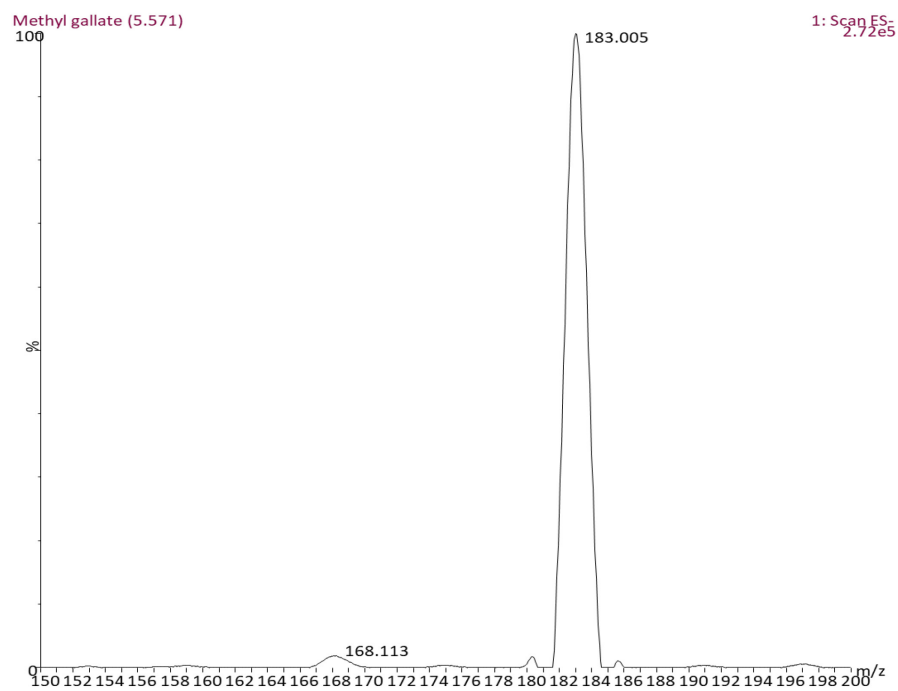
Mobilní fáze a gradient: složka A: 95 % - 0,1 % kyselina mravenčí ve vodě, 5 % metanol, složka B: metanol s 0,1 % kyselinou mravenčí, gradientová eluce, 1 ml/min, eluční program s gradientem (v / v): 0 min = 5 % B, 5 min = 100 % B (konkávní typ gradientu č. 9), 8,5 min = 5 % B (lineární typ gradientu č. 6), následovaný 1,5 minutou, k návratu na počáteční podmínky pro ekvilibraci, objem nástřiku: 10 µl,

PDA Detektor: rozsah detektoru: 200 do 400 nm, detekční vlnová délka: 272 nm, Frekvence sběrů datových bodů: 20 Hz, citlivost: normální, zesílení: 1x,

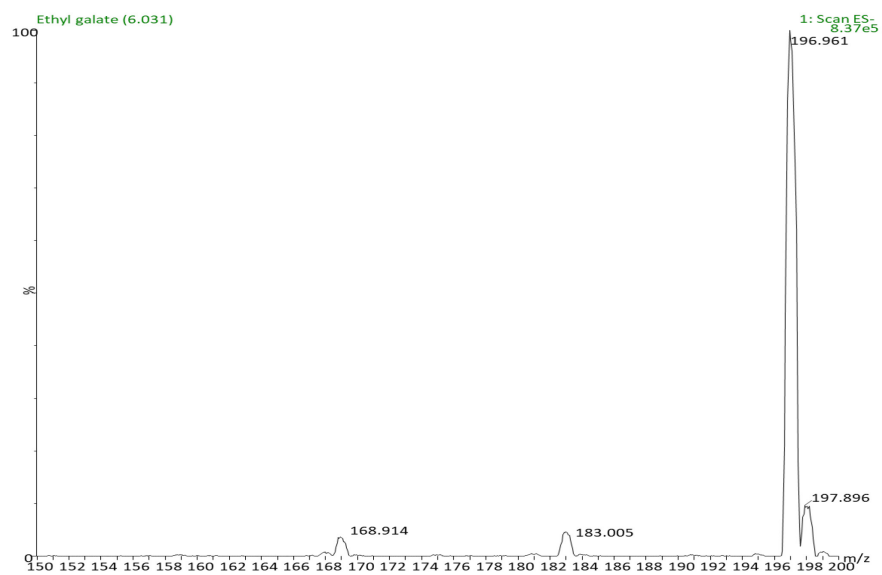
qDa Detektor: ESI negativní mód, kapilární napětí: 0,7 kV, teplota sondy: 600 ° C, napětí kužele: - 20 V, rozsah sledování: 150–200 m/z



**Obr. 37** Kyselina gallová

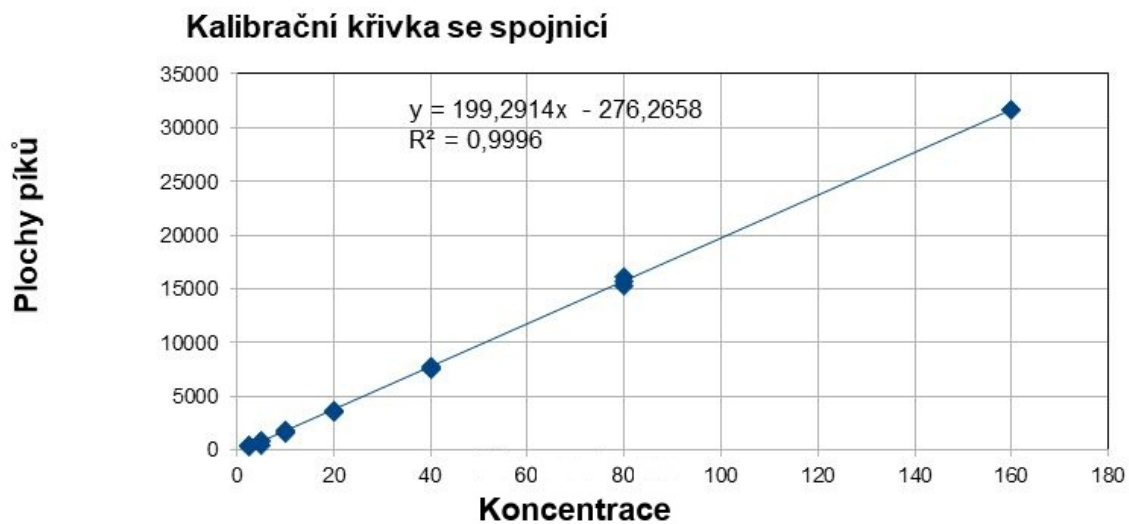


**Obr. 38** Methylester kyseliny gallové

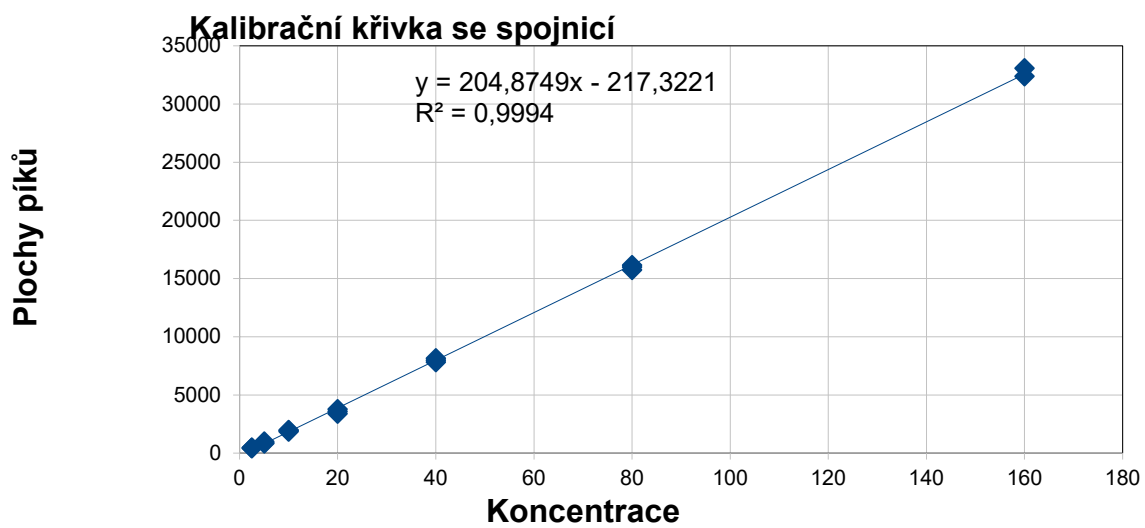


**Obr. 39** Ethylester kyseliny gallové

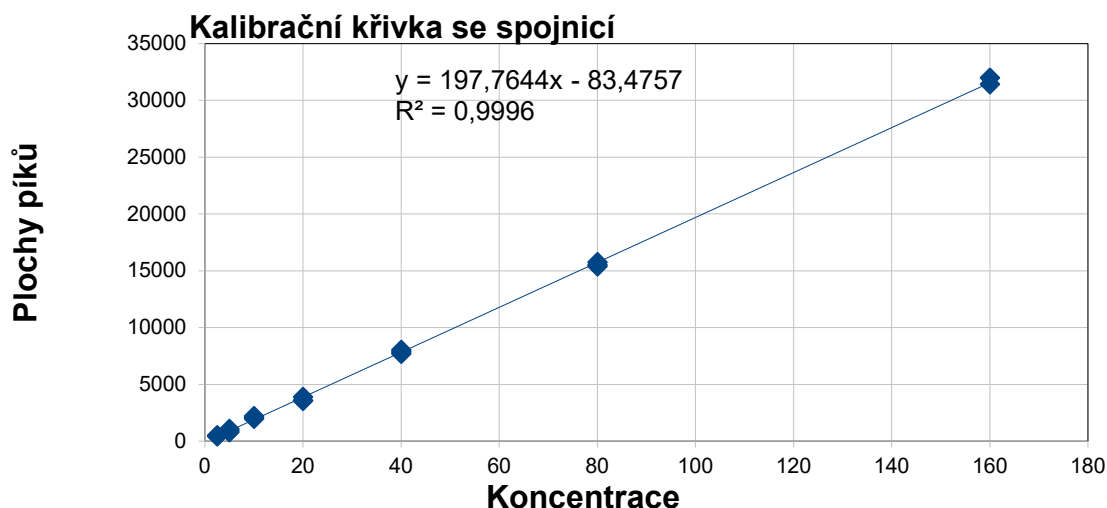




**Obr. 40** Kalibrační křivka kyseliny gallové



**Obr. 41** Kalibrační křivka methylesteru kyseliny gallové

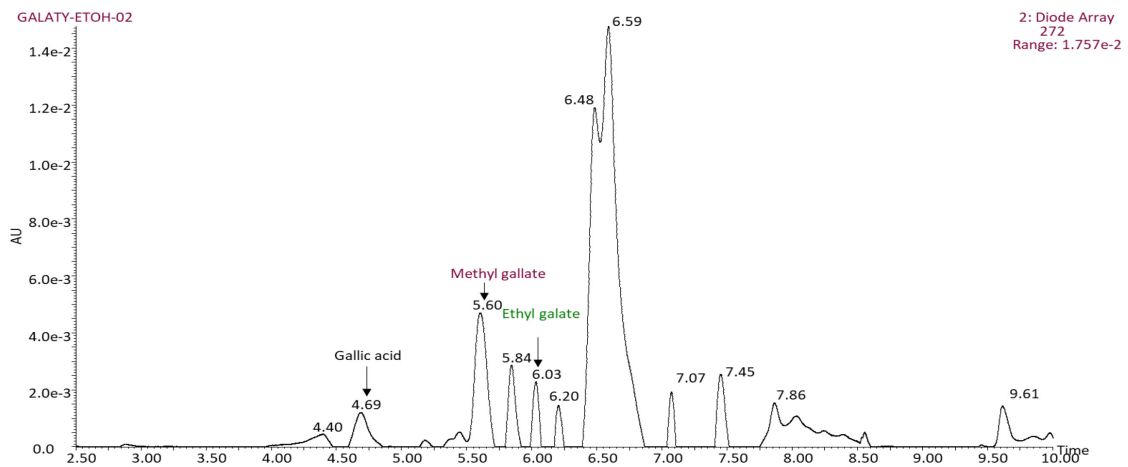


**Ob. 42** Kalibrační křivka ethylesteru kyseliny gallové

**Tab. 8** Parametry stanovení obsahu izolovaných látek

Analyty	Kyselina gallová	Methylester kyseliny gallové	Ethylester kyseliny gallové
Kalibrační rozsah	2,5 - 160 µg/ml	2,5 - 160 µg/ml	2,5 - 160 µg/ml
Regresní rovnice	$y = 199,2914x - 276,2658$	$y = 204,8749x - 217,3221$	$y = 197,7644x - 83,4757$
Koeficient determinace ( $R^2$ )	0,9996	0,9994	0,9996
LOD (µg/ml)	0,441	0,366	0,468
LOQ (µg/ml)	1,47	1,22	1,56

Pro stanovení obsahu kyseliny gallové a obou gallátů byl připraven zásobní roztok 1,00 mg sušiny extraktů/1 ml methanolu, nástřik 10 µl a provedeno stanovení podle výše uvedené metody.



**Obr. 43** Chromatogram primárního ethanolového extraktu z nati Rozchodnice růžové

### **3 Izolace**

#### **3.1 Schéma extrakce nati a sloupcové chromatografie diethyeterového výtřepku**

Kultura Rozchodnice růžové byla založena z osiva pocházejícího z Botanické zahrady ve Vladivostoku (r. 2010, položka č. 285).

Materiálem pro izolaci byla nať vypěstovaná z výše uvedeného osiva na Zahradě léčivých rostlin Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové (verifikace rostliny prof. RNDr. L. Opletal, CSc.). Čerstvá nať byla sbírána z 3leté kultury v červenci 2015 po sběru tobolek se zralými plody. Ze sesbírané nati byl odložen průměrný vzorek o hmotnosti 120 g, nařezán na 2-3 cm kousky, rychle zmrazen v tekutém dusíku a opatrně uložen v širokohrdlé destilační baňce v atmosféře argonu při -27 °C.

#### **3.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu**

37,35 kg čerstvé nadzemní části (sušina  $18,25 \pm 1,12$  %) bylo v mixeru dezintegrováno spolu s 95% ethanolem a výsledná směs byla nalita do perkolátoru a perkolována celkem 186,7 litry 70% ethanolu (1:5). Extrakt byl zahuštěn na cca 6,6 litru. Po zfiltrování (odstranění chlorofylu) bylo získáno cca 6,1 litrů kalného, žlutavého roztoku. Z něj se ochlazením vyloučil hnědý, práškovitý sediment (25,4 g), který byl odstraněn.

25 ml tohoto roztoku (označeného RhHb XII) bylo odpařeno na vakuové odparce dosucha za vzniku 5,21 g odparku (sušina  $88,14 \pm 1,35$  %) a použito pro další fytochemickou práci.

#### **3.3 Vytřepávání *n*-BuOH**

Vodný roztok byl vytřepán 5×3,2 litry směsi *n*-BuOH-EtOH 92:8. Tento butanolový výtřepok (označený RhHb XIV) byl odpařen co nejvíce dosucha (skoro černá, vysoce viskózní hmota, 724 g, sušina  $81,41 \pm 1,94$  %). Odparek byl rozpuštěn v 6 litrech destilované vody a bylo získáno 6,6 litru hnědého, kalného roztoku.

### 3.4 Vytřepávání odparku připraveného *n*-BuOH směsí ethyl-acetát+ethanol

6,6 litru nahnědlého roztoku bylo vytřepáno 9×1100 ml směsi EtOAc-EtOH 95:5. Při zahušťování tohoto výtřepku se vylučovala žlutá hmota, patrně směs flavonoidů, která byla odfiltrována (sušina 91,14±1,25 %). Odparek měl nafouklý charakter a světle žlutohnědé zbarvení.

