

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

**Základní fytochemický výzkum některých taxonů oddělení Eumycota
s ohledem na studium antioxidační aktivity VII.**

Rigorózní práce

Hradec Králové, leden 2006

Hana Mrvíková

Ráda bych poděkovala Doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za odborné vedení mé rigorózní práce, za poskytnutí cenných rad a všestrannou pomoc při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům katedry farmaceutické botaniky a ekologie, kteří mi umožnili působit v jejich pracovním prostředí.

Obsah:

I. ÚVOD	6
II. CÍL PRÁCE	8
III. TEORETICKÁ ČÁST	9
1. Charakteristika sledovaných taxonů	9
1.1. Úvod.....	9
1.2. Systematické zařazení.....	9
1.3. Čeleď Boletaceae.....	11
1.3.1. Rod <i>Leccinum</i>	11
1.4. Čeleď Hydnaceae.....	11
1.4.1. Rod <i>Hydnum</i>	11
1.5. Čeleď Pleurotaceae.....	11
1.5.1. Rod <i>Pleurotus</i>	11
1.6. Čeleď Polyporaceae.....	12
1.6.1. Rod <i>Albatrellus</i>	12
1.7. Čeleď Russulaceae.....	12
1.7.1. Rod <i>Lactarius</i>	12
1.7.2. Rod <i>Russula</i>	13
1.8. Čeleď Strophariaceae.....	15
1.8.1. Rod <i>Hypholoma</i>	15
1.9. Čeleď Telephoraceae.....	16
1.9.1. Rod <i>Sarcodon</i>	16
2. Chemická skladba hub	17
2.1. Úvod.....	17
2.2. Primární metabolity.....	18
2.2.1. Sacharidy.....	18
2.2.2. Lipidy.....	19
2.2.3. Proteiny.....	19
2.3. Minerály.....	19
2.4. Vitaminy.....	19
2.5. Těžké kovy.....	19
2.6. Barviva.....	20
2.7. Pach a vůně.....	20
2.8. Chuť.....	21
2.9. Sekundární metabolity.....	21
2.9.1. Rod <i>Leccinum</i>	21
2.9.2. <i>Albatrellus ovinus</i> (SCHAEFF. ex FR.) KOTL. et POUZ.....	24
2.9.3. <i>Panus conchatus</i> (BULL ex FR.) FR.	25
2.9.4. Rod <i>Lactarius</i>	27

2.9.4.1. <i>Lactarius blennius</i> (FR. ex FR.) FR	28
2.9.4.2. <i>Lactarius deterrimus</i> GRÖGER.	30
2.9.4.3. <i>Lactarius vellereus</i> (FR.) FR.	31
2.9.5. Rod <i>Russula</i>	34
2.9.5.1. Izolace a struktura pteridinů z <i>Russula</i> sp.	35
2.9.5.2. <i>Russula delica</i> FR. EMEND. BRES.	36
2.9.6. <i>Hydnum repandum</i> L.	40
2.9.7. <i>Hypholoma sublateritium</i> (FR.) QUÉL	40
2.9.8. <i>Sarcodon imbricatus</i> (L. ex FR.) P. KARST.	43
3. Biologická aktivita zkoumaných druhů hub	45
3.1. Úvod.....	45
3.2. Screening.....	45
3.2.1. Materiál.....	45
3.2.2. Antibakteriální aktivita.....	45
3.2.3. Fungicidní aktivita.....	46
3.2.4. Larvicidní a molluscicidní aktivita.....	46
3.2.5. Antioxidační a antiradikálová aktivita.....	46
3.2.6. Výsledky.....	47
3.3. Ověřování antibiotické aktivity kultur bazidiomycetů.....	47
3.3.1. Metodika testování.....	47
3.3.2. Výsledky.....	48
3.4. Houby potenciálně karcinogenní.....	48
3.5. Houby způsobující alergickou odezvu.....	48
3.6. Houby s účinky cytostatickými.....	49
3.7. Houby vykazující antigenotoxickou a bio-antimutagenní aktivitu	50
4. Sekvenční injekční analýza	52
4.1. Volné radikály a antioxidanty	52
4.1.1. Volné radikály	52
4.1.2. Antioxidační ochranný systém	53
4.1.3. Antioxidační terapie	54
4.2. Sekvenční injekční analýza	55
4.2.1. Princip a vlastnosti metody SIA	55
4.2.2. Uplatnění SIA v praxi	57
4.2.3. Satnovení antioxidační aktivity	57
4.2.4. Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu	58
5. Tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography, TLC)	60
5.1. Úvod.....	60

5.2. Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii.....	60
5.3. Chromatografické adsorbenty.....	60
5.4. Detekční činidla.....	61
IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	66
1. Potřeby	66
1.1. Rozpouštědla.....	66
1.2. Chemikálie.....	66
1.3. Stanovovaná látka.....	67
1.4. Laboratorní sklo a přístroje.....	67
2. Příprava extraktů	69
2.1. Použitý materiál.....	69
2.2. Postup přípravy lyofilizátu.....	70
3. Sekvenční injekční analýza	72
3.1. Stanovení antioxidační aktivity DPPH testem pomocí SIA.....	72
3.2. Hodnoty naměřených antioxidačních aktivit u sledovaných taxonů.....	73
4. Hodnocení extraktů	81
4.1. Hodnocení extraktů tenkovrstvou chromatografií.....	81
4.2. Vyhodnocení reakcí na detekce D1 – D24.....	106
V. DISKUSE	111
VI. SOUHRN	116
VII. LITERATURA	119

I. ÚVOD

Řada nemocí, na které lidé předčasně umírají nebo které jim ztrpčují život, je způsobena účinky volných radikálů. Ty neustále napadají bílkoviny, uhlovodíky, tuky a nukleové kyseliny obsažené v lidském organismu. Existuje teorie, která předpokládá, že proces stárnutí je způsoben především účinky volných radikálů. Podle ní jsou tyto látky mnohem snadněji a v daleko větším množství produkovány v organismu starších lidí. Avšak pro celou populaci platí, že neexistuje žádná možnost, jak se volným radikálům vyhnout. Lze však omezit množství, v němž jsou volné radikály v lidském těle produkovány a jejich působení maximálně neutralizovat.

Lidský organismus je vybaven ochrannými antioxidačními systémy, které mohou reaktivní radikály pohlcovat nebo jejich tvorbu brzdít. Mezi tyto systémy patří antioxidační enzymy. Pro jejich tvorbu a funkci je potřeba dostatečné množství některých vitaminů, minerálů a stopových prvků a dalších látek s antioxidačními účinky, které systém podporují. Právě tyto důležité látky jsou dnes dostupné v podobě rozmanitých potravních doplňků, jejichž množství na trhu rok od roku přibývá. Zaznamenáváme určitou renesanci, tedy návrat k přírodním zdrojům. Moderní lékařské vědě se podařilo vyvinout takové analytické postupy a informační základy, které ve svém důsledku vedou k pochopení principů, jež po staletí působí v oblasti léčitelství nejrůznějších kultur a národů a jejichž účinky byly dlouho pouze empirického charakteru.

Jedním z nadějných přírodních zdrojů se zdají být houby. Zúžím zde okruh na pododdělení hub stopkovýtrusých. Na celém světě neustále probíhají tisíce studií zaměřených na obsahové látky Basidiomycet, na jejich biologickou aktivitu zahrnující mj. aktivitu antibiotickou, antioxidační, cytostatickou ale také na toxické působení hub. Touto problematikou se zabývá i má práce.

Díky pokrokům vědy bylo možné izolovat z hub látky typu β -glukanu a chitosanu, které mají velmi příznivý vliv na zdraví. β -glukan je zařazen americkým úřadem pro kontrolu léků a potravin (FDA) do kategorie zcela bezpečných látek pro lidský organismus. Je to unikátní přírodní polysacharid, netoxický, nenávykový, který představuje prevenci a doplňkové řešení zdravotních potíží jako infekčních onemocnění, onemocnění způsobené oslabením imunitního

systému, rakovina, alergie, kloubní a mimokloubní revmatismus, vysoká hladina cholesterolu, syndrom chronické únavy, žaludeční vředy a podpora krevetvorby. Účinek β -glukanu se v těle projevuje na různých úrovních. Především ovlivňuje buňky zvané makrofágy a působí jako imunomodulátor. Stimulací tří důležitých cytokinů IL-2, IFN- γ a TNF inhibuje růst metastatických rakovinných buněk *in vivo*. Působí selektivně, tj. ničí jen buňky nádorové na rozdíl od klasické chemoterapie. Klinická studie provedená u žen, které měly rekurentní maligní nádory prsu po mastektomii a ozařování, dokládá, že podáváním β -glukanu došlo ke kompletnímu vyléčení těchto velmi indolentních nádorů. Navíc se po léčbě velmi rychle obnovila kůže v místě nádoru. β -glukan je také silný „scavenger“, vycytávač volných radikálů, poskytuje ochranu proti radiaci (rentgenové paprsky, ultrafialové paprsky ze slunečního záření, mobilní telefony, obrazovky počítačů, vedení vysokého napětí), urychluje zotavení poškozených tkání, zvyšuje účinky některých léků.

Chitosan , další přírodní polysacharid, je nevstřebatelný a nestravitelný. Má mohutné vazebné schopnosti. Podporuje zažívání a pomáhá snižovat přebytečný cholesterol.

II. CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce bylo:

- dohledat v dostupné literatuře informace o obsahových látkách sledovaných taxonů.
- připravit lyofilyzáty z extraktů hub pro následný fytochemický výzkum.
- stanovit antioxidační aktivitu lyofilyzátů pomocí sekvenční injekční analýzy (SIA) za použití DPPH testu.
- provést základní fytochemický screening obsahových látek skupinovými detekčními činidly na základní skupiny metabolitů pomocí tenkovrstvé chromatografie.