Tab. 9 Charakter výtřepků z nati *Rhodiola rosea*

Označení	Rozpouštědlo	Popis	Hmotnost*
RhHb XVI/sed-1	práškovitý výpadek	hnědý, práškovitý (za mokra žlutohnědý)	23,63 g
RhHb XVI	EtOAc-EtOH	světlý, žlutohnědý, nafouknutý	240,2 g
RhHb XXI	Zbýlý vodný roztok BuOH výtřepku po EtOAc-EtOH	tmavě hnědý, velmi viskózní	248,0 g

\* z každého typu extraktu (výtřepku) byly odebrány cca 2 g pro další pozdější studium

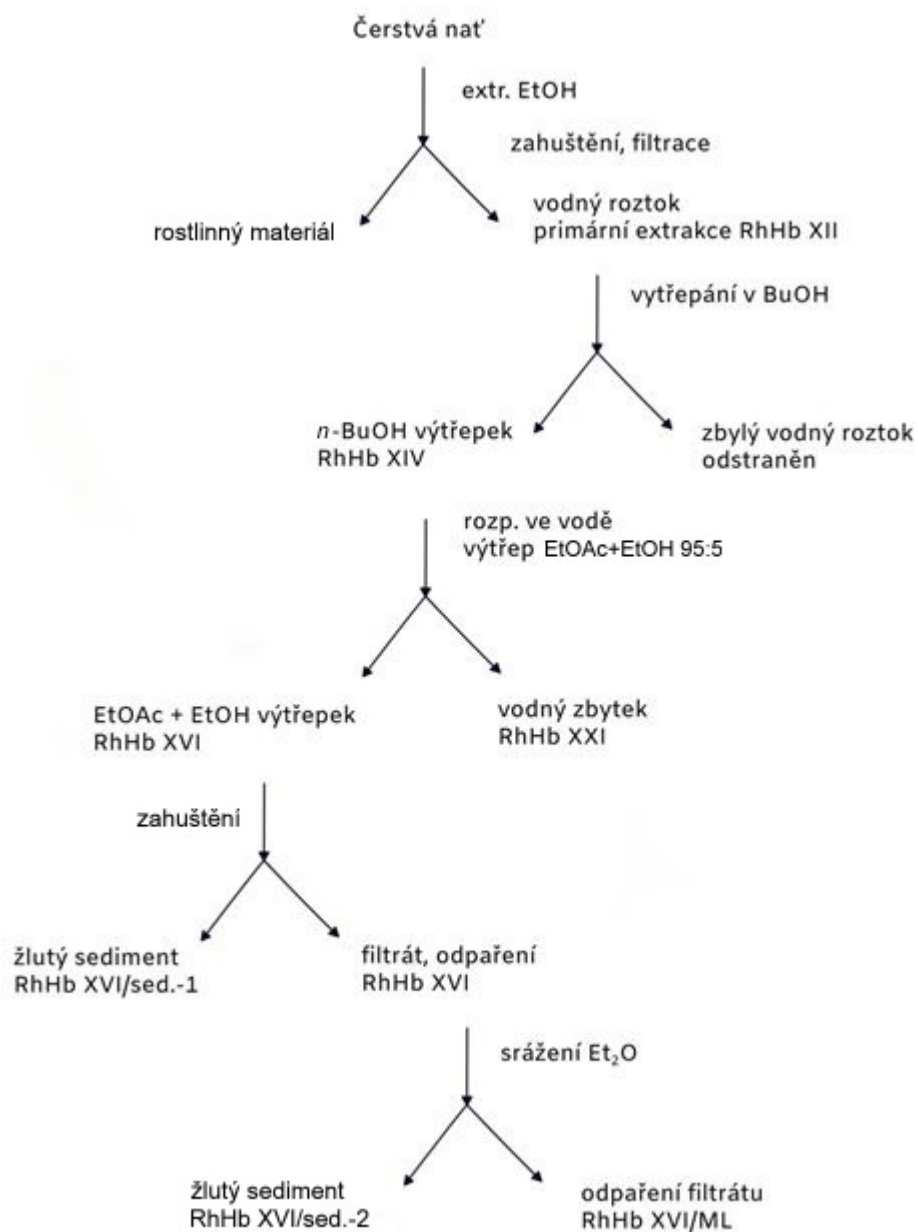
#### 3.4.1 Frakcionace RhHb-XVI (EtOAc výtřepku z *n*-BuOH) pro separaci

216 g odparku EtOAc-EtOH frakce RhHb XVI bylo rozpuštěno v EtOAc za mírného zahřátí na vodní lázni a s pomocí ultrazvukové lázně Sonorex 10P, v poměru 1 : 3 (přidáno 650 ml EtOAc). Po zchlazení na pokojovou teplotu byl tento roztok přesrážen přidáváním Et<sub>2</sub>O po malých podílech za neustálého míchání v poměru 1 : 4 (2630 ml Et<sub>2</sub>O). Roztok byl dekantován, sediment rychle odfiltrován, promyt 2×175 ml směsí EtOAc – Et<sub>2</sub>O = 1 : 4 a vysušen ve vakuovém exsikátoru. Ze spojených filtrátů bylo oddestilováno rozpouštědlo a řídký odparek byl nakonec vysušen na vakuové odparce.

Výsledky preparativního srážení jsou následující:

Hmot. sedimentu (RhHb XVI/sed-2): 31,7 g (žlutohnědý, práškovitý)

Hmot. EtOAc-Et<sub>2</sub>O odparku (RhHb XVI/ML): 205,6 g (světle hnědý, velmi viskózní)



**Obr. 44** Seprace extraktu z nati

### **3.5 Stanovení antioxidačních charakteristik extraktů a výtřepků**

#### **3.5.1 Stanovení celkových fenolových látek (FC)**

Stanovení bylo provedeno podle postupu uvedenému v oddíle IV/2.8.1.

#### **3.5.2 DPPH test**

Stanovení bylo provedeno podle postupu uvedenému v oddíle IV/2.8.2.

### **3.6 Příprava srovnávacího extraktů pro HPLC stanovení izolovaných látek**

#### **3.6.1 Příprava extraktu z čerstvé nati acetonitrilem**

Asi 2 g čerstvé zmražené nati přesně uchovávané pod argonem při  $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$  (sušina  $19,36 \pm 1,05\%$ ), bylo přelito malým množstvím tekutého dusíku, rychle rozdrceno na prášek, jak je uvedeno v kapitole IV/1.5 Stanovení sušiny, po vytěžení dusíku kvantitativně převedeno s 25 ml acetonitrilu do varné baňky, 10 min. sonikováno na ultrazvukové lázni Sonorex HP 10 při stupni 10. Tekutina byla odfiltrována přes vatový filtr v malé Pasteurově pipetě a postup opakován ještě jednou. Spojené filtráty byly zahuštěny do řídce sirupovité konzistence, přidáno 5 ml chloroformu a suspenze byla sonikována 5 min. při stupni 10. Po filtraci chloroformového extraktu byl postup opakován ještě jednou. Spojené filtráty (zelený, velmi viskózní odparek) byly odpařeny na vakuové odparce, vysušeny ve vakuovém exsikátoru, stanovena sušina dříve uvedeným způsobem a až do doby zpracování uchovávány pod argonem při  $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

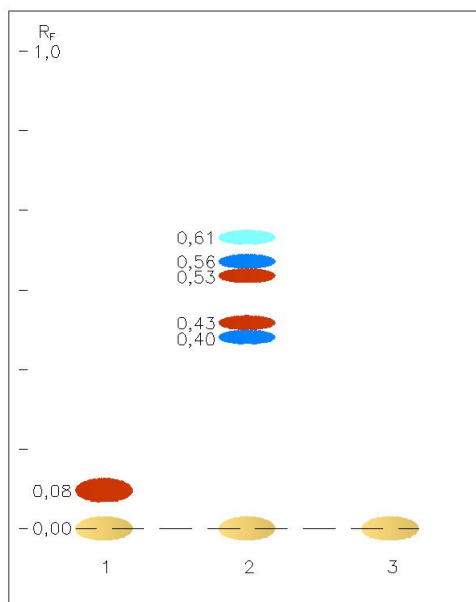
#### **3.6.2 Příprava extraktu ze suché nati ethanolem denaturovaným MeOH**

Byl použit identický postup jako v případě přípravy extraktu acetonitrilem (kap. 3.6.1) s tím rozdílem, že extrakt byl připraven 30minutovým varem pod zpětným chladičem v 95% ethanolu denaturovaném 5 % methanolu. Dále bylo postupováno stejně jako v předchozí kapitole.

### 3.7 Tenkovrstvá chromatografie

#### 3.7.1 TLC frakcí *Rhodiola rosea* RhHb XXI, RhHb XVI a RhHb XIV

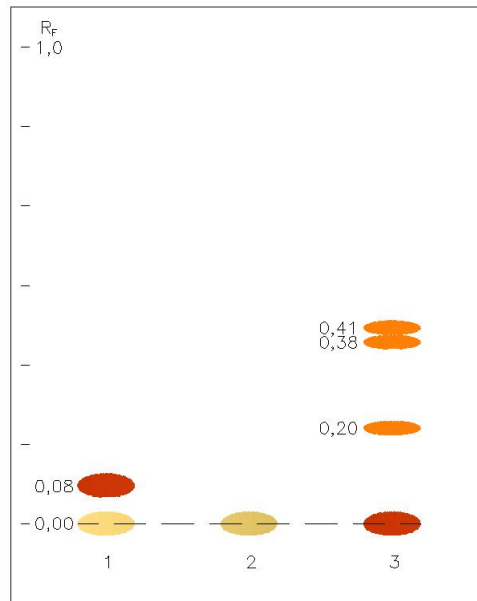
##### 3.7.1.1 TLC vodného podílu, ethyl-acetátového podílu, butanolového podílu



**Obr. 45** TLC 1 vodný podíl; 2 ethyl-acetátový podíl (EtOAc); 3 butanolový podíl (*n*-BuOH)

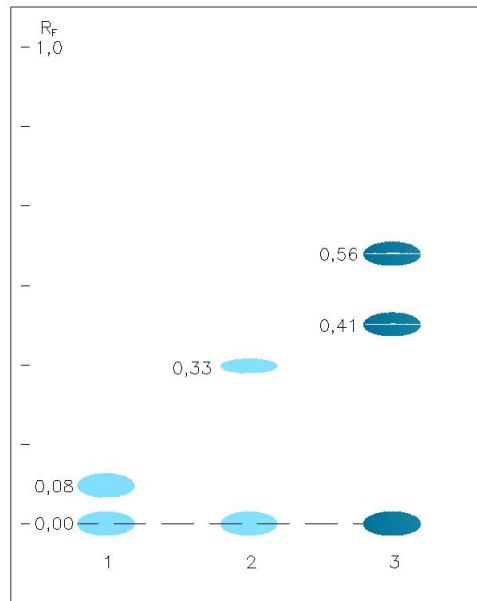
Soustava	S1
Detekce	UV <sub>254</sub>
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	50 × 75 mm
Vyvíjeno	2× (Obr. 45)





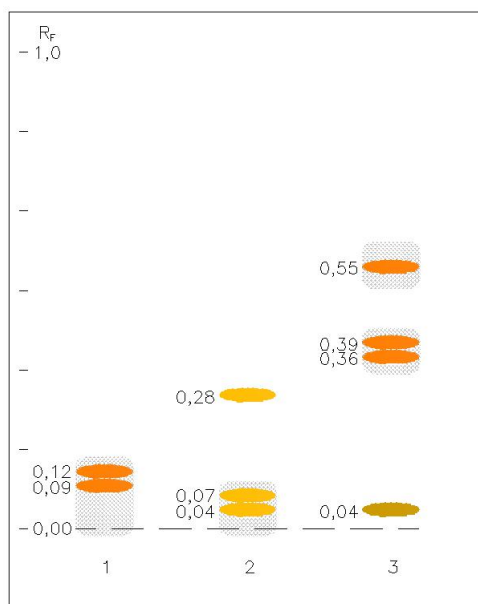
**Obr. 46** TLC 1 vodný podíl; 2 ethylacetátový podíl (EtOAc); 3 butanolový podíl (*n*-BuOH)

Soustava	S1
Detekce	D1
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	50 × 75 mm
Vyvíjeno	2× (Obr. 46)



**Obr. 47** TLC 1 vodný podíl; 2 ethylacetátový podíl (EtOAc); 3 butanolový podíl (*n*-BuOH)

Soustava	S1
Detekce	D2
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	50 × 75 mm
Vyvíjeno	2× (Obr. 47)



**Obr. 48** TLC 1 vodný podíl; 2 ethylacetátový podíl (EtOAc); 3 butanolový podíl (*n*-BuOH)

Soustava	S1
Detekce	D4
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	50 × 75 mm
Vyvíjeno	2× (Obr. 48)

### 3.7.1.2 TLC vodného podílu, EtOAc podílu, *n*-BuOH podílu

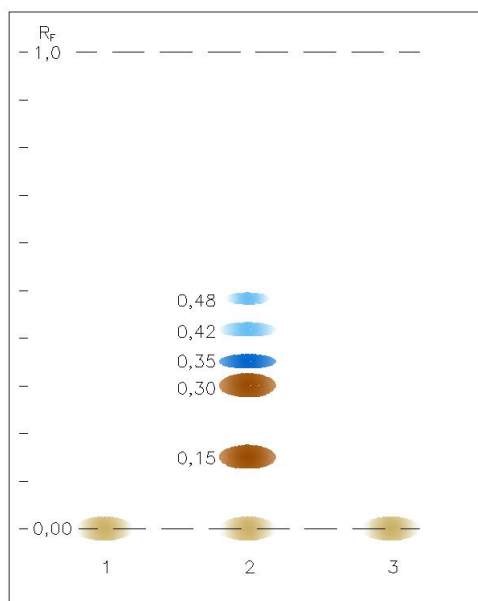
Provedeno další TLC s výše uvedenými extrakty. Dochází k špatnému dělení.

Soustava	S2
Detekce	UV <sub>254</sub>
Dráha	60 mm
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	50 × 75 mm

Vyvíjeno 2× Chromatogram nepřiložen.

Dělení bylo zcela neuspokojivé a z těchto důvodů zde není přiloženo obrazové schéma.

### 3.7.1.3 TLC vodného podílu, EtOAc podílu, *n*-BuOH podílu

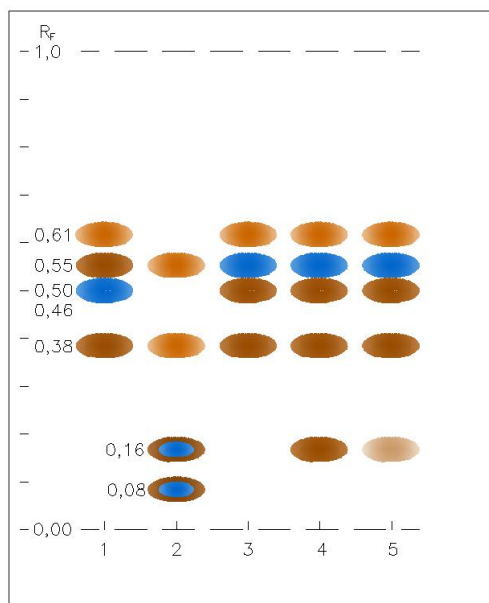


**Obr. 49** TLC 1 vodný podíl; 2 ethylacetátový podíl (EtOAc); 3 butanolový podíl (*n*-BuOH)

Soustava	S3
Detekce	UV <sub>254</sub>
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	50 × 75 mm
Vyvíjeno	2× (Obr. 49)

### 3.7.1.4 TLC všech jednotlivých podílů

Provedena orientační TLC se všemi jednotlivými podíly (Obr. 50).



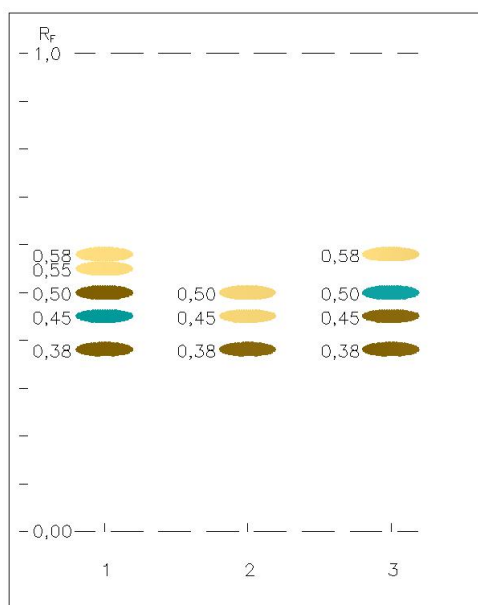
**Obr. 50** TLC 1 filtrát po sražení  $\text{Et}_2\text{O}$ ; 2 sediment po sražení  $\text{Et}_2\text{O}$ ; 3 filtrát po sražení  $\text{CHCl}_3$ ; 4 sediment po sražení  $\text{CHCl}_3$ ; 5 nedělená frakce

Soustava	S1
Detekce	$\text{UV}_{254}$
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	50 × 75 mm
Vyvíjeno	2× (Obr. 50)

Pro neuspokojivé dělení, bylo od srážení chloroformem upuštěno.

### 3.7.2 TLC frakcí *Rhodiola rosea* RhHb XVI EtOAc odparek po vysrážení Et<sub>2</sub>O a filtraci

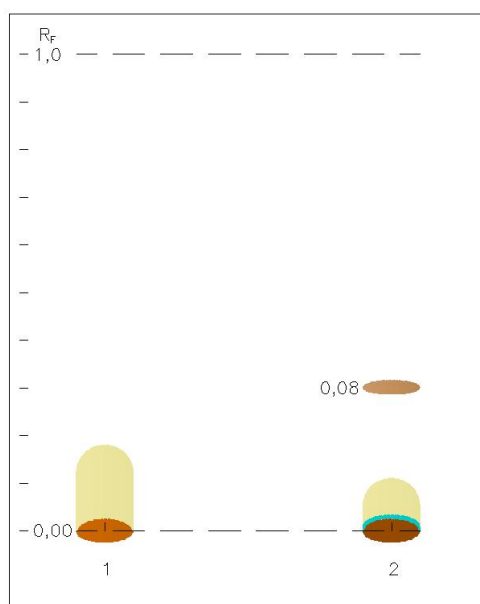
#### 3.7.2.1 TLC filtrátu, sedimentu a původního EtOAc odparku



**Obr. 51** TLC 1 filtrát po sražení Et<sub>2</sub>O; 2 sediment; 3 původní EtOAc odparek

Soustava	S1
Detekce	UV <sub>254</sub>
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	50 × 75 mm
Vyvíjeno	2× (Obr. 51)

### 3.7.2.2 TLC filtrátu a původního EtOAc odparek



**Obr. 52** TLC 1 filtrát po srážení  $\text{Et}_2\text{O}$ ; 2 původní EtOAc odparek

Soustava	S4
Detekce	UV <sub>254</sub> ; D1
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	50 × 75 mm
Vyvíjeno	1× (Obr. 52)

### 3.8 Sloupcová chromatografie

204 g odparku označeného RhHb XVI EtOAc/EtOAc+Et<sub>2</sub>O/odp. bylo rozpuštěno v potřebném množství MeOH a roztok byl rychle zfiltrován přes malou vrstvu celulózy vaty a dokonale smísen s 220 g deaktivovaného silikagelu. Rozpouštědlo bylo odpařeno na mírně zahřáté vodní lázni (50 °C). Po krátkém zchladnutí na vzduchu byl umístěn do vakuového exsikátoru a sušen nad perlami oxidu křemičitého po dobu 24 hodin.

Chromatografická kolona byla nalita standardním postupem.

Absorbent	Silikagel 2900 g (zrnitost 0,1-0,2 mm, deaktivovaný 10 % vody)
Dělicí vrstva	10,5×88 cm
Vrstva s extraktem	10,5×6,8 cm
Frakce:	250ml
Mrtvý objem	8 litrů
Doba toku frakce	cca 14 min (Tab. 10)

**Tab. 10** Sloupcová chromatografie frakcí 1-139

Frakce	Sloučené frakce		Eluční soustava	Popis
1	1-3		CHCl <sub>3</sub>	Velmi malé množství krystalů
2			CHCl <sub>3</sub>	
3			CHCl <sub>3</sub>	
4	4-5		CHCl <sub>3</sub>	
5			CHCl <sub>3</sub>	
6	6-8		CHCl <sub>3</sub>	
7			CHCl <sub>3</sub>	
8			CHCl <sub>3</sub>	
9	9-11	1-19	CHCl <sub>3</sub>	
10			CHCl <sub>3</sub>	
11	9-15		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-98:2	
12			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-98:2	
13			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-98:2	
14			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-98:2	
15			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-98:2	
16	16-19		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-98:2	



Frakce	Sloučené frakce		Eluční soustava	Popis	
17			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-98:2	Jemný sediment	
18			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-98:2		
19			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-98:2		
20	20-21	20-31	20-33	Malé množství drobných krystalů	
21					CHCl <sub>3</sub> :EtOH-98:2
22	22-25			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-98:2	Drobné krystaly
23				CHCl <sub>3</sub> :EtOH-98:2	
24				CHCl <sub>3</sub> :EtOH-98:2	
25				CHCl <sub>3</sub> :EtOH-98:2	
26	26-27			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-98:2	
27				CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5	
28	28-31			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5	
29				CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5	
30				CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5	
31		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5			
32	32-33	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5	Krystaly		
33		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5			
34	34-35			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5	
35			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5		
36	36-37	36-38	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5	Bělavý s drobnými krystaly, opalizující	
37			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5		
38	38		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5		
39	39-44	39-46	39-67	Nažloutlý s bílými krystaly	
40					CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5
41				CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5	Žlutavý, velmi viskózní s drobnými krystaly
42				CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5	
43				CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5	
44				CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5	
45	45-46			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5	
46		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5			

Frakce	Sloučené frakce	Eluční soustava	Popis	
47	47-55	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5	Nahnědlý, velmi viskózní odparek	
48		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5		
49		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5		
50		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5		
51		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5		
52		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-95:5		
53		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10		
54		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10		
55		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10		
56		56-61		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10
57	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10			
58	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10			
59	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10			
60	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10			
61	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10			
62	62-65		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10	
63			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10	
64			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10	
65			CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10	
66	66-67	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10		
67		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10		
68	68-70	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10	Žlutohnědý, velmi viskózní odparek	
69		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10		
70		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10		
71	71-73	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10		
72		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10		
73		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10		
74	74-76	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10		
75		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10		
76		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-90:10		
77	77-86	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		Žlutavý odparek s drobnými krystaly
78		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		
79		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		
80		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		
81		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		
82		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		
83		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		

Frakce	Sloučené frakce	Eluční soustava	Popis	
84		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		
85		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20	Žlutavý odparek s ojedinělými drobnými krystaly	
86		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		
87	87-90	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		Žlutohnědý, velmi viskózní
88		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		
89		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		
90		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		
91	91-95	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		
92		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		
93		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		
94		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-80:20		
95		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30		
96	96-101	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30	Žlutohnědý, velmi viskózní	
97		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30		
98		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30		
99		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30		
100		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30		
101		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30		
102	102-111	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30	Žlutohnědý, velmi viskózní	
103		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30		
104		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30		
105		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30	Žlutohnědý, velmi viskózní	
106		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30		
107		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30		
108		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30		
109		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30		
110		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-70:30		
111		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-50:50		
112		112-116		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-50:50
113	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-50:50			
114	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-50:50			
115	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-50:50			
116	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-50:50			
117	117-125	CHCl <sub>3</sub> :EtOH-50:50	Žlutohnědý se žlutým sedimentem	
118		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-50:50		
119		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-50:50		
120		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-50:50		

Frakce	Sloučené frakce	Eluční soustava	Popis
121		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-50:50	Tmavě hnědý, viskózní s náznakem krystalů
122		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-50:50	
123		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-50:50	Tmavě hnědý, velmi viskózní, v chladu se vylučují krystaly
124		CHCl <sub>3</sub> :EtOH-50:50	
125		Etanol čistý	
126	126-129	Etanol čistý	Tmavě hnědý, práškovitý
127		Etanol čistý	
128		Etanol čistý	Tmavě hnědý, práškovitý
129		Etanol čistý	
130	130-139	Etanol čistý	Hnědočerný, práškovitý
131		Etanol čistý	
132		Etanol čistý	
133		Etanol čistý	
134		Etanol čistý	
135		Etanol čistý	
136		Etanol čistý	
137		Etanol čistý	
138		Etanol čistý	
139		Etanol čistý	

### 3.9 Výsledky sloupcové chromatografie – hmotnosti a popis spojených frakcí (Tab. 11)

Tab. 11 Spojené frakce ze sloupcové chromatografie\*

Frakce	M [g]	Popis odparků spojených frakcí (vč. matečných louhů)
1 - 19	5,05	Velmi malé množství krystalů
20 - 31	4,94	Jemný sediment
32 – 35	0,53	Malé množství drobných krystalů
36 – 38	2,66	Bělavý s drobnými krystalky
39 – 67	8,32 (ML) 8,22 (ZG-1) 6,28 (ZG-2)	Žlutavý, velmi viskózní odparek
68 – 70	0,81	Žlutohnědý, velmi viskózní odparek
71 – 73	0,56	Žlutohnědý, velmi viskózní odparek
74 – 76	1,84	Žlutohnědý, velmi viskózní odparek
77 – 86	14,33 (ML) 29,75 (ZG-3)	Žlutavý odparek s drobnými krystaly
87 – 90	1,71	Žlutohnědý, velmi viskózní
91 – 95	2,05	Žlutohnědý, velmi viskózní
96 – 101	14,28	Žlutohnědý, velmi viskózní
102 -111	40,00	Žlutohnědý, velmi viskózní
112 – 116	3,00	Žlutohnědý, velmi viskózní
117 – 125	4,92	Tmavě hnědý, viskózní s náznakem krystalů
126 – 129	1,25	Tmavě hnědý, práškovitý
130 – 139	1,83	Hnědočerný, práškovitý
Celkem	108,08 44,25	Frakce a matečné louhy Krystalické podíly

\* v tabulce jsou uvedeny hmotnosti odparků spojených frakcí dohromady s matečnými louhy (podle TLC se po vyloučení krystalů ukázalo, že okolní frakce jsou kvalitativně stejné, a proto nebyly ML uchovávány separátně, ale spojeny s příslušnými frakcemi).

Hmotnosti krystalů ZG-1 až ZG-3 jsou uvedeny po rekrystalizaci.

#### 3.9.1 Zpracování spojených frakcí 39-40

Světle žlutá velmi viskózní frakce byla zahřáta na vodní lázni a krystalizována ze směsi benzin +  $\text{CHCl}_3$ . Vyloučené slabě nažloutlé drobné krystaly byly po jednom dni stání v chladu odfiltrovány na fritě, promyty rychle chladnou směsí uvedených rozpouštědel a byla

provedena rekrystalizace ze stejného rozpouštědla. Drobné krystaly byly vysušeny ve vakuovém exsikátoru nad sušidlem.

Vzniklo 6,28 g jemné krystalické látky bělavé barvy, označené ZG-1.

Matečný louh z rekrystalizace byl přidán do spojených frakcí 39-67.

### **3.9.2 Zpracování spojených frakcí 45-55**

Mírně nahnědlá velmi viskózní frakce, ze které se v chladu začaly vylučovat drobné krystaly, byla zahřáta na vodní lázni a krystalizována ze směsi benzin +  $\text{CHCl}_3$ . Vyloučené téměř bílé, plstnaté krystaly byly po jednom dni stání v chladu odfiltrovány na fritě, promyty rychle chladným chloroformem a byla provedena rekrystalizace ze stejného rozpouštědla. Drobné krystaly byly vysušeny ve vakuovém exsikátoru nad sušidlem.

Vzniklo 6,28 g jemné krystalické látky šedavé barvy, označené ZG-2.

Matečný louh z rekrystalizace byl přidán do spojených frakcí 39-67.

### **3.9.3 Zpracování spojených frakcí 79-86**

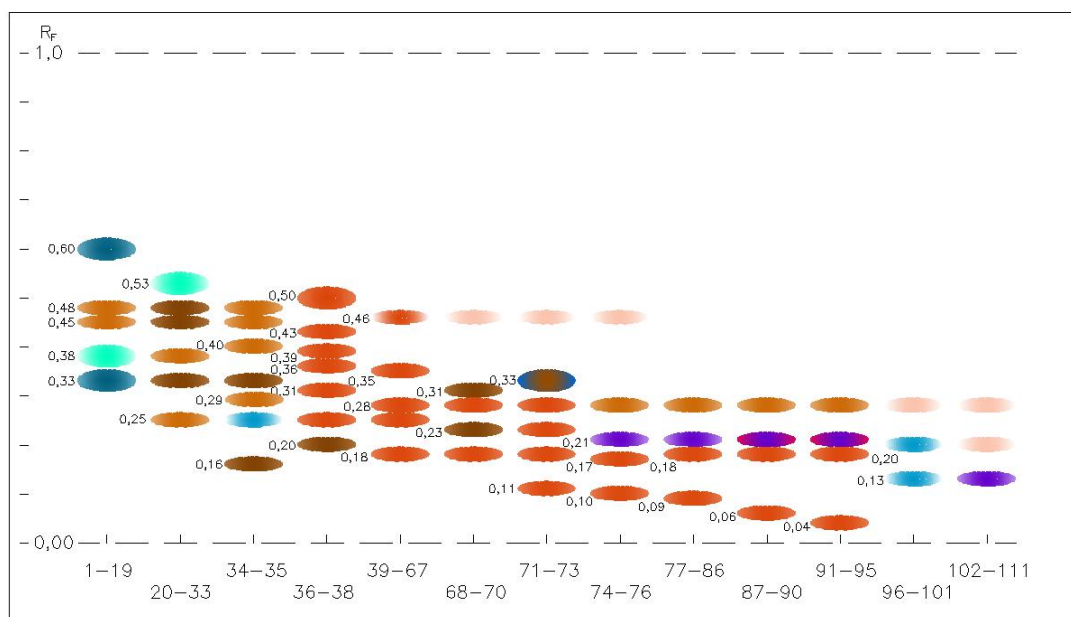
Žlutavý odparek s drobnými pískovitými krystaly byl zahřát na vodní lázni a krystalizován ze směsi  $\text{MeOH} + \text{CHCl}_3$ . Vyloučené krystaly byly po jednom dnu stání v chladničce rozdruženy skleněnou tyčinkou, postupně odfiltrovány na fritě, promyty rychle potřebným množstvím  $\text{Et}_2\text{O}$  a rekrystalizace provedena opět ze směsi  $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH}$ . Krystaly byly vysušeny ve vakuovém exsikátoru nad sušidlem.

Vzniklo 29,75 g drobné, šedavé krystalické látky, označené ZG-3.

Matečný louh z rekrystalizace byl přidán do spojených frakcí 77-86.