III. TEORETICKÁ ČÁST

1. Charakteristika sledovaných taxonů

1.1. Úvod

Makromycety mohou být z hlediska účinků na člověka jedlé nebo nejedlé, avšak též jedovaté nebo naopak léčivé. ¹

Jedlé houby jsou takové, které neškodí lidskému zdraví a mají určitý nutriční význam. Kulinářské vlastnosti hub závisejí i na stáří plodnic, na jejich uchování a také na způsobu přípravy pokrmů.

Nejedlé houby jsou takové, které jsou nepoživatelné pro hořkou nebo palčivou chuť, nepříjemnou vůni či tuhou dužninu. K nejedlým houbám, resp. houbám, které nesbíráme, počítáme také houby podezřelé, o jejichž požitelnosti je dosud málo známo.

Jedovaté houby jsou takové, které obsahují látky toxické pro člověka v takovém množství, že požití může způsobit poškození zdraví. Je nutno pamatovat na to, že i jedlé staré, zapařené, nedostatečně tepelně upravované nebo opakovaně ohřívání houby mohou způsobit otravy.

Léčivé houby jsou takové, u kterých bylo pozorováno, že mají příznivé účinky na některá onemocnění. Tato problematika byla dosud poměrně málo sledována a důsledně vědecky zkoumána. Jen několik málo druhů hub lze dnes nalézt v lékopisech. ¹

1.2. Systematické zařazení ²

Říše: Fungi – houby

Oddělení: Eumycota – vlastní houby

Pododdělení: Basidiomycotina – stopkovýtrusé houby

Třída: Homobasidiomycetes

Podtřída: Hymenomycetidae – houby rouškaté

➤ Řád: Cantharellales

Čeleď: Hydnaceae ³

Rod: *Hydnum*

Druh: *Hydnum repandum*

➤ Řád: Polyporales

Čeleď: Polyporaceae⁵

Rod: *Albatrellus*

Druh: *Albatrellus ovinus*

➤ Řád: Russulales

Čeleď: Russulaceae⁵

Rod: *Lactarius*

Druh: *Lactarius blennius*

Lactarius deterrimus

Lactarius vellereus

Rod: *Russula*

Druh: *Russula acrifolia*

Russula coerulea

Russula delica

Russula integra

Russula olivacea

➤ Řád: Boletales

Čeleď: Boletaceae⁵

Rod: *Leccinum*

Druh: *Leccinum quercinum*

➤ Řád: Agaricales

Čeleď: Pleurotaceae⁵

Rod: *Pleurotus*

Druh: *Panus conchatus*

Čeleď: Strophariaceae⁵

Rod: *Hypholoma*

Druh: *Hypholoma sublateritium*

➤ Řád: Telephorales

Čeleď: Telephoraceae⁵

Rod: *Sarcodon*

Druh: *Sarcodon imbricatus*

Pojednáváné druhy hub patří tedy do sedmi čeledí:

1.3. Čeleď: Boletaceae (Hřibovité)

1.3.1. Rod: *Leccinum*, (Kozák)

Mykorrhizní houby s listnatými a jehličnatými stromy. Mnohé druhy na řezu červenají, černají nebo modrají. ³

Leccinum quercinum PILL.

Kozák dubový



Obr. 1: *Leccinum quercinum* ⁵²

Výskyt: v listnatých lesích, na hrázích rybníků, pod duby, roztroušeně

Červen až říjen

Chuť lahodná, vůně nevýrazná

Jedlý ⁴

1.4. Čeleď: Hydnaceae (Lišákovité)

1.4.1. Rod: *Hydnum*, (Lišák)

V dnešním významu je tvořen pouze třemi druhy (*H. rufescens*, *H. albidum*, *H. repandum*). Žádný z nich není jedovatý. ³

Hydnum repandum L. (*Dentinum repandum* ⁴)

Lišák zprohýbaný



Obr. 2: *Hydnum repandum* ⁵³

Výskyt: ve všech lesích, zvláště jehličnatých, roste hojně

Červenec až říjen

Chuť mírná, vůně příjemná

Jedlý ⁴

1.5. Čeleď: Pleurotaceae (Hlívovité)

1.5.1. Rod: *Pleurotus*, (Hlíva)

Středně velké houby rostoucí jednotlivě nebo v trsech na dřevinách. ⁵

***Panus conchatus* (BULL. ex FR.) FR. (*Pleurotus conchatus*, *Panus torulosus* ⁵)**

Hlíva fialová



Obr. 3: *Panus conchatus* ⁵⁴

Výskyt: roste v trsech na pařezech listnatých stromů, hlavně březových

Na podzim

Zajímavá je její změna barev od pěkně fialové až do pleťové nebo kožově žluté

Nejedlá ⁵

1.6. Čeleď: Polyporaceae (Chorošovitě)

1.6.1. Rod: *Albatrellus*, (Krásnoporka)

Pozemní, dužnaté a jednoleté houby, rostoucí jednotlivě nebo srůstající po několika dohromady, jedlé. ⁵

***Albatrellus ovinus* (SCHAEFF. ex FR.) KOTL. et POUZ. (*Caloporus ovinus*, *Polyporus ovinus* ⁵)**

Krásnoporka mlynářka



Obr. 4: *Albatrellus ovinus* ⁵⁵

Výskyt: ve smrčinách, zejména v podhorských polohách, obvykle ve skupinách, hojně

Červen až říjen

Chuť mírná, vůně příjemná ⁴

Jedlá, ale tuhá ⁵

1.7. Čeleď: Russulaceae (Holubinkovitě)

1.7.1. Rod: *Lactarius*, (Ryzec)

Houby pozemní, drobné, středně i velmi veliké, různých barev, lysé nebo chlupaté, křehké; při rozlomení roní dužnina vodnaté, zbarvené nebo bílé mléko, které se na vzduchu u některých druhů různě zbarvuje. ⁵

U ryzců stejně jako u holubinek platí pravidlo ochutnávání: druhy palčivé nebo nechutné se nejedí, ostatní ano. ⁵

Jedná se o mykorhizní houby. ³

***Lactarius blennius* (FR. ex FR.) FR.**

Ryzec zelený



Obr. 5: *Lactarius blennius* ⁵⁶

Výskyt: v listnatých lesích pod buky, roste hojně

Červen až listopad ⁴

Mléko je bílé, zasycháním šedozelené, palčivé ⁵

Nejedlý ⁵

***Lactarius deterrimus* GRÖGER**

Ryzec smrkový



Obr. 6: *Lactarius deterrimus* ⁵⁷

Výskyt: pod smrky na kyselých a vápenitých půdách, velmi hojný

Srpen až říjen

Chuť nahořklá

Mléko je oranžově červené, po několika minutách se pomalu zbarvuje do vínově červena

Jedlý, méně chutný ³

***Lactarius vellereus* (FR.) FR.**

Ryzec plstnatý



Obr. 7: *Lactarius vellereus* ⁵⁸

Výskyt: v listnatém a jehličnatém lese, hojně rostoucí

Srpen až říjen ³

Chuť hořce palčivá, vůně příjemná

Mléko bílé, neměnné, palčivé ⁴

Nejedlý ⁴

1.7.2. Rod: *Russula*, (Holubinka)

Houby pozemní, většinou velké, křehké. Klobouky nejrozmanitějších barev, s okrajem sehnutým, ve stáří na středu často prohloubené. ⁵

Houby mykorhizní, při poranění nevytéká mléko. Některé palčivé druhy jsou jedovaté. Jejich negativní působení se však omezuje na přechodné žaludeční a střevní poruchy spojené s nevolností a vyskytuje se zejména při zvýšené konzumaci za syrova. Je vyvoláno ostrými pryskyřičnatými látkami. ³

Rostou v létě a na podzim, obvykle hromadně. ⁵

***Russula acrifolia* ROMAGN**

Holubinka ostrá



Obr. 8: *Russula acrifolia* ⁵⁹

Výskyt: roste v listnatých i jehličnatých lesích

Od léta do podzimu

Nejedlá ⁶

***Russula coerulea* FR. EMEND. COOKE (*R. amara*, *R. caerulea*, *R. amoenata* ⁵)**

Holubinka hořká



Obr. 9: *Russula coerulea* ⁶⁰

Výskyt: roste roztroušeně v březových, osikových a hlavně borových lesích na vlhčích místech

Červenec až říjen ⁵

Chuť mírná, vůně nenápadná

Jedlá, po odstranění silně hořké pokožky klobouku a oškrábání povrchu třeně ⁴

***Russula delica* FR. EMEND. BRES. (*R. brevipes*, *R. chloroides* ⁵)**

Holubinka bílá



Obr. 10: *Russula delica* ⁶¹

Výskyt: ve všech lesích i za sucha, hojně

Červenec až říjen

Chuť nepatrně ostrá, méně příjemná, vůně kořená

Jedlá, omezeně ⁴

***Russula integra* L. ex Fr. ss. R. MRE. (*R. polychroma* ⁵)**

Holubinka celokrajná



Obr. 11: *Russula integra* ⁶²

Výskyt: v lesích jehličnatých, zejména ve smrčínách

Červenec až říjen

Chuť příjemná, lehce pryskyřičná, vůně nenápadná ⁴

Jedlá ⁵

***Russula olivacea* (SCHAEFF. ex Secr.) Fr.**

Holubinka olivová



Obr. 12: *Russula olivacea* ⁶³

Výskyt: roste dosti hojně, hlavně na vyhřátých okrajích lesů
všeho druhu

Červenec až říjen ⁵

Jedna z největších holubinek

Chuť lahodná, vůně nevýrazná

Jedlá ⁴

1.8. Čeled': Strophariaceae (Límcovkovité)

1.8.1. Rod: *Hypholoma*, (Třepenitka)

Prostřední nebo malé, většinou trsnaté dřevní nebo humusové houby žlutavých barev.