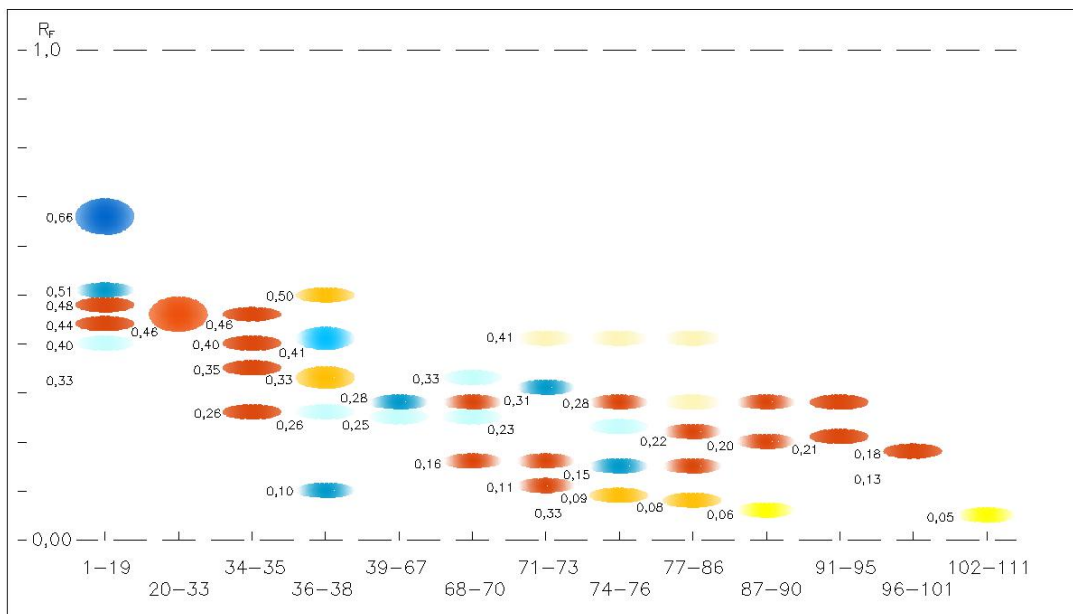
### 3.9.4 Souhrnná TLC frakcí *Rhodiola rosea* RhHb XVI/ML

#### 3.9.4.1 TLC frakcí 1 –111 po sloupcové chromatografii



**Obr. 53** TLC Frakce 1 – 111 po sloupcové chromatografii

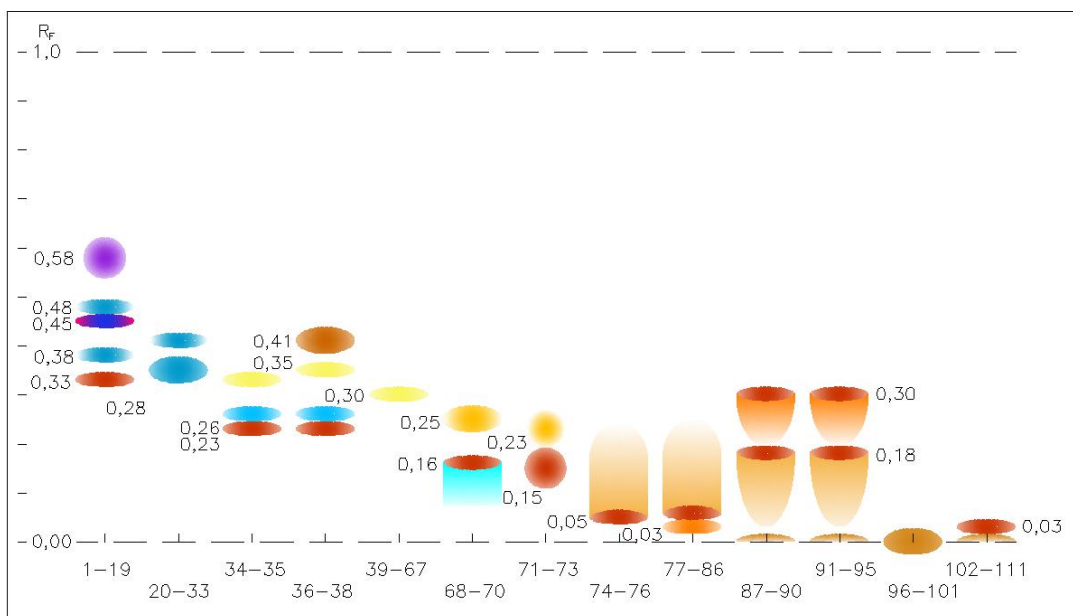
Soustava	S1
Detekce	UV <sub>254</sub>
Dráha	60 mm
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	150 × 75 mm
Vyvíjeno	3× (Obr. 53)



**Obr. 54** TLC Frakce 1 – 111 po sloupcové chromatografii

Soustava	S1
Detekce	UV <sub>366</sub>
Dráha	60 mm
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	150 × 75 mm
Vyvíjeno	3× (Obr. 54)

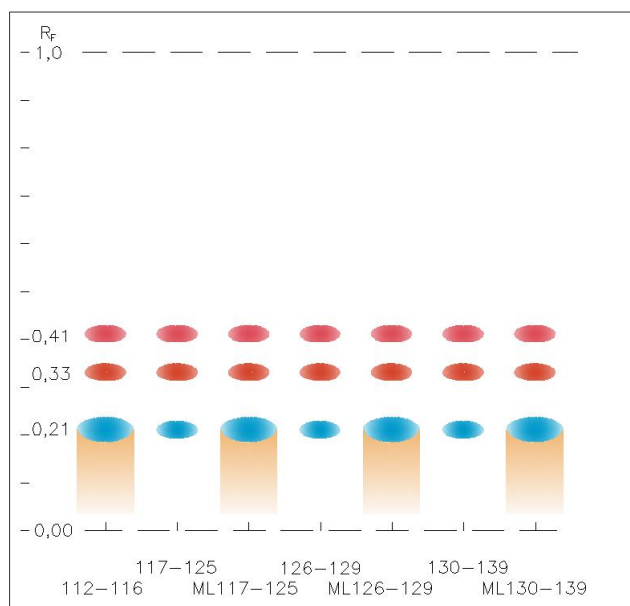




**Obr. 55** TLC Frakce 1 – 111 po sloupcové chromatografii

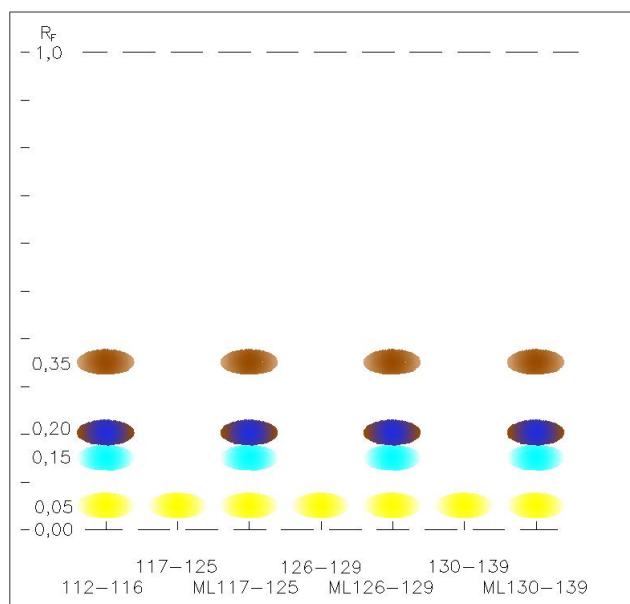
Soustava	S1
Detekce	D1
Dráha	60 mm
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	150 × 75 mm
Vyvíjeno	3× (Obr. 55)

### 3.9.4.2 TLC frakcí 112 –139 po sloupcové chromatografii



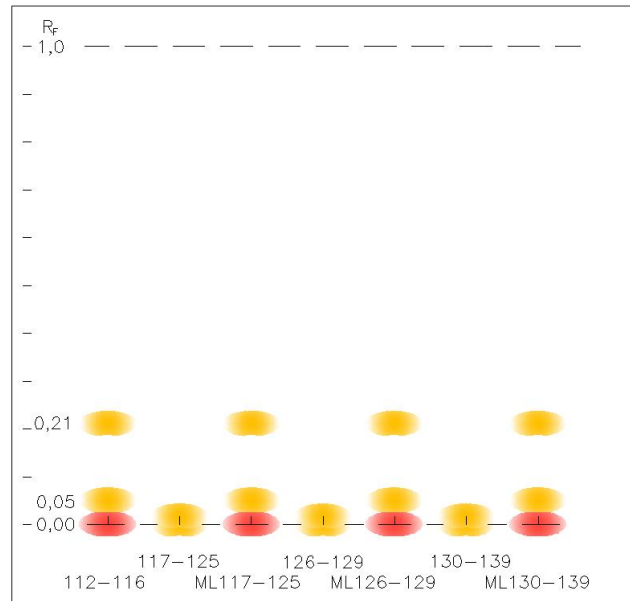
**Obr. 56** TLC Frakce 112 – 139 po sloupcové chromatografii

Soustava	S1
Detekce	UV <sub>254</sub>
Dráha	60 mm
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	150 × 75 mm
Vyvíjeno	3× (Obr. 56)



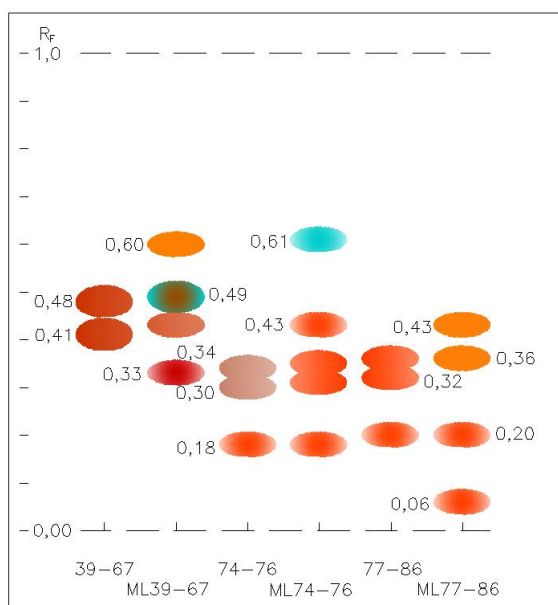
**Obr. 57** TLC Frakce 112 – 139 po sloupcové chromatografii

Soustava	S1
Detekce	UV <sub>366</sub>
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	100 × 75 mm
Vyvíjeno	3× (Obr. 57)



**Obr. 58** TLC Frakce 112 – 139 po sloupcové chromatografii

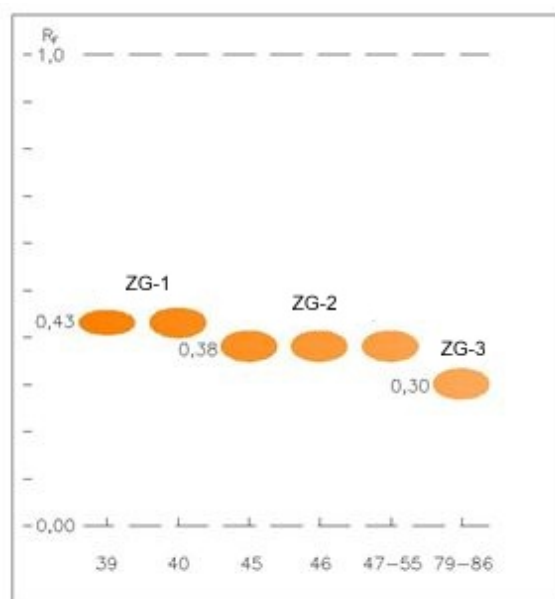
Soustava	S1
Detekce	D1
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	100 × 75 mm
Vyvíjeno	3× (Obr. 58)



**Obr. 59** TLC Frakce 39 – 67; ML 39 – 67; 74 – 76; ML 74 –76; 77 – 86; ML 77 – 86 po sloupcové chromatografii

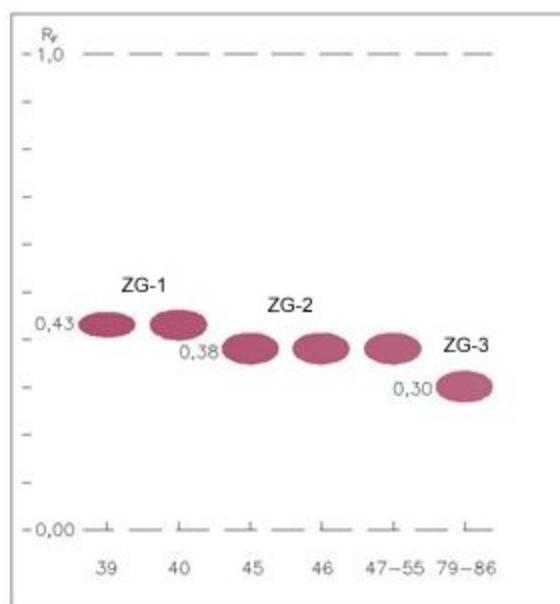
Soustava	S1
Detekce	UV <sub>254</sub>
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	70 × 75 mm
Vyvíjeno	3× (Obr. 59)

### 3.9.4.3 TLC frakcí 39; 40; 45; 46; 47 – 55; 79 – 86



**Obr. 60** TLC Frakce 39; 40; 45; 46; 47 – 55; 79 – 86

Soustava	S1
Detekce	D5
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	70 × 75 mm
Vyvíjeno	3× (Obr. 60)
ZG-1	ethylester kyseliny gallové
ZG-2	methylester kyseliny gallové
ZG-3	kyselina gallová



**Obr. 61** TLC Frakce 39; 40; 45; 46; 47 – 55; 79 – 86

Soustava	S1
Detekce	D5
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	70 × 75 mm
Vyvíjeno	3× (Obr. 61)
ZG-1	ethylester kyseliny gallové
ZG-2	methylester kyseliny gallové
ZG-3	kyselina gallová

## V. VÝSLEDKY

### 1 Stanovení obsahu fenolových látek v extraktech (výtřepcích) a antioxidační aktivita (Tab. 11)

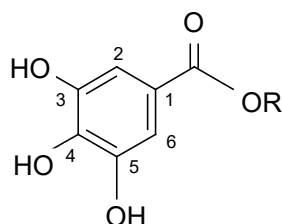
Tab. 11 Stanovení celkových fenolů (FC) a zhášecí aktivity (DPPH)

Typ extraktu (výtřepku) a látky	FC*	DPPH*	
	μg GA/mg extr.	% zhášení (1000 μg/ml)	EC <sub>50</sub> (μg/ml)
<b>RhHb XII</b> Sušina 88,14±1,35 %	148,5 ± 8,5	41,05 ± 0,3	> 1000
<b>RhHb XIV</b> Sušina 81,41±1,94 %	265,4 ± 10,1	57,02 ± 0,8	807,3 ± 94,5
<b>RhHb XVI</b> Sušina 87,32±1,05 %	418,5 ± 45,8	69,15 ± 0,7	499,9 ± 67,8
<b>RhHb XVI/sed-1</b> Sušina 91,14±1,25 %	515,7 ± 69,5	79,12 ± 1,4	239,9 ± 29,2
<b>RhHb XVI/sed-2</b> Sušina 93,45±2,01 %	592,4 ± 68,4	83,64 ± 2,1	123,3 ± 14,1
<b>RhHb XVI/ML</b> Sušina 83,29±1,64 %	597,8 ± 70,2	85,16 ± 1,6	84,16 ± 7,92
<b>RhHb XXI</b> Sušina 81,26±2,49 %	167,1 ± 39,2	44,12 ± 2,2	> 1000
<b>ZG-1</b> Sušina 98,76±0,88 %	942,1 ± 28,7	87,40 ± 4,8	26,45 ± 2,87
<b>ZG-2</b> Sušina 99,11±0,56 %	950,0 ± 26,5	87,60 ± 3,1	21,15 ± 3,15
<b>ZG-3</b> Sušina 99,01±0,69 %	978,3 ± 21,9	87,59 ± 2,8	21,41 ± 1,86

\* pro měření byla odvážena taková množství extraktu 100% množství sušiny (proveden klasický přepočít na sušinu)



## 2 Charakteristika izolovaných látek



ZG-1 R = -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

ZG-2 R = -CH<sub>3</sub>

ZG-3 R = -H

**Obr. 62** Číslování základního skeletu pro popis NMR

### ZG-1 (Ethylester kyseliny gallové)

Jemná, bělavá krystalická látka, bez zápachu, t. t. 148-151 °C (standard 149-152 °C), směs bez deprese. MS a NMR data byla v souladu s publikovanými údaji v literatuře a se spektry referenčních látek <sup>172</sup>.

MS studie

NMR studie

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,25 (3H, *t*, *J* = 7,1 Hz, -CH<sub>3</sub>); 4,19 (2H, *q*, *J* = 7,1 Hz, -OCH<sub>2</sub>); 6,93 (2H, *s*, H-2 a H-6); 9,15 (3H, *brs*; C<sub>3</sub>-OH, C<sub>4</sub>-OH a C<sub>5</sub>-OH).

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14,3 (CH<sub>3</sub>); 60,02 (OCH<sub>2</sub>); 108,5 (C-2 a C-6); 119,6 (C-1); 138,3 (C-4); 145,6 (C-3 a C-3); 165,8 (COO-).

### ZG-2 (Methylester kyseliny gallové)

Jemná, naředlá krystalická látka, bez zápachu, t. t. 200-202 °C (standard 201-202 °C), směs bez deprese. MS a NMR data byla v souladu s publikovanými údaji v literatuře a se spektry referenčních látek <sup>123</sup>.

MS studie

NMR studie

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7,26 (*s*, 2H, A), 4,01 (*s* 2H, B).

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 165,67 (C-7, C=O), 144,10 (C-3 a C-5), 136,99 (C-4), 118,82 (C-1), 107,86 (C-2 a C-5), 50,36 (C-8).

### ZG-3 (Kyselina gallová)

Velmi drobně krystalická šedavá látka bez zápachu, t. t. 258-260 °C (standard 259-260 °C), směs bez deprese. MS a NMR data byla v souladu s publikovanými údaji v literatuře a se spektry referenčních látek<sup>123</sup>.

MS studie

NMR studie

<sup>1</sup>H NMR: (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 12,52 (s, H, OH kyseliny), 7,22 (s, 2H).

<sup>13</sup>C NMR: (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 167,01 (C-7=C=O), 143,98 (C-3 a C-5), 136,61 (C-4), 119,87 (C-1), 108,14 (C-2 a C-6).