Klobouk je v mládí obvykle spojen pavučinatým závojem, z něhož pochází třepení na okraji klobouku, avšak později mizí beze stopy. Část druhů je jedlá (t.maková), nejedlá (t. cihlová) i jedovatá (t. svazčitá). ⁵ Jedná se o saprofyty. ³

***Hypholoma sublateritium* (Fr.) Quél. (*Naematoloma sublateritium*, *Hypholoma lateritium* ⁵)**

Třepenitka cihlová



Obr. 13: *Hypholoma sublateritium* ⁶⁴

Výskyt: na tlejících pařezech a kořenech jehličnatých i listnatých stromů, v trsech nebo jednotlivě, hojně

Červenec až listopad

Chuť hořká, vůně nenápadná

Nejedlá ⁴

1.9. Čeleď Telephoraceae (Plesňákovité)

1.9.1. Rod: *Sarcodon*, (Lošák)

Houby pozemní, klobouk nepravidelně okrouhlý, hrbolatý, růstem do sebe nezalévající větvičky, listy apod. Většinou nejedlé. ⁵

Dávají přednost horským stanovištím. ³

Sarcodon imbricatus (L. ex Fr.) P. Karst. (*Hydnum imbricatum* ⁵)

Lošák jelení



Obr. 14: *Sarcodon imbricatus* ⁶⁵

Výskyt: jehličnaté lesy na písčitéch podkladech, zejména v podhorských oblastech; dříve běžná houba, dnes roztroušeně

Srpen až říjen

Chuť lehce nahořklá, u přestárých jedinců hořká, vůně kořená ⁴

Jedlý, ale tuhý ⁵

2. Chemická skladba hub

2.1. Úvod

Všem houbám je společné, že nemají zeleň listovou (chlorofyl) jako zelené autotrofní rostliny. Proto nejsou schopny vytvářet z jednoduchých minerálních látek pomocí sluneční energie organickou hmotu svého těla. Vyživují se heterotrofně, tj. staví své tělo z látek rostlinného nebo živočišného původu, pocházejících z organismů buď odumřelých a tlejících, nebo živých. V prvním případě jde o saprofytický způsob života, v druhém o parazitický.¹

Charakteristickou složkou buněčných stěn všech vláknitých hub je chitin. Chitin je vysokomolekulární látka složená z aminocukrů (zejména poly-N-acetylglukosaminu), která se nachází též v zevní kostře členovců. Je přítomna v podhoubí i v plodnicích. Zaživačnými žaludečními šťávami člověka je téměř neporušitelná a způsobuje proto těžkou stravitelnost některých druhů hub.¹

U některých hub jsou však tyto stěny utvořeny z polymerních (složitých) cukrů, mannanu a glukanu, a někdy i z bílkovin.⁵

Plazma houbových buněk obsahuje v malém množství cukry, rozpustné i rezervní, a tuky, které dohromady tvoří hlavní bázi výživných látek organismu houby. Největší procento váhy hub tvoří voda, obsažená zejména v plazmě, jíž mají houby 70 – 95 %. Proto sušením pozbývají asi až $\frac{9}{10}$ vlastní váhy. Z minerálních látek, které se starají o udržení iontové rovnováhy v plazmě, jsou nejhojnější sloučeniny draslíku a fosforu. Vedle těchto látek, jejichž funkce pro život organismu houby je zřejmá, obsahují však houby velká množství látek s funkcí dosud více či méně nejasnou; terpenické látky, tzv. pryskyřičnaté látky, aromatické sloučeniny (zejména chinony), alkaloidy a mnoho zástupců jiných skupin látek, s nimiž se v hojnější míře setkáváme až u zelených rostlin.⁵

Převážná většina lidské populace se o houby zajímá z hledisky jejich použití v kuchyni. Pokud hledíme jen na energetickou hodnotu, podobají se lesní houby nejvíce zelenině, jak je zřejmé z tabulky⁴:

	Voda	Bílkoviny	Tuky	Cukry	Vláknina	Popeloviny
Hřib obecný	87,1	5,39	0,40	2,72	1,01	0,95
Žampion polní	89,7	4,88	0,20	1,11	0,83	0,82
Ryzec pravý	88,8	3,08	0,76	2,18	3,63	0,67
Liška obecná	91,4	2,64	0,43	0,99	0,96	0,74
Průměrné složení hub	89,2	3,06	0,41	1,09	1,22	0,82
Hovězí maso	72,0	21,00	5,50	0,50		1,00
Vepřové maso	47,5	14,50	37,30			0,70
Játra	71,5	20,00	3,50	3,50		1,50
Treska	81,5	17,00	9,30			1,20
Květák	91,0	2,40	0,30	4,50	1,80	0,80
Špenát	93,4	2,20	0,30	1,70	0,50	1,90
Mrkev	86,8	1,20	0,30	9,00	1,70	1,00
Brambory	74,9	2,00	2,00	20,90	1,00	1,10
Průměrné složení zeleniny	89,4	2,32	0,28	0,94	1,20	1,00

Pozn.: V tabulce jsou uvedeni jen někteří zástupci jednotlivých skupin, proto průměrné složení neodpovídá průměru z uvedených hodnot.

Vlastní výživná hodnota není ve srovnání s masem a rybami příliš vysoká. Z hlediska lidské výživy je u hub důležitý spíše obsah minerálních solí, fermenty podporující trávení i další biofaktory. ³

Byly zjištěny i látky snižující hladinu cholesterolu a ovlivňující krevní tlak. Předností je i nízká stravitelnost hub, zvláště jejich stěn, která způsobuje větší peristaltiku střev. ²

2.2. Primární metabolity

Primární metabolismus = soubor životně důležitých metabolických reakcí, probíhajících ve všech organismech, neboli základní látková přeměna ⁷

2.2.1. Sacharidy

Houby obsahují 1 – 6 % cukrů, a to jednak tzv. membránové cukry (tvoří stěny buněk), jednak rezervní cukry, zejména glukany, mannany a galaktany (glukan z hub se velmi podobá jaternímu cukru glykogenu, a proto se také někdy nazývá glykogen) a rozpustné cukry, z nichž nejdůležitější jsou mannit a trehalóza (90 % všech rozpustných cukrů), doprovázená volemitolem, sorbitolem, erythritolem a arabitolem, a v jednotlivých případech i dalšími

sloučeninami. Slizové látky jsou rovněž tvořeny cukry: polyuronidy (glukuronidy) a pentozany (v průměru 7 %).⁵

2.2.2. Lipidy

Vedle cukrů hrají hlavní roli jako rezervní látky hub tuky. Vyskytují se ve velkých množstvích v myceliu i sporách. Jsou to jednak glyceridy, obdobné běžným olejům či tukům, jednak glykolipidy, obdoby vosků. Tyto lipoidní látky tvoří asi 0,5 – 1,5 % váhy houby, někdy však daleko více.⁵

Dále se jedná o lipoproteidy, fosfolipidy, steroidy aj.¹

2.2.3. Proteiny

Látek bílkovinné povahy je v houbách (podobně jako v zelených rostlinách) velmi málo, protože pro tyto organismy mají polymerní cukry podobný význam jako bílkoviny pro živočichy, a tudíž nepotřebují bílkoviny v tak velkých množstvích. Celkový podíl všech látek bílkovinného charakteru u hub nebo jejich základních stavebních kamenů je 0,24 – 3,89 % (tj. aminokyselin, peptidů nižších i vyšších, bílkovin, betainů). Do skupiny peptidů patří nejprudší známé houbové jedy, amanitiny, faloidin a faloin. Produkty rozkladu bílkovin ve starých živých houbách bývají často jedovaté. Jsou tak příčinou toxicity starých jedlých hub.⁵

2.3. **Minerály**

Nejhojnější jsou sloučeniny draslíku a fosforu.⁵

2.4. **Vitamíny**

Neobyčejně bohaté jsou houby na skupinu vitamínů B a jako v jediných zástupcích rostlinné říše se v nich nachází provitamin D.⁴

Karotenoidy jsou obsaženy jen v některých houbách, a to v malých množstvích; jsou důležité tím, že jedním z produktů jejich přeměny je vitamín A.⁵

2.5. **Těžké kovy**

Houby mají obecnou vlastnost koncentrovat ve svém pletivu těžké kovy. Především se jedná o kadmium, cesium, olovo a rtuť. Analýzami bylo zjištěno, že je možné konzumaci hub

přijmout toxické množství těchto prvků. Bezsporu se jedná o případ sekundární toxicity a za běžných podmínek tato situace nehrozí. ⁸

2.6. Barviva

Houby jsou zbarveny řadou barviv, která patří do různých skupin organických sloučenin. Barviva jsou přítomna v plazmě nebo ve vakuolách buněk, anebo na jejich povrchu, kde bývají v podobě krystalků. Jindy zase jsou zbarveny stěny hyf. Xanthony jsou příčinou žlutého zbarvení hub, některé deriváty piperazinu a pyrazinu způsobují jejich červené zbarvení, jeden mutant klanolístky obecné (*Schizophyllum commune*), pěstovaný na dusíkaté živné půdě, produkuje indigo. Nejcharakterističtějšími barvivy jsou však chinoidní látky: benzochinony mají většinou barvu žlutou, někdy až červenou, naftochinony bývají červené a přecházejí do tmavších tónů, kdežto antrachinony jsou modré až černé. Někdy můžeme pozorovat změnu barvy dužniny po nalomení nebo při pomačkání houby např. modrání a opět odbarvování (některé hříby), dále červenání, hnědnutí, černání a jiné barevné změny. Houby totiž často obsahují tato barviva v bezbarvé leukoformě: při styku se vzdušným kyslíkem dochází k oxidaci leukoformy na okysličenou barevnou formu, vlastní barvivo. Mezi takové látky patří např. červený boletol u hřibů, který se mění po okysličení na modré barvivo. Tato barviva bývají někdy nestálá a buď dalším okysličením, nebo jinými vlivy (např. enzymatickými) se mohou opět dále měnit, takže barva někdy zase zmizí. ⁵

U ryzců je situace poněkud jiná. Tyto houby mají ve svých plodnicích dlouhé hyfy, zvané mléčnice, které jsou naplněny mlékovitou tekutinou s pryskyřičnými kapénkami. Na ochutnání bývá toto mléko někdy příjemné, např. u syrovinky (*Lactarius volemus*), jindy trpké až palčivé, jako třeba u ryzce ryšavého (*Lactarius rufus*) a jiných druhů. Toto mléko u některých druhů barvu nemění, zatímco u jiných ve styku se vzduchem žloutne, modrá až fialová, anebo oranžová, jako např. u ryzce pravého (*Lactarius deliciosus*). Tato houba obsahuje seskviterpenickou látku, jež se mění na oranžový prekursor látek modrého až fialového zbarvení, laktarazulenu a laktaroviolinu. ⁵

2.7. Pach a vůně

Pach bývá, stejně jako barva, pro houby velmi typický. Je důležitým systematickým znakem a většinou je velmi stálý, proto se dobře hodí k určování mnoha druhů. Tzv. typický houbový

pach není zatím připsán žádné chemické sloučenině, přestože bylo této problematice věnováno v posledních letech značné úsilí. Ovšem mnoho hub má zvláštní nehoubový pach, např. kořený (způsobený hořčičnými oleji), anýzový (anisaldehyd), ovocný (příčinou jsou estery).⁵

Existují i známé vůně připomínající česnek, čpavek, sýr, strouhaný kokos, spálenou rohovinu, karbol, rybu, okurky nebo žluklou mouku.³

Příčinou odporného zápachu hub bývají nízké aminy.⁵

2.8. Chut'

Zatímco vůni lze vnímat snadno, při chuťové zkoušce je třeba postupovat opatrně.³

Chuť není ani v nejmenším rozhodujícím znakem pro to, zda je houba jedlá nebo jedovatá. Houby s chutí za syrova nepříjemnou mohou být po kuchyňské úpravě velmi chutné a naopak, příjemně chutnající houby mohou být smrtelně jedovaté. Zjišťovat jedlost či nejedlost podle chuti můžeme jen u holubinek a ryzců.⁴

U hub se nejčastěji setkáváme s chutěmi, které označujeme jako palčivá, hořká, moučná nebo jen houbová.³

2.9. Sekundární metabolity

Sekundární metabolismus = reakce vytvářející látky specifické pro určité taxony⁷

Ne zcela ke všem zkoumaným taxonům hub v této práci se podařilo dohledat dostatek informací o sekundárních metabolitech. Některé druhy nebyly patrně ještě natolik prozkoumány, aby se zjištěné informace daly zveřejnit ve vědeckých publikacích.

2.9.1. Rod: *Leccinum*, (Kozák)

Čeleď: Boletaceae (Hřibovité)

Houby tohoto rodu obsahují čtyři typy C₂₈ sterolů⁹:

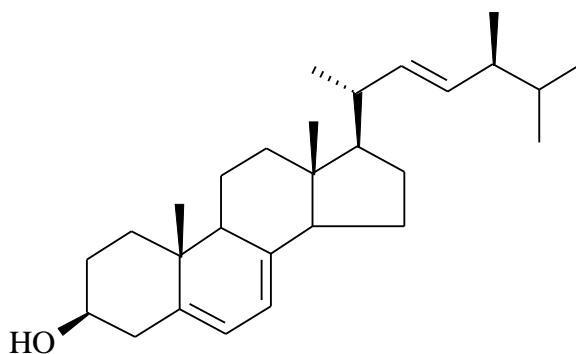
▪ **Ergosterol**

Systematický název: ergosta-5,7,22-trien-3β-ol

Je to hlavní houbový sterol mnoha druhů hub, obsažený jak ve vřeckovýtrusých tak ve stopkovýtrusých houbách kromě rzí.

Charakteristika: malé, hydratované, ploché, deskovité krystaly z alkoholu, hydratované jehlicovité krystalky z etheru. Nejlepší krystalická forma obsahuje 1,5 molu H₂O. Taje při 168 °C. Kompletní odstranění vody je téměř nemožné a výsledkem je amorfni hmota o rozmezí bodu tání 166 – 183 °C. Ergosterol je prakticky nerozpustný ve vodě. Jeden gram se rozpustí v 660 ml alkoholu, ve 45 ml vroucího alkoholu, v 70 ml etheru, v 39 ml vroucího etheru a v 31 ml chloroformu. Precipituje v přítomnosti digitoninu. Je-li ergosterol vystaven vlivu světla a vzduchu, zežloutne. Kyslíkaté formy peroxidu a vodíku mohou vytvářet polyhydrosloučeniny.

Biologická aktivita: působením UV záření rozvine ergosterol silnou aktivitu vitamínu D₁.⁹



Ergosterol

Vzorec I

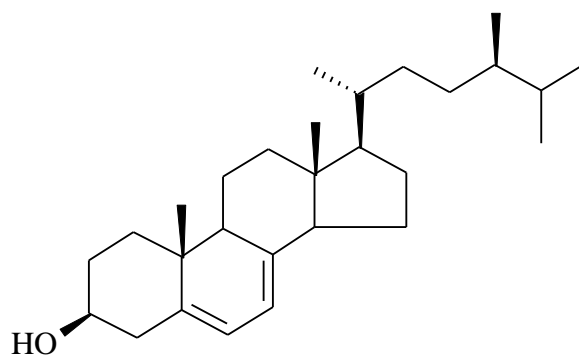
▪ **(24S)24-methylcholesta-5,7-dien-3β-ol**

Systematický název: ergosta-5,7-dien-3β-ol

Tento sterol byl nalezen u četných druhů hub rouškatých (Hymenomycetidae).

Charakteristika: krystalizuje z chloroform-methanolu, bod tání 148 – 150 °C. Acetáty krystalizují z aceton-methanolu, bod tání 153 – 155 °C.

Izolace: buňky z kvasnic byly odplaveny v 10% methanolovém roztoku KOH, methanol byl odstraněn za použití vakua a materiál, rozpustný v etheru, byl přeměněn na benzoové deriváty. Benzoáty byly separovány preparativní tenkovrstvou chromatografií na silikagelu GF₂₅₄ následovanou TLC impregnovanou dusičnanem stříbrným.⁹

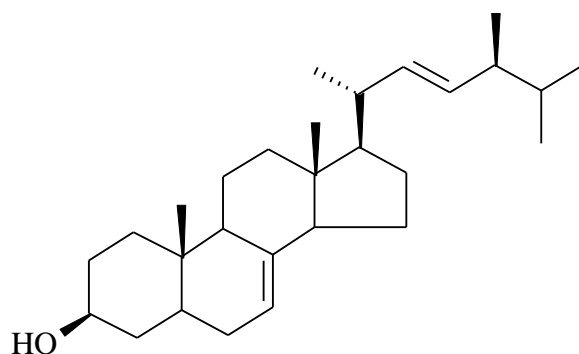


(24*S*)24-methylcholesta-5,7-dien-3β-ol

Vzorec II

▪ **5,6-dihydroergosterol**

Systematický název: ergosta-7,22-dien-3β-ol; 24-methylcholesta-7,22-dien-3β-ol ⁹



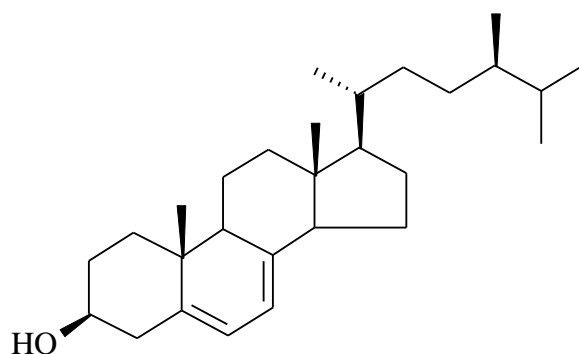
5,6-dihydroergosterol

Vzorec III

▪ **22,23-dihydroergosterol**

Systematický název: ergosta-5,7-dien-3β-ol

Byl nalezen v četných druzích hub rouškatých (Hymenomycetidae) ⁹



22,23-dihydroergosterol

Vzorec IV

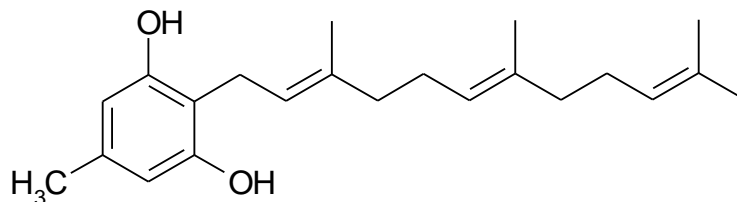
Ve volně rostoucích čerstvých plodnicích 14 taxonů, mj. také v plodnici *Leccinum quercinum*, bylo identifikováno pomocí GC/MS (gas chromatography/mass spectrometry) 45 těkavých, nestálých sloučenin. Nejvíce zastoupeny byly: 1-okten-3-ol, (E)-2-oktenol, 1-okten-3-on, oktanol, 3-oktanon, 3-oktanol, N(2-phenylethyl)acetamid, benzaldehyd, limonen, geranyl aceton, farnesyl aceton a (E,E)-farnesol. **Camphen** a **germacren D** byly v houbách vůbec poprvé identifikovány.¹⁰

2.9.2. *Albatrellus ovinus* (SCHAEFF. ex FR.) KOTL. et POUZ.