### 3 Obsah gallové kyseliny a jejích esterů v čerstvé nati ve dvou typech extraktů

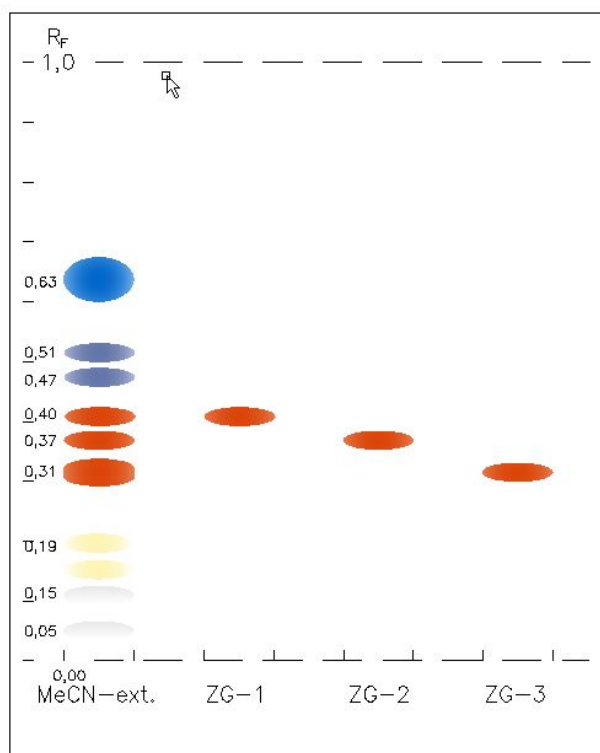
Výsledky HPLC stanovení izolovaných látek (viz kap. IV/2.8.3.2) jsou následující:

**Tab. 12** Obsah izolovaných látek v čerstvé nati\*

Typ extraktu	ZG-1 (Ethylester kyseliny gallové)	ZG-2 (Methylester kyseliny gallové)	ZG-3 (Kyselina gallová)
EtOH (+ 5 % MeOH)	0,193 ± 0,01 %	0,160 ± 0,008 %	0,625 ± 0,033 %
MeCN	0,185 ± 0,01 %	0,154 ± 0,009 %	0,642 ± 0,029 %

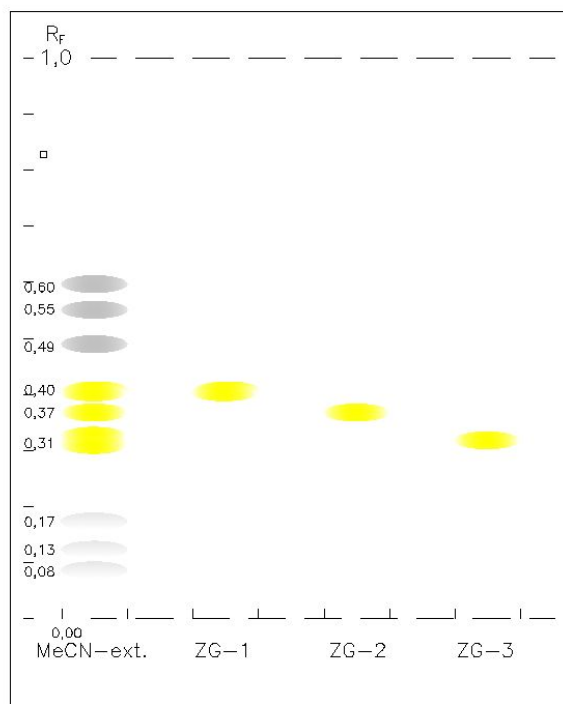
\*Počítáno na sušinu nati

#### 4 Původnost izolovaných látek v čerstvé nati



**Obr. 63** TLC Původnost izolovaných látek v čerstvé nati

Soustava	S1
Detekce	D5
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	70 × 60 mm
Vyvíjeno	3× (Obr. 63)
ZG-1	ethylester kyseliny gallové
ZG-2	methylester kyseliny gallové
ZG-3	kyselina gallová



**Obr. 64** TLC Původnost izolovaných látek  
v čerstvé nati

Soustava	S1
Detekce	D4
Absorbent	Silica gel® UV 254 nm
Formát	70 × 60 mm
Vyvíjeno	3× (Obr. 64)
ZG-1	ethylester kyseliny gallové
ZG-2	methylester kyseliny gallové
ZG-3	kyselina gallová

## VI. DISKUSE

Rozchodnice růžová patří k nejčastěji používaným léčivým rostlinám v čínské a ruské medicíně. Jedná se o rostlinný druh s prokázanou adaptogenní aktivitou; v některých literárních pramenech se dokonce hovoří o tom, že svými účinky předčí i účinky látek z kořene ženšenu pravého (*Panax ginseng* L.). Tyto údaje však nejsou jednoznačně vědecky podloženy, nebyly publikovány v impaktované literatuře, a proto je vhodné zachovat vůči nim reálný odstup (z těchto důvodů zde literární prameny neuvádím). Velmi dokonale je rozebrána problematika rozchodnice růžové v přehledné publikaci, která nezaujatě deklaruje možnosti využití této perspektivní drogy <sup>124</sup>. Lidové léčitelství Evropy, ale především Číny a některých oblastí Ruska (národní lékopisy) však uvádějí jako léčivou drogu pouze kořen, jehož využití je známé a nesporné. V České republice je v informačním systému AISLP uvedeno k 1. únoru 2021 celkem 55 přípravků jako doplňky stravy s obsahem této drogy. Tyto přípravky jsou polykomponentní, většina z nich je určena „k celkové harmonizaci organismu“. V portfoliu jsou však také přípravky s obsahem extraktů z rozchodnice, které jsou určeny k různým typům diet <sup>125</sup>.

Dosud jsou využívány pouze kořeny – studie zabývající se obsahovými látkami této morfologické části jsou poměrně četné, např. <sup>69, 70, 124</sup>, systematický fytochemický výzkum vegetativních morfologických částí nebyl zatím prováděn. Je to podobné jako v jiných případech léčivých rostlin TCM, např. magnolky čínské, *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill., ačkoliv mohou být zdrojem stejných obsahových látek jako původní drogy (v případě magnolky se jedná o lignany v nati, jejichž profil se blíží lignanům z drogy – *Fructus schizandrae*) <sup>126</sup>. V případě rozchodnice růžové nejsou z literatury známy žádné případy, které by hovořily o zahájení fytochemických studií nadzemních částí uvedeného druhu. Možná je to tím, že tato vegetabilní část rostliny se obtížně zpracovává, protože má vysoký obsah vody (ve své práci jsem našel, že čerstvá rostlina obsahovala ~ 81 % vody), což je v případě zástupců čeledi Crassulaceae zcela obvyklé. Prakticky to znamená velmi obtížné sušení, a pokud je prováděno dlouho a stacionárně, pak dochází ke změně barvy drogy a možná i k rozkladu některých obsahových látek.

Pro extrakci bylo použito 37,35 kg čerstvé nati sklizené v terminální fázi kvetení, která byla po rozdrcení perkolována 95% ethanolem. Po odstranění ethanolu a filtraci hrubých

nečistot (chlorofyly atd.) byl žlutohnědý primární extrakt (RhHb XII) sekvenčně extrahován postupem obvyklým pro tento typ prací: nejprve byl extrahován *n*-BuOH (RhHb XIV), butanolový odparek byl rozpuštěn ve vodě a vytřepán směsí EtOAc+EtOH 95:5 (RhHb XVI). Při zahušťování tohoto výtřepku se vyloučil poměrně masivní žlutý sediment (RhHb XVI/sed-1), který byl odfiltrován a filtrát srážen Et<sub>2</sub>O. Vyloučil se další podíl žlutého sedimentu (RhHb XVI/sed-2). Filtrát po srážení diethyletherem, který po odpaření poskytl hnědý odparek (RhHb XVI/ML) byl použit pro izolační práci. Podle úvahy by měl obsahovat především nízkomolekulární sloučeniny včetně určitého podílu flavonoidních aglykonů, což se při pozdější práci prokázalo. Flavonoidní aglykony a glykosidy byly nalezeny už dříve v kořenech, jak je patrné z literárního přehledu v této práci, a tak není překvapující, že se vyskytly také v nadzemní části; překvapující je pouze to, že v nadzemní části jich je několikanásobně více než v kořenech, jak nakonec dokládají obr. 36 až obr. 43. V nativní formě bylo na chromatogramech patrné, že mnohé zóny jsou složeny z několika látek, které použité chromatografické soustavy nejsou schopné rozdělit a pro samotný proces mojí práce to ani nebylo potřebné: obrázky mají pouze graficky informačně ukázat přibližné rozložení sekundárních metabolitů. Výrazný profil přítomných látek je povahy flavonoidů, jak lze soudit z barevných reakcí na tenkovrstvých chromatogramech, a proto není překvapující, že dělení nebylo jednoznačné.

Při této „bioguided separation“ jsou důležité hodnoty celkového obsahu fenolových sloučenin (Folin-Ciocalteu); ze sekvenčního vytřepávání (tab. 11) je patrné, že se ve výtřepcích hromadí fenolové sloučeniny, vztaženo jako  $\mu\text{g}$  gallové kyseliny/mg extraktu. Zdánlivá výjimka – vodný zbytek RhHb XXI (obr. 35) však výjimkou není, protože tento výsledek bylo možné očekávat – dokumentuje, že uvedený vodný zbytek obsahuje už jen malé množství fenolových látek.

Při DPPH testu je naopak patrné, že procento zhášení stoupá od primárního extraktu (RhHb XII) až k čistým látkám ZG-1 až ZG-3, opět s výjimkou RhHb XXI, která byla vysvětlena už výše. Podobným způsobem výkladu tomu odpovídají hodnoty EC<sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); nejnižší hodnota je u vodného extraktu vzniklého z primárního alkoholického extraktu po odpaření ethanolu (RhHb XII) a dále tyto hodnoty stoupají opět s výjimkou vodného zbytku RhHb XXI. Tato výjimka dokazuje nejen to, že ve vodném zbytku bylo už jen malé množství fenolových sloučenin, ale také to, že zvolený separační postup byl zvolen racionálně.

Z matečného louhu, který vznikl po vysrážení flavonoidů (usuzují, že se jednalo o flavonoidy, protože tento sediment byl žluté barvy) byly izolovány sloupcovou chromatografií na silikagelu 3 čisté sloučeniny s následujícím izolačním výtěžkem ZG-1 (ethylester kyseliny gallové; 0,121 %), ZG-2 (methylester kyseliny gallové; 0,092 %) a ZG-3 (kyselina gallová; 0,437 %). Základní fyzikálně-chemické charakteristiky izolovaných látek byly prakticky identické s údaji v literatuře a po srovnání se standardními sloučeninami. Ačkoliv byl tento matečný loup už předcházejícími separačními procesy hrubě vyčištěn, je patrné, že spojené frakce ze sloupcové chromatografie obsahovaly velké množství metabolitů (viz obr. 44 až obr. 50) převážně fenolového charakteru, což dosvědčuje výrazný metabolický obrat tohoto typu látek v nati a je proto do jisté míry pochopitelné, proč fytochemické studie nati na rozdíl od kořenů nezačaly být prováděny, ačkoliv je nať z tohoto pohledu velmi bohatým zdrojem flavonoidních glykosidů, možná dosud nepopsaných a atraktivních pro další biologické studium. Izolace čistých látek by však byla do významné míry náročná, tak jak to u flavonoidních glykosidů bývá.

Zcela legitimně se vyskytuje otázka, zda se tyto sloučeniny vyskytují v čerstvé nati rozhodnice růžové nativně, anebo se jedná o artefakty, které vznikly při izolačním procesu. Samotná příprava primárního extraktu byla jak časově, tak fyzikálně-chemicky poněkud náročná (zahřívání, odpařování, velký objem ethanolu denaturovaného methanolem), což by mohlo způsobit esterifikaci kyseliny gallové a vznik obou esterů. Z tohoto důvodu bylo provedeno srovnání obsahu všech 3 sloučenin HPLC (viz oddíl IV/2.8.3) ve dvou typech extraktů: ethanolovému (komerční 95% EtOH denaturovaný 5 % MeOH, (viz oddíl IV/3.6.2) a acetonitrilovému (viz oddíl IV/3.6.1). Pokud by byly estery gallové kyseliny přítomny v čerstvé nati, musely by být stanoveny v acetonitrilovém extraktu. Pokud by se jednalo pouze o artefakty, pak by byly přítomny pouze v ethanolovém extraktu, nikoli v acetonitrilovém. HPLC bylo prokázáno, že oba estery se v nati vykytují nativně; jejich obsah vztažený na sušinu nati byl v acetonitrilovém extraktu nalezen nižší než v případě ethanolového extraktu (viz oddíl V/3, Tab. 12). Jako racionální vysvětlení se jeví přece jen částečná esterifikace, která proběhla v průběhu izolačního procesu. Je pochopitelné, že obsah těchto látek zjištěný analyticky je vyšší než obsah izolační. V přehledu obrázků není uveden chromatografický záznam acetonitrilového extraktu, protože byl prakticky

identický s extraktem ethanolovým. Původnost mnou izolovaných látek v čerstvé nati prokazuje také orientační tenkovrstvá chromatografie (Obr. 63 a Obr. 64).

Z literatury je patrné, že všechny tři zde izolované sloučeniny se v některých rostlinných druzích vyskytují přirozeně a stejně je tomu tak v případě nati rozchodnice růžové. Pro přehled a diskusi jsem vybral některé údaje z literatury za posledních 10 let a to většinou ve formě přehledových studií, protože těchto údajů je v literatuře velké množství a není potřebné je detailně uvádět.

Kyselina gallová je patrně nejrozšířenější aromatickou kyselinou. Je běžně detekovatelná ve většině morfologických částí mnoha rostlin, v některých z nich je její výskyt poměrně vysoký, např. v nefermentovaných listech čajovníku čínského (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) se tato kyselina vyskytuje s některými dalšími aromatickými kyselinami sice jako volná, ale je zde přítomna především ve formě esterů s některými flavonoly, jako je (-)-epikatechin (3-6 % gallátu) a (-)-epigallokatechin (9-13 % gallátu) <sup>127</sup>. Tento fakt dosvědčuje, že kyselina gallová je velmi aktivní složkou intermediárního metabolismu v rostlinách. Působí antioxidačně, antimikrobiálně, protizánětlivě a anti kancerogenně <sup>128, 129</sup>.

Studie *in vivo* prokázala protinádorový účinek orálně podávané kyseliny gallové na LL-2 rakovinové buňky transplantované do plic myši. Výsledný efekt studie se projevil snížením hmotnosti a životaschopnosti transplantovaného nádoru <sup>130</sup>.

Byly prokázány protinádorové účinky kyseliny gallové izolované z indonéské rostliny *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Spektroskopická analýza prokázala výraznou inhibici nádorových buněk a indikované apoptózy buněk rakoviny jícnu <sup>131</sup>.

Má schopnost zasahovat do vývoje různých onemocnění, založených na zánětlivých procesech <sup>128, 132</sup>. O potenciálně terapeutických vlastnostech této kyseliny a některých jejich běžně dostupných derivátech (přítomných v potravinářských zdrojích nebo léčivých rostlinách) bylo napsáno mnoho publikací, z nichž některé z nich dávají velmi důkladný přehled o biologické aktivitě <sup>133</sup>. Tato látka, plnila a může plnit různé role při použití některých léčivých rostlin i potravních zdrojů <sup>134, 135</sup> a jsou vypracovány metody pro její získávání <sup>135</sup>.

Kyselina gallová je látka dobře připravitelná, lze ji získat pohodlně kyselou hydrolyzou hydrolyzovatelných tříslovin, což je v současnosti metoda už spíše obsoletní. Z hlediska



výroby jsou používány syntetické metody, lze ji připravit poměrně jednoduše např. syntézou z glukosy za využití mikrobiální katalýzy<sup>136</sup>, kondenzací trikarballylového esteru a acetalu mesoxalového esteru s následnou hydrolyzou vzniklého produktu a izolací kyseliny<sup>137</sup> a řadou dalších metod.

Nižší alifatické estery kyseliny gallové se v rostlinném materiálu (léčivých drogách) vyskytují zpravidla vždy dohromady s kyselinou gallovou, což je pochopitelné.

Methylester gallové kyseliny byl nalezen (izolován) v různých zdrojích, např. v kůře kořenů pivoňky keřovité (*Paeonia suffruticosa* Andrews)<sup>138</sup>, v tradiční léčivé droze Ajurvédy, tzv. indickém angreštu, tj. plodech smuteně lékařské (*Embllica officinalis*, resp. *Phyllanthus emblica* L.)<sup>139</sup>, v nati *Jussiaea repens* L.<sup>140</sup>, v jedlých semenech *Archidendron jirinda* (Jack.) I.C. Nielsen<sup>141</sup>, v nati *Bergenia ligulata* (Wall.) Engl.<sup>142</sup>, nadzemní části *Atraphaxis spinosa* L.<sup>143</sup>, v listech *Anacardium occidentale* L.<sup>144</sup>, ve větvičkách mangovníku indického (*Mangifera indica* L.)<sup>145</sup>, nadzemní části *Rhus coriaria* L.<sup>146</sup>, v osemeni *Givotia rottleriformis* Griff.<sup>147</sup> a mnoha dalších zdrojích.