Krásnoporka ovčí

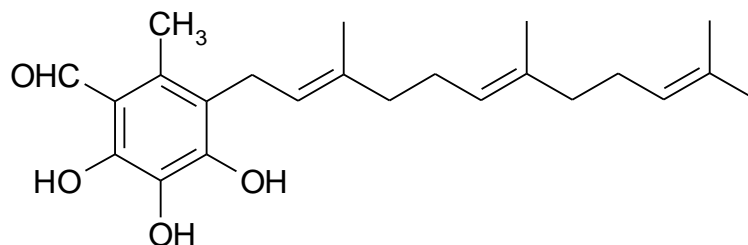
Čeleď: Polyporaceae (Chorošovitě)

Tento druh produkuje lipofilní fenolové deriváty **grifolin** (vzorec V¹¹), **skutigeral** (vzorec VI¹¹) a **kristatovou kyselinu** (vzorec VII¹¹) s dráždivým účinkem na GIT (Gastrointestinální trakt). Jako následky jsou popisovány gastroenteritidy. Obvyklá délka zdravotních obtíží je 3 – 4 h a rekonvalescence trvá 24 – 48 h. Podráždění GIT se projevuje jako nauzea, vomitus, diaree, koliky a bolesti břicha. Někdy může být provázeno svalovými křečemi, poruchami cirkulace a ztrátou elektrolytů.⁸



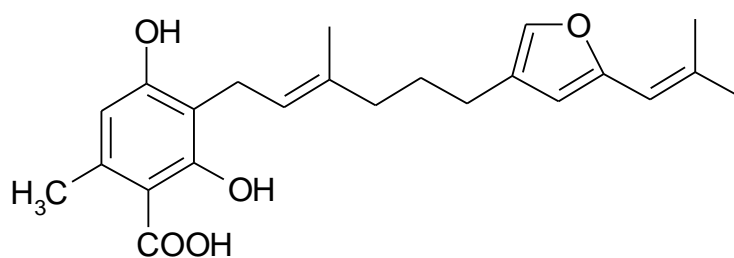
Grifolin

Vzorec V



Skutigeral

Vzorec VI

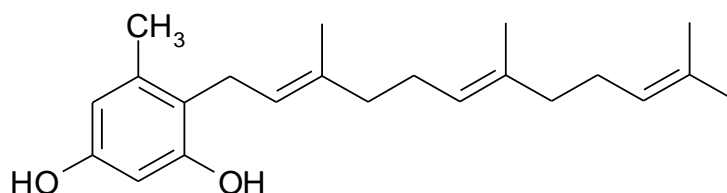


Kristatová kyselina

Vzorec VII

Podle výzkumu Institutu biologické psychiatrie má skutigeral schopnost inhibovat *in vitro* vazbu 3H-SCH 23390 k dopaminovému receptoru v membránách mozku krys. ¹²

V roce 1977 izolovala a identifikovala skupina českých vědců z lipofilní frakce čerstvých plodnic *Albatrellus ovinus* kromě grifolinu (vzorec V) a **neogrifolinu** (vzorec VIII) další fenolické meroterpenoidy E,E-5-methyl-2-(3, 7, 11-trimethyl-2, 6, 10-dodekatrienyl)-1, 3-dimethoxybenzen, E,E-5-methyl-2-(3, 7, 11-trimethyl-2, 6, 10-dodekatrienyl)-1-hydroxy-3-methoxybenzen a E,E-5-methyl-4-(3, 7, 11-trimethyl-2, 6, 10-dodekatrienyl)-1, 3-dimethoxybenzen. ¹³

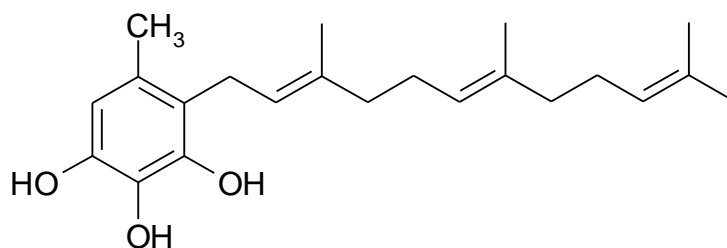


Neogrifolin

Vzorec VIII

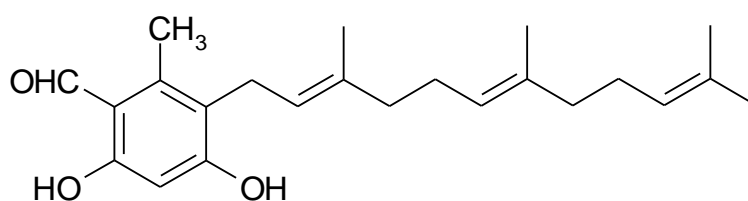
Studie prováděná v roce 2002 v Japonsku s taxonem *Albatrellus ovinus* byla zaměřena na deriváty neogrifolinu vykazující antioxidační aktivitu. Z japonských hub byly izolovány sloučeniny: grifolin, neogrifolin, **3-hydroxyneogrifolin** (vzorec IX), **1-formylneogrifolin** (vzorec X) a **1-formyl-3-hydroxyneogrifolin** (vzorec XI). Jejich antioxidační aktivita byla porovnávána s antioxidační aktivitou α – tokoferolu a BHA (tert-butyhydroxyanisol). Měření probíhalo za použití klasického DPPH testu; k roztoku antioxidantu o koncentraci 20 μ M v ethanolu (2 ml) byl přidán pufr (octan sodný, 2 ml) a 1 ml 500 μ M stabilního radikálu DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) v ethanolu. Po 30 minutách byla spektrofotometrem při vlnové délce 517 nm měřena absorbance roztoku. ¹⁴

Závěr studie byl velice zajímavý. 3-Hydroxyneogrifolin a 1-formyl-3-hydroxyneogrifolin vykazovaly silnější antioxidační aktivitu než α – tokoferol nebo BHA. ¹⁴



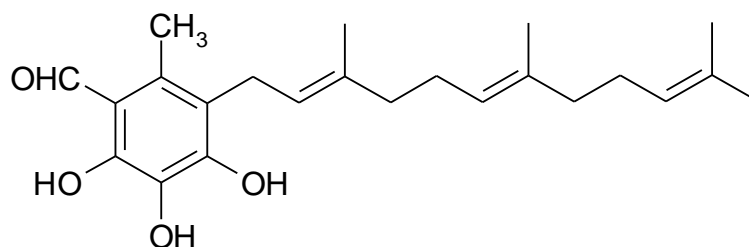
3-Hydroxyneogrifolin

Vzorec IX



1-Formylneogrifolin

Vzorec X



1-Formyl-3-hydroxyneogrifolin

Vzorec XI

2.9.3. *Panus conchatus* (BULL. ex FR.) FR.

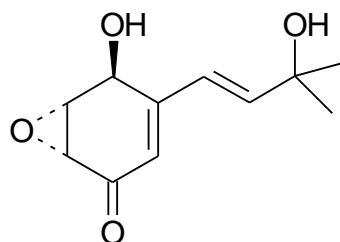
Hlíva fialová

Čeď: Pleurotaceae (Hlívovité)

Hlavní metabolity *Panus conchatus*, **panepoxydon** a **panepoxydion**, byly identifikovány jako 2 β -hydroxy-4-(1 β -hydroxy-3,3-dimethyl-2-propenyl)-5-oxo-7-oxabicyklo[4.1.0]hept-3-en a 2,5-dioxo-4-(1 β -hydroxy-3,3-dimethyl-2-propenyl)-7-oxabicyklo[4.1.0]hept-3-en.

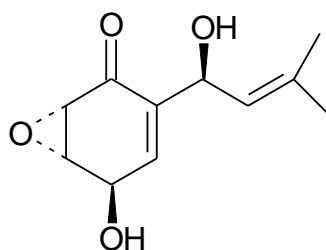
Dalšími obsahovými látkami jsou **isopanepoxydon**, **neopanepoxydol** a **6-hydroxy-2,2-dimethylchroman-4-on**.¹⁵

Isopanepoxydon a panepoxydon byly úspěšně připraveny racemickými syntézami jako výsledek pokusů prováděných na americké universitě v Yale. To vše vedlo také k určení struktury isopanepoxydonu (vzorec XII) a znovuobjevení struktury panepoxydonu (vzorec XIII).¹⁶



Isopanepoxydon

Vzorec XII



Panepoxydon

Vzorec XIII

Panus conchatus vylučuje ligninolytické enzymy zejména laccasu a manganperoxidázu, jimiž se zabývalo mnoho studií.

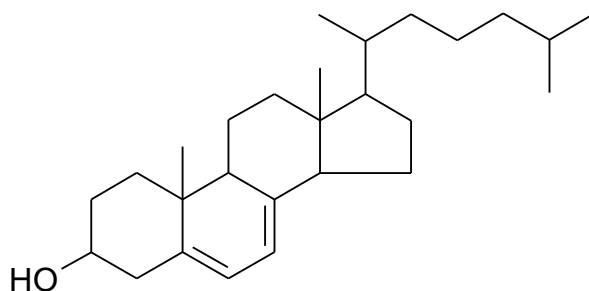
2.9.4. Rod *Lactarius*, (Ryzec)

Čeleď: Russulaceae (Holubinkovité)

Ryzce obsahují latex. Potenciálně toxické jsou druhy s bílým latexem, bílým latexem měnícím se ve žlutý a bílý, později fialovým latexem. Ostrá, štiplavá nebo palčivá chuť je nejpravděpodobněji dána skupinou seskviterpenů **marasmanové** nebo **laktaranové** struktury pocházející z **velutinalových esterů**, které jsou přirozenými metabolity houby. Mohou být také příčinou gastroenteritidy rozvíjející se po požití mj. *Lactarius vellereus*.⁸

Houby tohoto rodu obsahují **7-dehydrocholesterol** neboli provitamin D₃ se systematickým názvem cholesta-5,7-dien-3β-ol. 7-dehydrocholesterol vytváří deskovité krystaly z ethylether

– metanolu s bodem tání 150 – 151 °C. Je nerozpustný ve vodě a rozpustný v obvyklých organických rozpouštědlech. S chloridem hlinitým poskytuje růžové až modré, s chloralhydrátem modré a s 90% kyselinou trichloroctovou červené zbarvení. (Acetát krystalizuje z metanolu). 7-dehydrocholesterol byl izolován z neutrální lipidové frakce z kolony chromatografované na neutrálním hliníku užitím 10%, 20%, 50% benzen/*n*-hexanu a benzenu. Frakce obsahující steroly byla analyzována na silikagelu pomocí TLC (pláty impregnované rhodaminem 0,1%) nebo acetylována s pyridin-acetanhydridem a čištěna TLC (pláty impregnované 20% AgNO₃). Biologická aktivita se projevuje působením UV záření na 7-dehydrocholesterol, který konvertuje na vitamin D₃.⁹



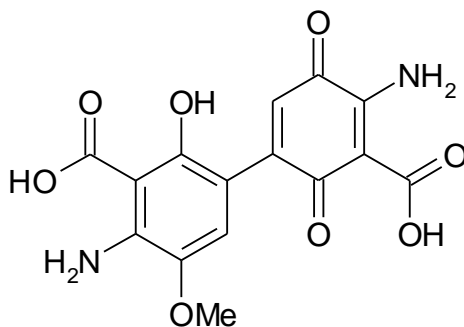
7-dehydrocholesterol

Vzorec XIV

2.9.4.1. *Lactarius blennius* (FR. ex FR.) FR.

Ryzec zelený

Pomocí 2D-NMR metod byla objevena struktura diphenylchinonového derivátu **blennionu**, obsaženého v nejedlé houbě *Lactarius blennius*. Je to zelený pigment, který je možno připravit synteticky ze dvou jednotek 3, 6-dihydroxyanthranilové kyseliny.¹⁷

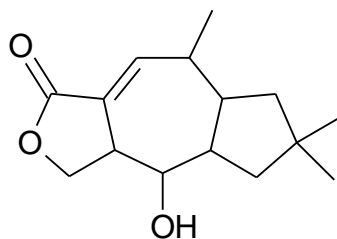


Blennion

Vzorec XV

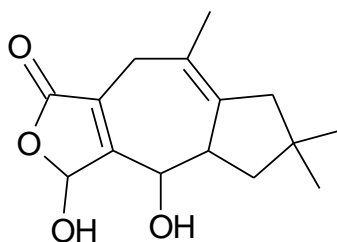
V sedmdesátých letech se podařilo v Itálii izolovat nové seskviterpenické laktony **blennin A**, **blennin B** a **blennin C** z plodnic *Lactarius blennius*. Sloučeniny byly charakterizovány podle jejich IČ, UV, NMR a hmotnostních spekter.¹⁸

Zajímavou skutečností je, že vzorec XVIII je shodný se vzorcem L, neboť blennin C byl izolován nejen z *Lactarius blennius* ale také z *Russula delica*, tedy taxonů patřících ke stejné čeledi Russulaceae.



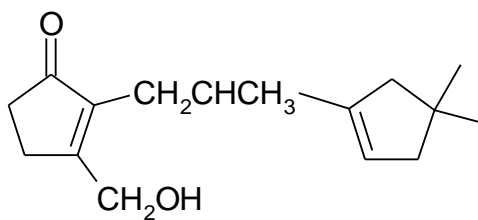
Blennin A

Vzorec XVI



Blennin B

Vzorec XVII

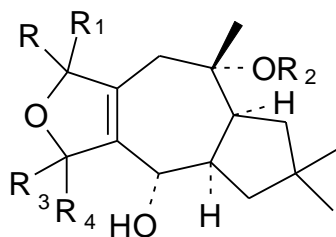


Blennin C

Vzorec XVIII

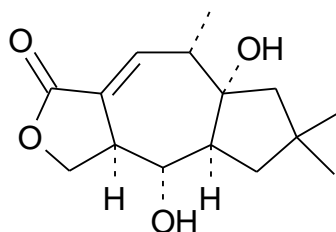
O pár let později izoloval tentýž tým vědců další seskviterpenické hydroxylaktony (vzorec XIX: $RR_1 = O$, $R_2, R_3 = H$, $R_4 = OH$; $R = H$, $R_1 = OH$, $R_2 = H$, $R_3R_4 = O$) Zpracovávali

tentokrát kromě taxonu *Lactarius blennis* také *L. scrobiculatus*. Struktury byly detekovány pomocí chemických a spektrálních dat.¹⁹



Vzorec XIX

A v roce 1980 zveřejnil tento tým, ještě objev a izolaci struktury **blenninu D**.²⁰



Blennin D

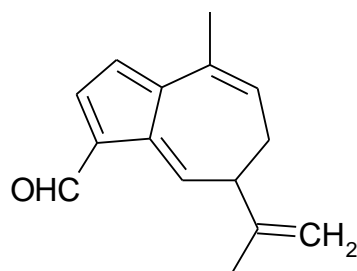
Vzorec XX

2.9.4.2. *Lactarius deterrimus* GRÖGER

Ryzec smrkový

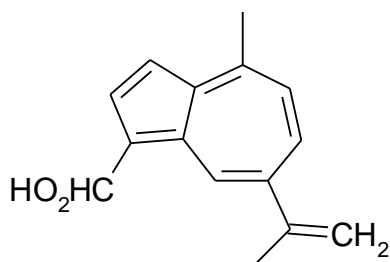
Z tohoto druhu byl izolován 1-formyl-4-methyl-7-iso-propyl azulen (11,12-dihydrolactaroviolin) spolu s D-mannitolem, palmitovou a stearovou kyselinou.²¹

Výzkum, provedený s nepoškozenými plodnicemi hub *L. deterrimus* a *L. deliciosus* zabývající se přezkoumáním obsahu seskviterpenů, objevil v obou druzích obsah pouze jednoduchých seskviterpenů, jako esterů dvou mastných kyselin. Pokud se však plodnice poškodily (např. krájením), estery během pár minut konvertovaly na pět volných seskviterpenů. Tři z těchto byly již dříve izolovány z *L. deliciosus*, zatím co zbylé dvě sloučeniny **delicial** (vzorec XY) a **deterrol** (vzorec XY) byly objeveny jako nové a jejich struktura objasněna spektrálními a chemickými metodami. Konverze seskviterpenů v poškozených plodnicích se zdá být enzymatická a možnost, že seskviterpeny by byly součástí chemického obranného systému těchto ryzců je předmětem dalšího zkoumání.²²



Delicial

Vzorec XXI



Deterrol

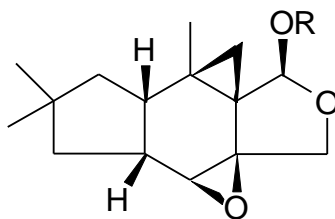
Vzorec XXII

2.9.4.3. *Lactarius vellereus* (FR.) FR.

Ryzec plstnatý

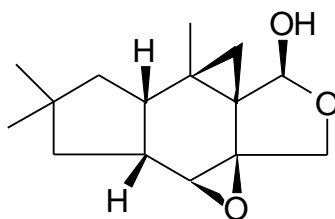
Ostře chutnající substance byly nalezeny v houbách *Lactarius piperatus* a *L. vellereus*. Bylo zjištěno, že ostrá chuť vymizí při vaření či sušení hub. Ve šťávě z hub se docílí vymizení ostré chuti mixováním s vodou a vystavením této směsi účinku vzduchu. Bez ztráty této ostré chuti mohou být houby konzervovány uchováním v alkoholu. Z benzenových extraktů lisované šťávy byly izolovány dvě ostře chutnající látky **velleral** a **isovelleral**.²³

Ze dvou taxonů rodu *Lactarius*, *L. vellereus* a *L. necator*, byly izolovány **velutinalové estery I** (R = stearyl) a **II** (R = 6-ketostearyl). Jejich struktury byly stanoveny pomocí spektrálních dat.²⁴



Velutinalové estery I, II

Vzorec XXIII

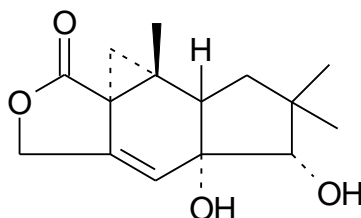


Velutinal

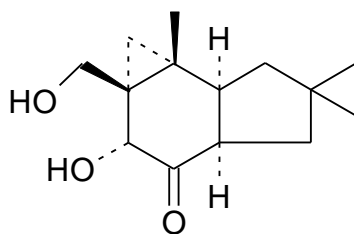
Vzorec XXIV

Ze studie publikované v roce 1985 je patrné, co se děje se základními obsahovými látkami po poranění houby. *L. vellereus* obsahuje tedy jednoduchý seskviterpen velutinal jako jeho ester s kyselinou stearovou. Dojde-li k poškození plodnice, stearoylvelutinal se rychle přemění na toxický **isovelleral** a **velleral**, ty se pozvolně redukují na méně toxické sloučeniny. Tyto sloučeniny představují chemický obranný systém.²⁵

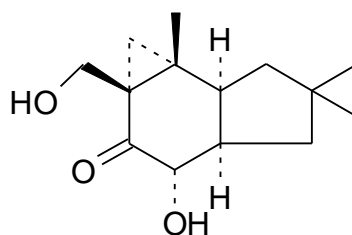
Ethanolové extrakty *L. vellereus* ve studii z roku 1988 obsahovaly kromě již známých seskviterpenů jeden vysoce se oxidující marasmanový lakton (vzorec XXV) a nové dva 13-normarasmanové seskviterpeny (vzorec XXVI, XXVII), které jsou prvními zástupci takovéto třídy sloučenin. Molekulární konfigurace a konformace byly stanoveny spektroskopickými metodami.²⁶