U této sloučeniny byla nalezena zhášecí aktivita na peroxynitrit, antioxidační aktivita<sup>141</sup>,<sup>148</sup>, a také aktivita protizánětlivá<sup>138</sup>, (lipoxygenasová inhibiční aktivita)<sup>142</sup>, protizánětlivý účinek tlumení tvorby prozánětlivých mediátorů a aktivace makrofágů<sup>149</sup>, inhibice tvorby osteoklastů s možností příznivého zásahu do vývoje osteoporózy<sup>150</sup>.

T-lymfocyty patřící do skupiny CD4+ buněk jsou důležitou součástí imunitního systému. T-lymfocyty potlačují rozvinutí autoimunitních chorob udržováním tolerance vůči tělu vlastním tkáním a zabraňují tak tomu, aby se fyziologická odpověď organismu zvrátila v patologickou. Je však známo že rovněž zabraňují odstranění rakovinotvorných buněk z organismu a tak podporují rozvoj nádoru. V těchto případech by bylo žádoucí jejich působení potlačit. Studie *in vivo* provedená na myších prokázala, že methylester kyseliny gallové vykazuje silné protinádorové účinky způsobené potlačením nádorové infiltrace T-lymfocytů<sup>151</sup>.

Účinkem kyseliny gallové a methylesteru kyseliny gallové<sup>127</sup> na proliferaci buněk A 431 v závislosti na velikosti dávky se zabývala studie *in vitro*. Obě sloučeniny získané z přírodních zdrojů prokázaly v této studii protinádorový účinek na buňky linie A 431 (buňky lidského karcinomu kůže)<sup>152</sup>.

Zajímavé jsou účinky antiinvazivní: působí cytotoxicky<sup>144</sup>, vykazuje antikancerózní aktivitu vůči lidskému glioblastomu indukci apoptózy<sup>153</sup>, inhibuje proliferaci buněk hepatocelulárního karcinomu zvýšenou produkcí ROS a apoptózou<sup>154</sup>. Ovlivňuje ale také účinek invazivních bakteriálních agens. Má výrazné mikrobicidní účinky (ovlivnění bakteriální ClpP proteasy)<sup>155</sup>. Existuje názor, že v důsledku svých poměrně silných antibakteriálních účinků by mohl být využit k ovlivnění různých lidských onemocnění spojených s tvorbou bakteriálních biofilmů na tkáních<sup>145</sup>. Methylester kyseliny gallové také tlumí tvorbu biofilmu *Streptococcus mutans*<sup>146</sup> a zdá se, že by mohl být využitelný v přípravných dentální hygieny (zubní pasty). Bylo také zjištěno, že snižuje syntézu melaninu v buňkách Mel-Ab.

Nativně byl v rostlinách nalezen také ethylester kyseliny gallové a to opět v takových taxonech, které obsahují především hydrolyzovatelné třísloviny. Vyskytuje se běžně v potravinách, jako jsou vlašské ořechy<sup>156</sup> a byl prokázán v červeném vínu<sup>157</sup> a v řadě dalších potravin. Látka byla izolována z některých vrcholáků, např. listů *Terminalia myriocarpa* Van Heurck et Mull. Arg.<sup>158</sup>, z léčivé a okrasné rostliny *Acalypha wilkesiana* var. *lace-acalypha* (Muell & Arg.)<sup>159, 160</sup>, z plodů longanu (*Dimocarpus longan* Lour.)<sup>161</sup> a z nati aksamitníku (*Tagetes erecta* L.)<sup>162</sup> atd.

Biologická aktivita této látky je především antioxidační. Oproti předcházejícím dvěma sloučeninám nabyla praktického významu; je to bezpečná aditivní látka s označením E313, využitelná jako antioxidant v potravinách, tucích, kosmetice apod. Vykazuje také radikálově zhášecí aktivitu<sup>163</sup>. Významné jsou rovněž účinky antimikrobiální<sup>164, 165</sup>, a aktivita cytotoxická<sup>163</sup>.

Metody výroby tohoto esteru jsou různé, patrně nejběžnější je esterifikace kyseliny gallové ethanolem za enzymatické katalýzy<sup>166</sup>.

V této práci uvedený nález kyseliny gallové, methylesteru kyseliny gallové a ethylesteru kyseliny gallové v nati *Rhodiola rosea* L. je publikován patrně poprvé.

Při úrovni současných znalostí o obsahových látkách nadzemní části rozchodnice růžové lze pouze spekulovat o využitelnosti těchto látek při neurodegenerativních onemocněních. Dosud se jen málo ví o flavonoidním profilu v nati (jak vyplynulo z této práce, flavonoidní spektrum je zde kvalitativně široké a z hlediska kvantitativního bude tato skupina látek přítomna v nemalém obsahu). U neurodegenerativních chorob typu Alzheimerovy choroby

se objevují zmínky o příznivém vlivu polyfenolových látek. Tato skupina sloučenin zahrnuje různé flavonoidy, kurkumin, resveratrol, ale především 3-galloylestery flavonolů [(–)-epikatechinu a (–)-epigallokatechinu] <sup>167, 168, 169</sup>. Jakou roli zde hraje kyselina gallová jako esterifikující složka, není dosud známo, po podání flavonolů samostatných [tj. (–)-epikatechinu, (–)-epigallokatechinu] však nebyly pozorovány tak výrazné efekty, jako po podání esterů, zejména (–)-epigallokatechin-gallátu. Existuje názor, že právě tyto estery významně tlumí oxidační stres v průběhu vývoje Alzheimerovy choroby <sup>169</sup>. Samotná role kyseliny gallové je diskutována: jedním z patologických znaků Alzheimerovy choroby je vznik amyloidu agregací původně solubilní (degradovatelné) formy proteinu ( $\alpha$ -synukleinu) s primárně nebo sekundárně výrazně zastoupenou  $\beta$ -strukturou do formy fibrilární (rezistentní na degradaci). Patologická fibrilární forma amyloidu je skládána v  $\beta$ -strukturu (strukturu skládaného listu). Molekuly, které mohou zabránit vzniku amyloidních fibril, nebo oddělit toxické agregace se jeví jako slibná strategie k prevenci, nebo léčbě choroby. Studie *in vitro* prokazují, že kyselina gallová silně inhibuje vznik amyloidních fibril. Hmotnostní spektroskopie prokázala, že tato kyselina stabilizuje rozšířené, nativní struktury  $\alpha$ -synukleinu <sup>170</sup>. Další studie *in vitro* pomocí elektronové mikroskopie prokázala, že hroznový extrakt inhibuje vznik mikrofibril  $\kappa$ -kaseinu ( $\kappa$ -CN) mléčné bílkoviny, která tvoří amyloidní fibrily. Mezi složkami extraktu byla nejvíce aktivní kyselina gallová <sup>171</sup>.

Další pokusy ukáží, zda jsou využitelné silné antioxidační účinky kyseliny gallové při mozkové ischemii; je známo, že během ischemie a hypoperfúze dochází k poškození struktur mozku. Byla provedena studie na vyhodnocení účinku kyseliny gallové jako silného antioxidantu na ischemií/hypoperfuzí vyvolaném poškození mozku potkana. Studií *in vivo* bylo zjištěno, že podávání 10 mg/kg GA 5 dnů před poškozením a 5 dnů po poškození mozku se projevilo výrazným zlepšením senzomotoriky potkana <sup>172, 173</sup>.

## VII. LITERATURA

- <sup>1</sup> Opletal L., Chlebek J., Macáková K., Benešová N., Hošťálková A., Cahlíková L.: *Antioxidanty a degenerativní onemocnění*. Prakt. Lékáren. 9(3), 135 (2013).
- <sup>2</sup> Koukolík F., Jiráček R.: *Diagnostika a léčení syndromu demence*. Grada, Praha 1999.
- <sup>3</sup> Roth J., Sekyrová M., Růžička E.: *Parkinsonova nemoc*. Maxdorf, Praha 2004.
- <sup>4</sup> Havrdová E.: *Roztroušená skleróza*. Maxdorf, Praha 2005.
- <sup>5</sup> Holeček V.: *Volné radikály, antioxidanty a jak dále?* Klin. Biochem. Metab. 14(35), 142 (2006).
- <sup>6</sup> Češka R., et al.: *Interna*. Triton, Praha 2020.
- <sup>7</sup> Holeček V.: *Oxidační stres u nádorových onemocnění*. Klin. Biochem. Metab. 18(39), 225 (2010).
- <sup>8</sup> Ministerstvo zdravotnictví České republiky [online] c2014 [cit.2014-08-14] <[http://www.mzcr.cz/dokumenty/cesi-ziji-deletrapi-je-ale-civilizacni-nemocizmenit-to-muze-narodni-strategi\\_9418\\_1.htm](http://www.mzcr.cz/dokumenty/cesi-ziji-deletrapi-je-ale-civilizacni-nemocizmenit-to-muze-narodni-strategi_9418_1.htm)>.
- <sup>9</sup> Holeček V.: *Volné radikály, antioxidanty a jak dále?* Klin. Biochem. Metab. 14(35), 144 (2006).
- <sup>10</sup> [online] [cit.2014-08-12] <<http://portal.faf.cuni.cz/Groups/ADINACO/?lang=cs-CZ>>.
- <sup>11</sup> Cahlíková L., Ločárek M., Benešová N., Kučera R., Chlebek J., Novák Z., Opletal L.: *Isolation and cholinesterase activity of Narcissus extracts and Amaryllidaceae alkaloid*. Nat. Prod. Commun. 8(6), 781 (2013).
- <sup>12</sup> Pláteník J.: *Volné radikály, antioxidanty a stárnutí*. Interní Med. 11(1), 30 (2009).
- <sup>13</sup> Racek J., Holeček V.: *Enzymes and free radicals*. Chem. Listy 93, 774 (1999).
- <sup>14</sup> Zima T.: *Kapitoly z klinické biochemie*. Karolinum, Praha 2004.
- <sup>15</sup> Štípek S.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Grada, Praha 2000.
- <sup>16</sup> Ďoubal S., Klemra P., Filipová M., Dolejš J.: *Teoretická gerontologie*. Karolinum, Praha 1997.
- <sup>17</sup> *Současné teorie stárnutí*. [online] c2000 [cit.2014-08-08] <[http://apps.faf.cuni.cz/Gerontology/mechanisms/theory/theory\\_contemporary.asp#radikálu](http://apps.faf.cuni.cz/Gerontology/mechanisms/theory/theory_contemporary.asp#radikálu)>.
- <sup>18</sup> Huang D., Ou B., Prior R. L.: *J. Agric. The chemistry behind antioxidant capacity assays*. Food Chem. 53, 1841 (2005).
- <sup>19</sup> *Oxidační stres*. [online] c2008 [cit.2014-10-01] <[www.chembiolupol.cz/data/xinha/3\\_oxidacni\\_stres.pdf](http://www.chembiolupol.cz/data/xinha/3_oxidacni_stres.pdf)>.
- <sup>20</sup> Racek J.: *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. Galén, Praha 2003.
- <sup>21</sup> Dršata J., Netopilová M., Marklová E., Boušová I.: *Vybrané kapitoly z patobiochemie*. Karolinum, Praha 2009.

- 
- <sup>22</sup> Klaus A., Hirt H.: *Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction*. Annu. Rev. Plant Biol. 55, 373 (2004).
- <sup>23</sup> Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J.: *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39, 44 (2006).
- <sup>24</sup> Krejsek J., Kopecký O.: *Klinická imunologie*. Nucleus, Hradec Králové 2004.
- <sup>25</sup> Ďuračková Z.: *Volné radikály a antioxidanty v medicíně*. Slovak Academic Press, Bratislava 1998.
- <sup>26</sup> Halliwell B., Gutteridge J. M.: *The definition and measurement of antioxidants in biological systems*. Free Radic Biol Med. 18(1), 125 (1995).
- <sup>27</sup> Nauseef W. M.: *Myeloperoxidase Deficiency*. Hemat. Oncol. Clin. North Am. 2, 135 (1988).
- <sup>28</sup> Jordan V., Hemzalová M.: *Antioxidanty, zázračné zbraně*. Jota, Brno 2001.
- <sup>29</sup> Skoumalová A.: *Problematika volných radikálů a antioxidantů v medicíně*. [online] c2008 [cit.2014-09-12] <<https://lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/radikaly.ppt>>.
- <sup>30</sup> *Peroxidace lipidů*. [online] c2006 [cit.2014-08-10] [http://www.biology.estranky.cz/clanky/biochemie/oxidace\\_lipidu.html](http://www.biology.estranky.cz/clanky/biochemie/oxidace_lipidu.html).
- <sup>31</sup> Chmátalová Z., Skoumalová A.: *Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky*. Klin. Biochem. Metab. 22 (43), 189 (2014).
- <sup>32</sup> Cooke M. S., Evans M. D., Dizdaroglu M., Lunec J.: *Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease*. FASEB J. 17, 1195 (2003).
- <sup>33</sup> Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis C.: *A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis*. J. Environ. Sci. Health 27, 120 (2009).
- <sup>34</sup> Brtnická P.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Hradec Králové 2009.
- <sup>35</sup> Kalač P.: *Funkční potraviny: Kroky ke zdraví*. Dona, České Budějovice 2003.
- <sup>36</sup> Šivel M., Klajdus B., Kráčmar S., Kubáň V.: *Lutein - významný karotenoid ve výživě člověka*. Chem. Listy 107, 456 (2013).
- <sup>37</sup> Paulová H., Bochořáková H., Táborská Eva.: *Metody stanovení antioxidační aktivity In vitro*. Chem. Listy 98, 174 (2004).
- <sup>38</sup> Macáková K.: *Biological Activity of Selected Taxons of Mushrooms from Divisions Ascomycota and Basidiomycota. Doctoral Dissertation*. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2011, 126 pp.
- <sup>39</sup> Ou B., Hamps-Woodill M. Prior R. L.: *Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe*. J. Agric. Food Chem. 49, 4619 (2001).
- <sup>40</sup> Rapta P., Mišík V., Staško A., Vrábek I.: *Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study*. Free Radical Biol. Med. 18, 901 (1995).

- 
- <sup>41</sup> Singleton V.L., Rossi J. A.: *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. Am. J. Enol. Viticult. 16, 144 (1965).
- <sup>42</sup> Brewer M. S.: *Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Application*. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 10, 221 (2011).
- <sup>43</sup> Peter K. et al.: *Handbook of Herbs and Species*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge (2001).
- <sup>44</sup> Moure A. et al.: *Natural antioxidants from residual sources*. Food Chem. 72, 145 (2001).
- <sup>45</sup> Sikora E., Cieslik E., Topolska K.: *The sources of natural antioxidants*. Acta Sci. Pol. 7(1), 5 (2008).
- <sup>46</sup> Kolečkář V., Řeháková Z., Brojerová E., Kuča K., Jun K., Macáková K., Opletal L., Drašar P., Jahodář L., Chlebek J., Cahlíková L.: *Proanthocyanidins and Their Antioxidation Activity*. Chem. Listy 106, 113 (2012).
- <sup>47</sup> Sen S., Chakraborty R., Sridhar R., Reddy I. S. R.: *Challenges and opportunities in the advancement of herbal medicine*. Int. J. Herb. Med. 1(1), 67 (2011).
- <sup>48</sup> Debinska A., Mykkanen B., Kiec-Wilk B.: *Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes*. Br. J. Nutr. 99, 109 (2008).
- <sup>49</sup> Frei B.: *Natural antioxidants in human health and disease*. Academic Press Limited, London 1994.
- <sup>50</sup> Opletal L., Chlebek J., Macáková K., Benešová N., Hošťálková A., Cahlíková L.: *Antioxidanty a degenerativní onemocnění*. Prakt. Léč. 9(3), 138 (2013).
- <sup>51</sup> WHO Technical report: *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. Series 916, Geneva 2003.
- <sup>52</sup> Sedláček p., Langmajerová J., Zloch Z.: *Aktuální poznatky o významu antioxidantů ve výživě*. LF UK Plzeň [online] c2013 [cit.2015-08-01] <<http://www.vyzivaspol.cz/clanky-casopis/aktualni-poznatky-o-vyznamu-antioxidantu-ve-vyzive.html>>.
- <sup>53</sup> Trna J., Táborská E.: *Přírodní polyfenolové antioxidanty* [online] c2002 [cit.2014-09-02] <[www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf](http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf)>.
- <sup>54</sup> Williams R. J., Spencer J. P., Rice-Evans C.: *Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules*. Free Radic. Biol. Med. 36, 838 (2004).
- <sup>55</sup> Rechner A., Kuhnle G., Bremner P., Hubbard G. P., Moore K. P., Rice-Evans C. A.: *The metabolic fate of dietary polyphenols in humans*. Free Radic. Biol. Med. 33, 220 (2002).
- <sup>56</sup> Kimira M., Arai Y., Shimoi K., Watanabe S.: *Japanese Intake of Flavonoids and Isoflavonoids from Foods*. J. Epidemio. 8(3), 168 (1998).
- <sup>57</sup> Bhagwat S., Haytowitz D., B., Holden J. M.: *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods*, (2011).
- <sup>58</sup> Li Q., Niu S., Wang R., Li Y., Zhang R., Zhu D.: *Mechanisms that underlie the induction of vasodilation in pulmonary artery by rutin*. Int. Angiol. 31(6), 557 (2012).