Vzorec XXV

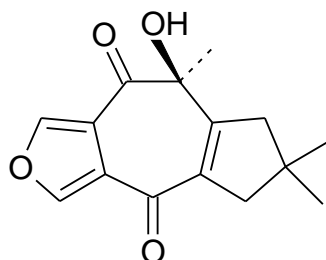


Vzorec XXVI

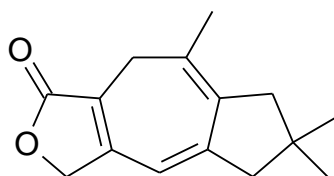


Vzorec XXVII

V roce 1991 přibyly k dosud známým sloučeninám obsaženým v *L. vellereus* nový monohydroxy-di-oxo-furan a nový lakton. Jejich struktury v ethanolovém extraktu z *L. vellereus* byly identifikovány pomocí spektroskopie jako 5,13-epoxy-3 β -hydroxy-lactara-2(9),5,7,(13)-trien-4,8=dion (vzorec XXVIII) a 13-hydroxy-lactara-2,6,8-trien-5-ová kyselina γ lakton (vzorec XXIX).²⁷

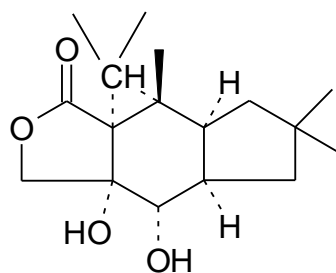


Vzorec XXVIII

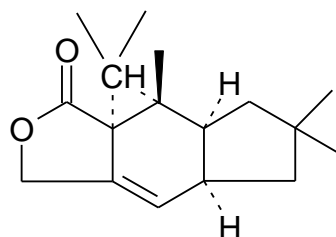


Vzorec XXIX

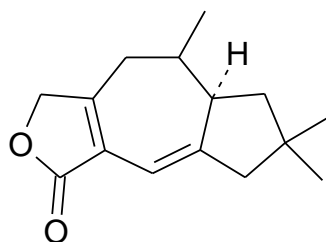
V dalším zkoumání poskytl ethanolový extrakt *L. vellereus* ještě 7 α , 8 α , 13-trihydroxy-marasman-5-ovou kyselinu γ -lakton (vzorec XXX), 13-hydroxy-marasman-7(8)-en-5-ovou kyselinu γ -lakton (vzorec XXXI)²⁸ a 5-hydroxy-lactara-6,8-dien-13-ovou kyselinu γ -lakton (vzorec XXXII).²⁹



Vzorec XXX

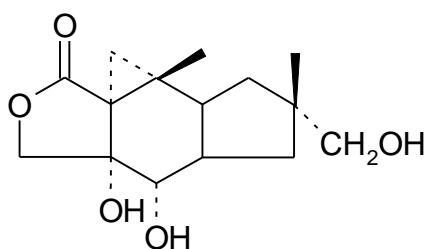


Vzorec XXXI

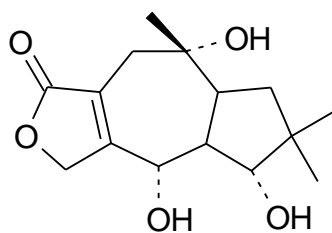


Vzorec XXXII

V roce 1994 byly izolovány dva nové seskviterpeny 7 α , 8 α , 13, 14-terahydroxy-marasman-5-ová kyselina γ -lakton (vzorec XXXIII) a 10 β -hydroxy-lactarorufin A stejně jako známý dipeptid cyklo-L-prolyl-L-leucyl pomocí několikanásobné chromatografie z ethanolových extraktů *Lactarius vellereus*.³⁰



Vzorec XXXIII



10 β -hydroxy-lactarorufin A

Vzorec XXXIV

2.9.5. Rod *Russula*, (Holubinka)

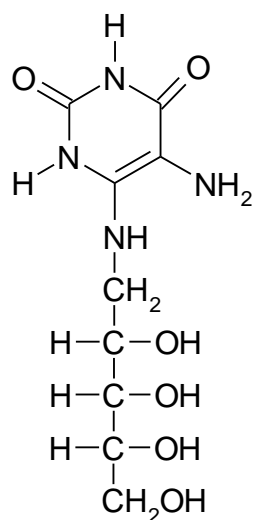
Čeleď: Russulaceae (Holubinkovité)

Některé druhy jsou spojovány s gastrointestinální nevolností, nicméně syndrom intoxikace není dosud dostatečně popsán. Příčinou nežádoucích účinků jsou pravděpodobně seskviterpeny podobně jako v rodu *Lactarius*. Mezi druhy způsobující nevolnost, zvracení a průjem lze přiřadit mj. druhy *Russula coerulea* a *Russula olivacea*.⁸

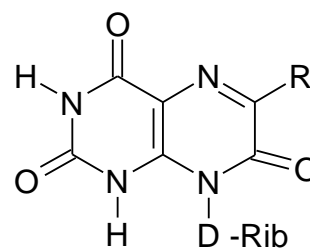
2.9.5.1. Izolace a struktura pteridinů z *Russula* sp.

Rozsáhlé chromatografické separace a chemické a spektroskopické výzkumy vedly k izolaci a identifikaci několika, ve vodě rozpustných, pteridinů z *Russula* sp., které jsou nazývány **russuapteridiny**, jmenovitě: 1-(5-amino-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl)amino-1-deoxy-D-ribitol (**1**; **pro-lumazin**, první identifikovaný v basidiomycetách); 1-deoxy-1-(6-methyl-2,4,7-trioxo-1,2,3,4,7,8-hexahydro-pteridin-8-yl)-D-ribitol (**3**) a 1-deoxy-1-(2,4,7-trioxo-1,2,3,4,7,8-hexahydropteridin-8-yl)-D-ribitol (**4**); obě posledně jmenované sloučeniny byly poprvé nalezeny ve vyšších houbách; patří ke sloučeninám s nejsilnější fialovo-modrou fluorescencí v *Russula* sp.; **riboflavin** (**6**; je znám jako důležité žluté barvivo v mnoha *Russula* sp.; **russuapteridin-žlutý I** (= 1-(6-amino-7-(*N*-formylimono)-2,4-dioxo-1,2,3,4,7,8-hexahydropteridin-8-yl)-1-deoxy-D-ribitol (**5**); je sloučenina s velice silnou fluorescencí, první derivát nového 6,7-diamino-lumazinu); **russuapteridin-žlutý IV** (= 1-deoxy-1-(2,6,8-trioxo-2,4,5,6,7,8-hexahydro-1*H*-imidazolo[4,5-*g*]pteridin-4-yl)-D-ribitol (**7**)). Dále byly izolovány a určeny dva další žluté russuapteridiny (žlutý II a žlutý V) s velmi silnou fluorescencí.³¹

Podle údajů z tabulky, přiložené k tomuto odbornému článku, činí obsah riboflavinu v *Russula coerulea* 2,9% hmotnosti usušené houby. (Výzkum z roku 1973).³¹



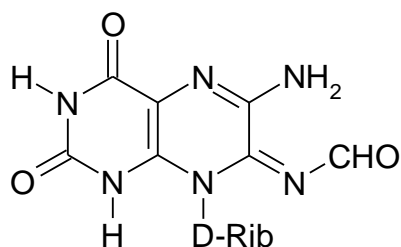
(1)



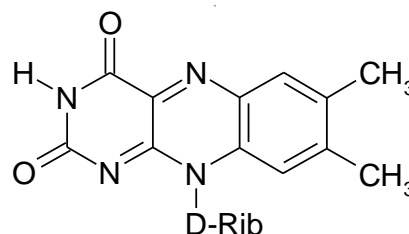
R = CH₃ (3)

R = H (4)

Vzorec XXXV, XXXVI, XXXVII

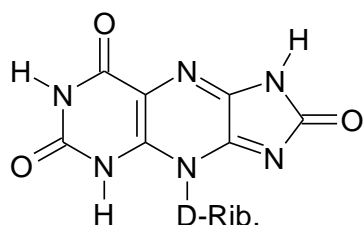


(5)

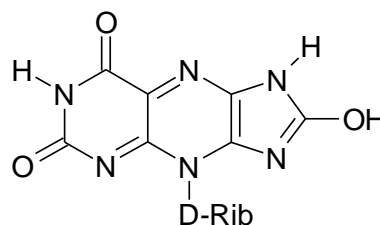


(6)

Vzorec XXXVIII, XXXIX



(7)



(7a)

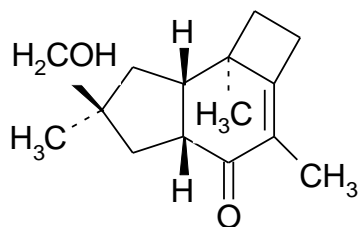
Vzorec XXXX

2.9.5.2. *Russula delica* FR. EMEND. BRES.