- 
- <sup>59</sup> Vanacker S. A., Tromp M. N., Haenen G. R., Vandervijgh W. J., Bast A.: *Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 214, 755 (1995).
- <sup>60</sup> Beecher G.R.: *Biological Activities Associated with Human Health*. Pharm. Biol. 42(2), (2004).
- <sup>61</sup> Ferrieres J.: *The French paradox: Lessons for other countries*. Heart 90(1), 107 (2004).
- <sup>62</sup> Mgbonyebi O. P., Russo J., Russo I. H.: *Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells*. Int. J. Oncol. 12, 865 (1998).
- <sup>63</sup> Slanina J., Táborská E.: *Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka*. Chem. Listy 98, 239-245 (2004).
- <sup>64</sup> Šumpelová K.: *Rigorózní práce*. Univerzita Karlova. Hradec Králové 2017.
- <sup>65</sup> Opletal L.: *Pokroky ve farmacii*. Avicenum, Praha 1990.
- <sup>66</sup> Blahník J.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Praha 2010.
- <sup>67</sup> Jahodař L.: *Farmakobotanika, semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2006.
- <sup>68</sup> Brown R. P., Gerbarg P. L., Ramazanov Z.: *Herbal Gram*. 56, 40 (2002).
- <sup>69</sup> Brown R. P., Gerbarg P. L., Ramazanov Z.: *Rhodiola rosea: A Phytomedicinal Overview*. HerbalGram. 56, 42 (2002).
- <sup>70</sup> Kolodziej B., Sugier D.: *Influence of plant age on the chemical composition of Roseroot*. Acta Sci. Pol. 12(3), 147 (2013).
- <sup>71</sup> Kurkin V. A., Zapesochnaya G. G.: *Journal of Medicinal Plants*. Russian Academy of Science, Moscow 1985.
- <sup>72</sup> Vildová J., Kubeš J., Tůmová L.: *Léčivé rostliny s imunostimulačními účinky*. Prakt. Lékáren. 9(2), 90 (2013).
- <sup>73</sup> Valíček P., Kokoška L., Holubova K.: *Léčivé rostliny třetího tisíciletí*. Start, Praha 2001.
- <sup>74</sup> Kšádova K.: *Rostlinné adaptogeny v prevenci a terapii*. VOŠ A SZŠ MILLS s. r. o., Čelakovice 2011.
- <sup>75</sup> Liu Ch. B., Wang W., Bai F. W., Feng P., Su Z.: *Salidroside extr. From Rhodiola sachalinensis callus after microwave disruption*. Guocheng Gongcheng Xuebao 1(3), 324 (2001); Chem. Abstr. 135, 142042 (2005).
- <sup>76</sup> Wang S., You X. T., Wang F. P.: *HPLC determination of salidroside in the roots of Rhodiola genus plants*. Yaoxue Xuebao 27(11), 849 (1992); Chem. Abstr. 119, 56283.
- <sup>77</sup> Tuan L. P., Kim, Ho K. Y., Pyo H. S., Ji J. J., Seong K. J.: *Quantitative determination of salidroside and tyrosol from the underground part of Rhodiola rosea by HPLC*. Arch. Pharm. Res. 23(4), 349 (2000); Chem. Abstr. 133, 313748.
- <sup>78</sup> Nekratova, N. A., Krasnov E. A., Nekratov N. F., Mikhailova S. I.: *Changes of quantitative contents of salidroside and tannins in underground organs of Rhodiola rosea L. in its natural habitats in Altai*. Rastit. Resur. 28(4), 40 (1992); Chem. Abstr. 119, 167564.

- 
- <sup>79</sup> Wang X.: *HPLC determination of salidroside in 6 Rhodiola species growing in Qinghai*. Zhongguo Yaoxue Zazhi 35(8), 513 (2000); Chem. Abstr. 133, 301276.
- <sup>80</sup> Kang S., Wang J., Liu F., Xu Z.: *Quantitative analysis of salidroside and lotaustralin in Rhodiola by gas chromatography*. Zhongguo Zhongyao Zazhi 23(6), 365 (1998); Chem. Abstr. 129, 293961.
- <sup>81</sup> An F., Yue S., Guo D., Zheng J.: *Determination of salidroside in eight Rhodiola species by TLC-UV spectrometry*. Zhongguo Zhongyao Zazhi 23(1), 43 (1998); Chem. Abstr. 129, 272967.
- <sup>82</sup> Ding Ch.: *Exploration of method for preparing reference standard of salidroside and p-tyrosol*. Fenxi Ceshi Xuebao 16(1), 38 (1997); Chem. Abstr. 127, 343879.
- <sup>83</sup> Song D., Zhen J.: *Synthesis of salidroside*. Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi 29(10), 446 (1998); Chem. Abstr. 130, 25247.
- <sup>84</sup> Peng J., Ge Y., Li X.: *Studies on the chemical constituents of Rhodiola fastigata*. Yaoxue Xuebao 31(10), 798 (1996); Chem. Abstr. 127, 18822.
- <sup>85</sup> Yang H., Mei S., Peng L., Lin Z., Sun H.: *New glucoside from Rhodiola fastigata (Crassulaceae)*. Zhivuxue 44(2), 224 (2002); Chem. Abstr. 137, 275720.
- <sup>86</sup> Bao W., Wu W., Zhang W.: *Study on water-soluble constituent from rhizoma of Rhodiola rosea L. grown in China*. Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi 10(3), 209(2000); Chem. Abstr. 134, 219697.
- <sup>87</sup> Ruan X., Hou P., Zhou J., Wang Q., Li G.: *Analysis on the trace element and amino acid content in Xinjiang 6 series Rhodiola L. plant*. Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi 21(4), 542(2001); Chem. Abstr. 136, 66960.
- <sup>88</sup> Lovkova M. Y., Sokolova S. M., Buzuk G.N., Tyutekin Y. V.: *Selective accumulation of trace elements by phenol-synthesizing medicinal plants*. Dokl. Akad. Nauk 369(1), 141 (2001); Chem. Abstr. 134, 39535.
- <sup>89</sup> Rohloff J.: *Volatiles from rhizomes of Rhodiola rosea L.* Phytochemistry 59(6), 655 (2002); Chem. Abstr. 137, 106493.
- <sup>90</sup> Furmanowa M., Skopinska-Rozewska E., Rogala E., Malgorzata H.: *Rhodiola rosea In vitro culture: Phytochemical analysis and antioxidant action*. Acta Soc. Bot. Pol. 76(1), 69 (1998).93
- <sup>91</sup> Udintsev S., Schakhov V.: *Decrease of cyclophosphamide haematotoxicity by Rhodiola rosea root extract in mice with Ehrlich and Lewis transplantable tumors*. Eur. J. Cancer 27(9),1182 (1991).
- <sup>92</sup> Yuan Z., Ma Z.: *Studied on the scavenging effect of Rhodiola rosea L. and Radix Salvia miltiorrhiza on  $\cdot O_2$  and  $\cdot OH$  by electrochemistry method*. Fenxi Huaxue 27(6), 626 (1999); Chem. Abstr. 131, 194191.
- <sup>93</sup> Furmanowa M., Kedzia B., Hartwicz M., Kozlowski J., Krajewska-Patan A., Mscisz A., Jankowiak J.: *Phytochemical and pharmacological properties of Rhodiola rosea L.* Herba Pol. 45(2), 108(1999); Chem. Abstr. 132, 302985.



- 
- <sup>94</sup> Pooja A. K. R., Khanum F., Bawa A. S.: *Phytoconstituents and antioxidant potency of Rhodiola rosea a versatile adaptogen*. J. Food Biochem. 30(2), 203 (2006).
- <sup>95</sup> Furmanowa M., Skopinska-Rozewska E., Rogala E., Hartwich M.: *Rhodiola rosea in vitro culture – phytochemical analysis and antioxidant action*. Acta Soc. Bot. Pol. 67(1), 69(1998); Chem. Abstr. 130, 165596.
- <sup>96</sup> Borovskaya T. G., Fomina T. I., Iaremenko K. V.: *A decrease in the toxic action of rubomycin on the small intestine of mice with a transplantable tumor through the use of a Rhodiola extract*. Antibiot. Khimioterap. 33(8), 615 (1988).
- <sup>97</sup> Udintsev S., Krylova S., Fomina T.: *The enhancement of the efficacy of adriamycin by using hepatoprotectors of plant origin in metastases of Ehrlich's adenocarcinoma to the liver in mice*. Vopr. Onkol. 38(10), 1217 (1992).
- <sup>98</sup> Battistelli M., De Sanctis R., De Bellis R., Cucchiari L., Dachà M., Gobbi P.: *Rhodiola rosea as antioxidant in red blood cells: Ultrastructural and hemolytic behaviour*. Eur.J. Histochem. 49(3), 243 (2005).
- <sup>99</sup> Lee E.J., Kwon Y., Shetty K., Jang H.D.: *Antioxidant Activity of Rhodiola rosea Extract on Human Low-density Lipoprotein Oxidation and DNA Strand Scission*. Food Sci. Biotechnol. 13(6), 814 (2004).
- <sup>100</sup> Kelly S. G.: *Rhodiola rosea: A possible plant Adaptogen*. Alternat. Med. Rev. 6(3), 294 (2001).
- <sup>101</sup> Lishmanov I., Trifonova Z., Tsibin A., Maslova L., Dementeva L.: *Plasma beta-endorphin and stress hormones in stress and adaptation*. Biull. Eksp. Biol. Med. 103(4), 422 (1997).
- <sup>102</sup> Maslova L., Kondratev B., Maslov L., Lishmanov I.: *The cardioprotective and antiadrenergic activity of an extract of Rhodiola rosea in stress*. Eksp. Klin. Farmakol. 57(6), 61 (1994).
- <sup>103</sup> Azizov A. P., Seifulla R. D.: *The effect of elton, leveton, fitoton and adapton on the work capacity of experimental animals*. Eksp. Klin. Farmakol. 61, 61 (1998).
- <sup>104</sup> Lazarova M. B., Petkov V. D., Markovska V. L., et al.: *Effects of meclofenoxate and extr. R. rosea L. on electroconvulsive shock-impaired learning and memory in rats*. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 8, 547 (1986).
- <sup>105</sup> Jiang W., Meng X., Hao L., Cui L., Dong Z., Wang S.: *Study on anti-aging and anti-dementia effects of rhodosin on aging rats and experimental dementia rats*. Baiqien Yike Daxue Xuebao 27(2), 127 (2001); Chem. Abstr. 136, 210404.
- <sup>106</sup> Spasov A. A., Mandrikov V. B., Mironova I. A.: *Effect of rhodaxon preparation on the psychophysiological and physical adaptations of students to learning load*. Eksp. Klin. Farmakol. 63(1), 76 (2000); Chem. Abstr. 133, 359150.
- <sup>107</sup> Shevtsov V. A., Zholus B. I., Shervarly V. I., Volskij V. B., Korovin Y. P., Khristich M. P., Roslyakova N. A., Wikman G.: *A randomized trial of two different doses of a SHR-5 Rhodiola rosea extract versus placebo and control of capacity for mental work*. Phytomedicine 10(2-3), 95 (2005); Chem. Abstr. 139, 358568.

- 
- <sup>108</sup> Lishmanoc Y. B., Naumova A. V., Afanasev S. A., Maslov L. N.: *Role of the opioid systém in inotropic effect of Rhodiola rosea extract in ischemic and reperfusion heart injury.* Eksp. Klin. Farmakol. 60(3), 34(1997); Chem. Abstr. 128, 212936.
- <sup>109</sup> Maimeskulova L. A., Maslov L. N., Lishmanov Y. B., Krasnov E. A.: *Role of  $\mu$ - ,  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptors in the antiarrhythmic effect of Rhodiola rosea.* Eksp. Klin. Farmakol. 60(1), 38(1997); Chem. Abstr. 127, 214851.
- <sup>110</sup> Lin S., Liu Y., Zhao H., Zhang S.: *Inhibitory effect of salidroside on proliferation of rabbit pulmonary artery smooth muscle cells under hypoxia.* Zhongguo Bingli Shengli Zazhi 17(10), 968 (2001); Chem. Abstr. 137, 72989.
- <sup>111</sup> Park O. J.: *Effect of Rhodiola Extract Supplementation on Blood Lipid Concentrations and Anti-Oxidant Status in Rats Fed Highly Oxidized Linoleic Acid Diets.* Nutritional Sciences 4(2), 79(2001); Chem. Abstr. 136, 354624.
- <sup>112</sup> Yaremnnii, I. N., Grigoryeva N. F.: *Hepatoprotector properties of liquid extract from Rhodiola rosea.* Eksperimentalnaya i Klinicheskaya Farmakologiya 65(6), 57(2002); Chem. Abstr. 139, 17374.
- <sup>113</sup> Yakubovskii M. M., Pentyuk, A. A., Khmel'nitskii O. K., Oleinik, V. N.: *Effects of acute x-ray radiation and combined silica-based preparations on lipid peroxidation and structural changes in small intestine.* Radiats. Biol. Radioekol. 37(3), 366 (1997); Chem. Abstr. 127, 356561.
- <sup>114</sup> Yoshikawa M., Shimada H., Horikava S., Murakami T., Shimoda H., Yamahara J., Matsuda H.: *Bioactive constituents of Chinese natural medicines. IV. Rhodiolae Radix.(2): On the Histamine Release Inhibitors form the Underground Part of Rhodiola sacra (PRAIN ex HAMET) S. H. Fu (Crassulaceae).* Chem. Pharm. Bull. 45(9), 1498(1997); Chem. Abstr. 127, 305375.
- <sup>115</sup> Sugimito K., Nakgawa K., Hayashi S.: *Rhodiola extract as active oxygen scavenger and skin care preparation and deodorant.* JP 2002020301 A2 23 (2002); Chem. Abstr. 136, 99359.
- <sup>116</sup> Yanming L., Zhenmin Li., Xinchang Y.: *Natural bioactive beverage and its preparation process.* CN 1245217 A23 (2000); Chem. Abstr. 133, 251558.
- <sup>117</sup> Xingyou H.: *Preparation of Rhodiola tea.* CN 1170509 A21 (1998); Chem. Abstr. 132, 11819.
- <sup>118</sup> Lábler L., Schwarz V.: *Chromatografie na tenké vrstvě.* Nakladatelství ČSAV, Praha 1965.
- <sup>119</sup> Jork H., Funk W., Fisher W., Wimmer H.: *Thin-layer chromatography: Reagents and detection methods, part 1b.* VCH, Basel 1994.
- <sup>120</sup> Stahl E.: *Thin-layer chromatography, A laboratory handbook.* Springer, Berlin 1969.
- <sup>121</sup> Jork H., Funk W., Fisher W., Wimmer H.: *Thin-layer chromatography: Reagents and detection methods, part 1a.* VCH, Basel 1994.
- <sup>122</sup> Polášek M., Skála P., Opletal L., Jahodář L.: *Rapid automated assay of anti-oxidant/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection*

- 
- technique (SIA) using spectrophotometric detection. Anal. Bioanal. Chem. 379, 754 (2004).*
- <sup>123</sup> Kamatham S., Kumar N., Gudipalli P.: *Isolation and characterization of gallic acid and methyl gallate from seed coats of Givotia rottleriformis Griff. And their anti-proliferative effect on human epidermoid carcinoma A431 cells. Toxicolo. Rep. 2, 520-529 (2015).*
- <sup>124</sup> Cuerrier, A., Kwesi Ampong-Nyarko: *Rhodiola rosea*. Taylor and Francis Inc./CRC Press, Boca Raton (2019).
- <sup>125</sup> AISLP (Automatizovaný informační systém léčivých přípravků), verze 2021-1k, INPHARMEX spol. s.r.o., Praha 2021.
- <sup>126</sup> Křenková M.: *Fytofarmický výzkum nadzemní části mangolky čínské Schisandra chinensis (Tucz.) Baill.*, Disertační práce, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2003, 138s.
- <sup>127</sup> Blaschek W., Hilgenfeldt U., Holzgrabe U. a kol.: *HAGER –rOM 2011*. Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Springer, Heidelberg 2011.
- <sup>128</sup> Lemos M. L. B., Zambiasi R. C.: *Gallic acid: Natural occurrences, antioxidant activity and health implications*. Handbook on Galic Acid. Nova Science Publ.Inc., New York, 193-213, (2013).
- <sup>129</sup> Fernandes F. A. H., Salgado H. R. N.: *Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification*. Critical Reviews in Analytical Chemistry 46(3), 257-265 (2016).
- <sup>130</sup> Kawada M. et al.: *Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice*. Anti-Cancer Drugs 12(10), 847 (2001).
- <sup>131</sup> Faried A., Kurnia D., Faried LS., Usman N., Miyazaki T., Kato H., Kuwano H.: *Anti-cancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine*. Oncol. 30(3), 605 (2007).
- <sup>132</sup> Bai Jirong, Zhang Yunsen, Tang Ce, et al.: *Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation related disease*. Biomed. Pharmacother. (133), 110985 (2021).
- <sup>133</sup> Shalini M., Kalaivani T., Rajasekaran C.: *Therapeutic potential of gallic acid and its derivatives*. Recent Advances in Gallate Reserch 201-227, Nova Science Publ. Inc., (2014).
- <sup>134</sup> Penarrieta J. M., Molinedo P., Vila J. L.: *Gallic acid and its derivatives: Occurrence and identification in high altitude edible and medicinal plants*. Handbook of Gallic Acid. 313-328, Nova Science Publ. Inc., (2013).
- <sup>135</sup> Samar Al Jitan, Saeed Alkhoori, Lina F Yousef: *Phenolic acid from plants: Extraction and application to human health*. Nat. Prod. Chem. 58, 389-417 (2018).

- 
- <sup>136</sup> Kambourakis S., Draths K. M., Frost J. V.: *Synthesis of Gallic Acid and Pyrogallol from Glucose: Replacing Natural Product Isolation with Microbial catalysis*. J. Am. Chem. Soc. *122*, 9042-9043 (2000)
- <sup>137</sup> Hurt C. D.: *Preparation of gallic acid*. US3560569A (1971).
- <sup>138</sup> Dong Jing Park, Hee Jin Jung at al.: *Root bark of Paeonia Suffruticosa extract and its component methyl gallate posses peroxy nitrite scavenging activity an anti-inflammatory properties through NF-KB inhibition in LPS-treated mice*. Molecules *24*(19), 3483 (2019).
- <sup>139</sup> Jalal Asmita, Kholia Anjana: *A review on phytochemical perspective of Emblica officinalis*. Int. J. Chem. Stud. *6*(6), 358-362 (2018).
- <sup>140</sup> Ali Esmail All-Snafi: *Constituents and pharmacological importance of Jussiaea repens - A review*. Indo Am. Pharm. Sci *5*(4), 2206-2212 (2018).
- <sup>141</sup> Lubis M. Y., Siburian R. at al.: *Methyl gallate from jiringa (Archidendron jiringa) and antioxidant activity*. Asian J. Pharm. Clin. Res. *11*(1), 346-350 (2018).
- <sup>142</sup> Sharanya C. S., Arun K. G., at al.: *Designing of enzyme inhibitors based on active site specificity: Lessons from methyl gallate and its lipoxygenase inhibitory profile*. J. Recept. Signal Transduct. *38*(3), 256-265 (2018).
- <sup>143</sup> Wang X., Fayvush G., Khutsishvili M., Tamanyan K. at al.: *Phytochemical investigations of Atraphaxis spinosa L (Polygonaceae)*. Biochem. Syst. Ecol. *77*, 44-47 (2018).
- <sup>144</sup> Taiwo J. B., Fatkoun Amos A., at al.: *Identification of compounds with cytotoxic activity from the leaf of the Nigerian medicinal plant Anacardium occidentale L. (Anacardiaceae)*. Bioorg. Med. Chem. *25*(8), 2327-2335 (2017).
- <sup>145</sup> Subramanian R., Chandra M., at al.: *Isolation of Methyl gallate from Mango twigs and its Anti-biofilm Activity*. J. Biol. Activ. Prod. Nat. *6*(5-6), 383-392 (2016).
- <sup>146</sup> Kacergius T., Abu-Lafi S., Kirkliauskeine A., at al.: *Inhibitory capacity of Rhus coriaria L. extract and its major component methyl gallate on Streptococcus mutants biofilm formation by optical profilometry: Potential applications for oral health*. Mol. Med. Rep. *16*(1), 949-956 (2017).
- <sup>147</sup> Kamatham S., Kumar N., Gudipalli P.: *Isolation and characterization of gallic acid and methyl gallate from the seed coats of Givotia rottleriformis Griff. And their anti-proliferative effect on human epidermoid carcinoma A431 cells*. Toxicol. Rep. *2*, 520-529 (2015).
- <sup>148</sup> Söhretoglu D., Sabuncuoğlu S. A., Sakar M. K., Ozgünes H., Sterner O.: *Antioxidant effects of secondary metabolites from Geranium psilostemon*. Nat. Prod. Commun. *5*(6), 899-902 (2010).

- 
- <sup>149</sup> Correa L. B., Pádua L. A., Seito L. N., et al.: *Anti-inflammatory Effect of Methyl Gallate on Experimental Arthritis: Inhibition of Neutrophil Recruitment, Production of Inflammatory Mediators and Activation of Macrophages*. J. Nat. Prod. 79(6), 1554-1566 (2016).
- <sup>150</sup> Baek J. M., Kim J. Y., Lee C. H., Yoon K. H.: *Methyl galloate inhibits osteoclast formation and function by suppressing akt and Btk-PLC $\gamma$ 2-C $^{2+}$  signaling and prevents lipopolysaccharide-induced bone loss*. Int. J. Mol. Sci. 18(3), 581 (2017).
- <sup>151</sup> Lee H. et al.: *Methyl Gallate Exhibits Potent Antitumor Activities by Inhibiting Tumor Infiltration of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$  Regulatory T Cells*. J. Immunol. 185(11), 6698 (2010).
- <sup>152</sup> Kamatham S., Kumar N., Gullipali P.: *Isolation and characterization of gallic acid and methyl gallate from the seed coats of Givotia rottleriformis Griff. and their anti-proliferative effect on human epidermoid carcinoma A431 cells*. Toxicol. Rep. 2, 520 (2015).
- <sup>153</sup> Chaudhuri D., Ghate N. B., Singh S. S., Mandal N.: *Methyl gallate isolated from Spondias pinnata exhibits anticancer activity against human glioblastoma by induction of apoptosis and sustained extracellular signal-regulated kinase  $\frac{1}{2}$  activation*. Pharmacogn. Mag. 11(42), 269-276 (2015).
- <sup>154</sup> Huang CY., Chang YJ., Wei PL., Hung CS., Wang W.: *Methyl gallate gallic acid-derived compound, inhibit cell proliferation through increase ROS production and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells*. PloS One 16(3), e0248521 (2021).
- <sup>155</sup> Zheng D., Xu Y., Yuan G., Wu X., Li Q.: *Bacterial ClpP protease is a potential target for methyl gallate*. Front. Microbiol. 11:598692 (2020).
- <sup>156</sup> Zhang Z., Liao L., Moore J., Wu T., Wang Z.: *Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (Juglans Regia L.)*. Food Chem. 113(1), 160-165 (2009).
- <sup>157</sup> Monagas M., Suárez M., Gómez-Cordovéz C., Bartolomé B.: *Simultaneous Determination of nonanthocyanin Phenolic compounds in Red Wines by HPLC-DAD/ESI-MS*. Am. J. Enol. Vitic. 56(2), 139-147 (2005).
- <sup>158</sup> Marzouk MA., El-Toumy SA., Moharram FA., Shalaby NM., Ahmed AA.: *Pharmacologically active ellagitannins from Terminalia myriocarpa*. Planta Med. 68(6), 523-527 (2002).
- <sup>159</sup> Gupta A., Kumar R., Bhattacharyya P., Bishayee A., Pandey AK.: *Terminallia bellirica (Gaernt.) roxb. (Bahera) in health and disease: A systematic and comprehensive review*. Phytomedicine 77, 153278 (2020).
- <sup>160</sup> Oladimeji HO., Tom UE., Attih EE.: *Ethyl gallate and pyrogallol from Acalypha wilkesiana var. Lace-acalypha (Muell & Arg.)*. Eur. Chem. Bull. 3(8), 788-791 (2014).
- <sup>161</sup> Yang B., Jiang Y. M., Shi J., Chen F.: *Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (Dimocarpus longan lour.) fruit – A review*. Food Res. Int. 44(7), 1837-1842 (2011).
- <sup>162</sup> Khulbe A.: *A review on Tagets Erecta*. World J. Pharm. Sci. 3(3), 645-649 (2015).

- 
- <sup>163</sup> Kalaivani T., Rajasekaran C., Mathew L.: *Free radical scavenging, cytotoxic, and hemolytic activities of an active antioxidant compound ethyl gallate from leaves of Acacia nilotica L. Wild. Ex. Delile Subsp. Indicia (Benth.) Brenan.* J. Food Sci. 75(6), 144-149 (2011).
- <sup>164</sup> Ooshiro A., Hiradate S., Kawano S., Takushi T.: *Identification and activity of ethyl gallate as an antimicrobial compound produced by Geranium carolinianum.* Weed Biol. Manag. 9(2), 169-172 (2009).
- <sup>165</sup> Vandal J., Abou-Zaid MM., Ferroni G., Leduc L.: *Antimicrobial activity of natural products from the flora of Northern Ontario, Canada.* Pharm. Biol. 53(6), 800-806 (2015).
- <sup>166</sup> Weetall H. H.: *Enzymic synthesis of gallic acid esters.* Eur. Pat. 0137601A2 (1984).
- <sup>167</sup> Sun AY., Wang Q., Simonyi A., Sun GY.: *Botanical phenolics and brain health.* Neuromolecular Med. 10(4), 259-274 (2008).
- <sup>168</sup> Kelsey N. A., Wilkins H. M., Linseman D. A.: *Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents.* Molecules 15(11), 7792-7814 (2010).
- <sup>169</sup> Pocernich C. B., Lange M. L. B., Sultana R., Butterfield R. A.: *Nutritional approaches to modulate oxidative stress in Alzheimer's disease.* Curr. Alzheimer Res. 8(5), 452-469 (2011).
- <sup>170</sup> Liu Y., Carver JA., Calabrese AN., Pukala TL.: *Gallic acid interacts with  $\alpha$ -synuclein to prevent the structural collapse necessary for its aggregation.* Biochim. Biophys. Acta 1844(9), 1481 (2014).
- <sup>171</sup> Liu Y., Pukala TN., Musgrave IF., Williams DM., Dehle FC., Carver JA.: *Gallic acid is the major component of grape seed extract that inhibits amyloid fibril formation.* Biorg. Med. Chem. Lett. 23(23), 6336 (2013).
- <sup>172</sup> Thiagarajan Kalaivani, Chandarasekran Rajasekran, et al.: *Structural Elucidation and Antioxidant Activity of Ethyl Gallate isolated from Acacia nilotica L.* Ntl Acad Sci Lett (41), 355-359 (2018).
- <sup>173</sup> Farbood Y., Sarkaki A., Hashemi S., Mansouri M. T., Dianat M.: *The effects of gallic acid on pain and memory following transient global ischemia/reperfusion in Wistar rats.* Avicenna J. Phytomed. 3(4), 329 (2013).

## VIII. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Fakulta	Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra	Katedra farmaceutické botaniky
Kandidát	Mgr. Zbyněk Graja
Konzultant	Prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.
Název rigorózní práce	Přírodní látky a jejich biologická aktivita VIII. Antioxidační aktivita obsahových látek nati <i>Rhodiola rosea</i> L.
Klíčová slova	<i>Rhodiola rosea</i> L., nadzemní část, antioxidační aktivita, obsahové látky, fenolové látky

Z čerstvé nati rozchodnice růžové (*Rhodiola rosea* L., Crasulaceae), která byla získána z monokultury pěstované na Zahradě léčivých rostlin FaF byl připraven primární ethanolový extrakt, který byl po odstranění ethanolu podroben sekvenční extrakci (n-BuOH – EtOAc + EtOH 95 : 5, posléze srážení Et<sub>2</sub>O). Při bio-guided assay (stanovení celkových fenolových sloučenin podle Folina-Ciocalteua, antioxidační aktivita DPPH testem) se ukázalo, že filtrát vzniklý srážením Et<sub>2</sub>O výtřepku EtOAc + EtOH 95 : 5 diethyletherem obsahuje nejvíce fenolových sloučenin a má nejvyšší antioxidační aktivitu. Z odparku tohoto filtrátu byly preparativní sloupcovou chromatografií na silikagelu získány tři sloučeniny: ZG-1, ethylester kyseliny gallové, ZG-2, methylester kyseliny gallové a ZG-3, kyselina gallová. Přestože výskyt těchto látek je popisován i u jiných rostlin, bylo provedeno stanovení obsahu všech tří uvedených sloučenin, aby se zjistilo, zda se nejedná o artefakty, vzniklé při velké extrakci a preparativním dělení extraktu. Výsledky HPLC analýzy dvou typů extraktů připravených z čerstvé nati stejné provenience jako v případě preparativního extraktu (za použití ethanolu a acetonitrilu) ukázaly, že oba estery kyseliny gallové jsou v čerstvé nati přítomny nativně. V ethanolovém extraktu byl mírně zvýšen obsah ethylesteru kyseliny gallové a mírně snížen obsah této kyseliny, v acetonitrilovém extraktu byl obsah všech uvedených sloučenin srovnatelný s obsahem v extraktu ethanolovém.

Jedná se o původní výsledky, které nebyly v nati rozchodnice růžové dosud publikovány. Všechny tři látky jsou biologicky aktivní a mohly by být využity případně v přípravě nutraceutik.

## IX. ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty Pharmaceutical Faculty in Hradec Kralove

Department Department of Pharmaceutical Botany

Candidate Mgr. Zbyněk Graja

Consultant Prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Name of rigorous thesis Natural substances and their biological activity VIII.

Antioxidant activity of substances contained in aerial parts of *Rhodiola rosea* L.

Keywords *Rhodiola rosea* L., aerial part, antioxidant activity, constituents, phenolic compounds

The primary ethanolic extract was prepared from the fresh aerial parts of *Rhodiola rosea* L. obtained from monoculture grown at Botanical garden of Medicinal Plants of Pharmaceutical Faculty. The extract was subjected to sequential extraction after removing ethanol (n-BuOH – EtOAc + EtOH 95 : 5, and precipitation with Et<sub>2</sub>O). The Bio-guided assay (determination of total phenolic compounds according to Folin-Ciocalteu, antioxidant activity by DPPH test) showed that filtrate formed by Et<sub>2</sub>O precipitation of EtOAc + EtOH 95 : 5 extract contains more phenolic compounds and has the highest antioxidant activity. From the evaporated filtrate, three compounds were obtained by preparative column chromatography: ZG-1 (ethyl gallate), ZG-2 (methyl gallate) and ZG-3 (gallic acid). Although the occurrence of these substances is described in other plants, the content of all three mentioned substances was determined to discover whether they are artefacts caused by large extraction and preparative separation of extract. The results of HPLC analysis of two types of extract prepared from the fresh aerial parts of the same provenience as in the case of preparative extract (ethanol and acetonitrile were used) showed the presence of both esters of gallic acid in fresh samples. The content of ethyl gallate was slightly increased in ethanolic extract, and the content of gallic acid was slightly decreased. The content of all mentioned substances in acetonitrile extract was comparable to the content of the ethanolic extract.



These are original results, which have not yet been published in aerial parts of *Rhodiola rosea* L. All three substances are biologically active and could possibly be used as part of nutraceuticals.