Holubinka bílá

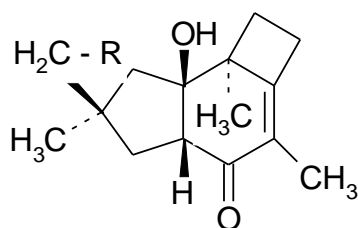
Je to symbiotická houba, jejíž mycélia se často nachází na kořenech stromů. Kultura obsahující její mycélia ukazuje, že je to houba produkující fytohormony včetně zeatinu, isopentenyladeninu, IAA, abscisové kyseliny gibberelinu GA3 a kinetinu.. Tyto fytohormony mohou mít vliv na růst stromů.³²

Podrobnější studie zaměřená na obsahové látky taxonu *Raussia delica*, byla prováděná ve Švédsku na katedře organické chemie univerzity v Lundu. V roce 1997 publikovali objev tří nových protoilludanových seskviterpenů. Byly izolovány z poškozených plodnic a podle všeho vznikají ze stearylplorantinonu B (vzorec XXXXI, R = stearyl), který byl izolován z nepoškozené plodnice. Jedná se o **plorantinony A, B** (vzorec XXXXII, R = H) a **C**.³³

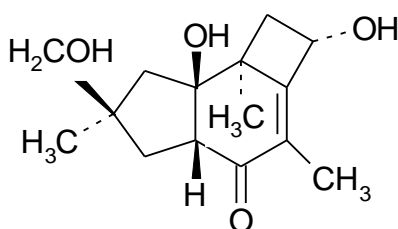


Plorantinon A

Vzorec XXXXI



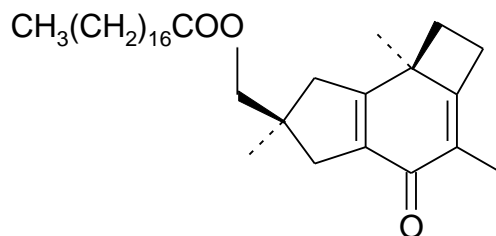
Vzorec XXXXII



Plorantinon C

Vzorec XXXXIII

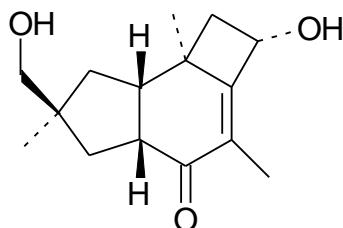
Tentýž rok objevili na této katedře další obsahovou látku nepoškozené plodnice *Russula delica*. A sice **stearoyldelicon**, neobvyklý, nestabilní a reaktivní bicyklo[4.2.0]octa-1,4-dien-3-on.³⁴



Stearoyldelicon

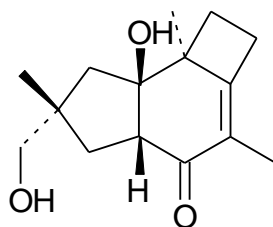
Vzorec XXXXIV

O rok později se zde podařil další objev. V poškozených plodnicích *Russula delica* se mění estery kyseliny stearové na sérii volných seskviterpenů, byly izolovány čtyři nové sloučeniny **plorantinon D**, **epiplorantinon B**, **deliquinon** a **2,9-epoxydeliquinon** obsažené jak v ethylesterových extraktech tak v dichlormethanových extraktech.³⁵



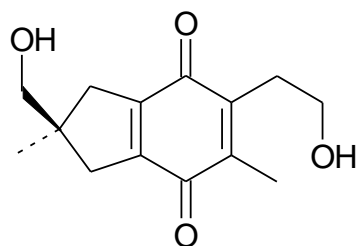
Plorantinon D

Vzorec XXXXV



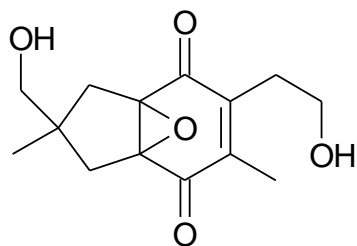
Epiplorantinon B

Vzorec XXXXVI



Deliquinon

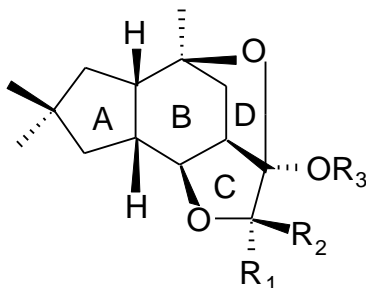
Vzorec XXXXVII



2,9-epoxydeliquinon

Vzorec XXXXVIII

Společně se třemi již známými seskviterpeny, izolovanými z plodnice *Russula delica* a identifikovanými jako **blennin C**, **lactarolid A** a **furandiol**, byl v roce 2003 v Japonsku popsán a izolován nový norseskviterpen **russulanorol**. Struktura russulanorolu byla objasněna na základě spektrálních dat a chemických transformací. Jedná se o racemickou směs dvou stereoizomerů (a, b) na acetalovém uhlíku C-11. Sloučenina byla izolována jako amorfní prášek.³⁶

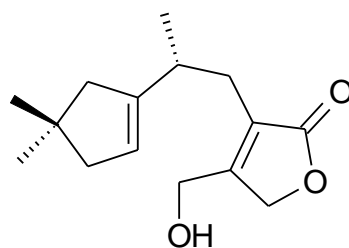


a: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$

b: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$

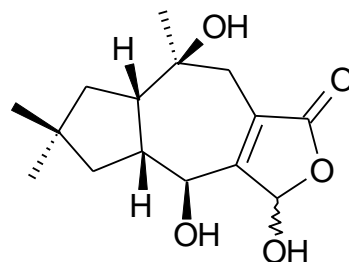
Russulanorol

Vzorec XXXXIX



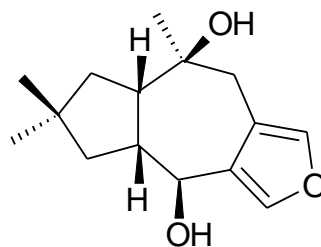
Blennin C

Vzorec L



Lactarolid A

Vzorec LI



Furandiol

Vzorec LII

Na tuto studii navazují v Japonsku v roce 2004 izolací a identifikací pěti seskviterpenoidů z plodnic *Russula delica*: **isolactarorufin**, **lactarorufin A**, **lactarorufin B**, **14-hydroxylactarolid A** a **3-O-methylactarolid B**.³⁷

2.9.6. *Hydnum repandum* L.

Lišák zprohýbaný

Čeleď: Hydnaceae (Lišákovité)

Hydnum repandum obsahuje 31-norcyklolaudenol a β -sitosterol. Hojně se vyskytující látkou v acetonových a methanolových extraktech byl mannitol.³⁸

Kromě potenciální cytotoxické aktivity (viz kap. 3.6.) vykazuje *Hydnum repandum* také trypsin inhibující aktivitu. Ta byla měřena a stanovena u 55 běžných a jedlých hub a pohybovala se mezi 0,36 a 10,42 TIU/mg suché hmotnosti. Inhibiční aktivita takto naměřená

byla vyšší než ta, kterou naměřili u obilovin, ale nižší než hodnoty naměřené pro některé rostliny z čeledi Fabaceae.³⁹

2.9.7. *Hypholoma sublateritium* (FR.) QUÉL.

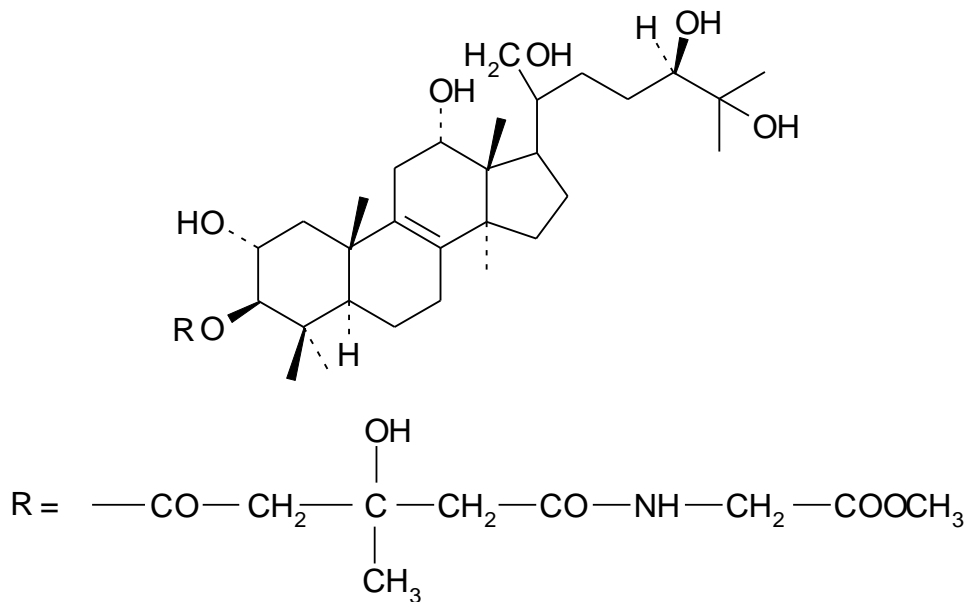
Třepenitka cihlová

Čeleď: Strophariaceae (Límcovkovité)

Chemické zpracování třepenitky svazčité a třepenitky cihlové, obou hořkých druhů, poskytuje řadu triterpenů tzv. fascikuloly. Přičemž **fasciculol E** a **fasciculol F**, injekčně vpravené myši do dutiny břišní, způsobí otravu a smrt zvířete. Vedle toho byly z kultur více druhů rodu *Hypholoma* izolovány cytotoxiny **naematolin**, je hořký, a **naematolon**. Jedlá a ne hořká *H. capnoides* neobsahuje žádné fascikuloly.¹¹

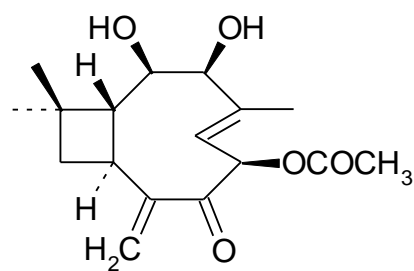
Intoxikace jedovatým druhem *H. fasciculare* se projevuje zvracením, postupnou paralýzou končetin a poruchami vidění. Popisovány jsou také bolesti břicha, průjem, poškození ledvin a jater bez bližší specifikace. Jako toxické metabolity byly identifikovány výše zmíněné fascikuloly a oba cytotoxiny.⁸

Naematolin a naematolon mají jen velmi malou antimikrobní aktivitu.⁴⁰



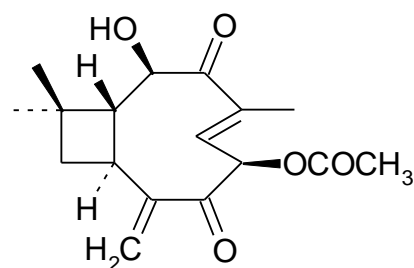
Fasciculol E

Vzorec LIII



Naematolin

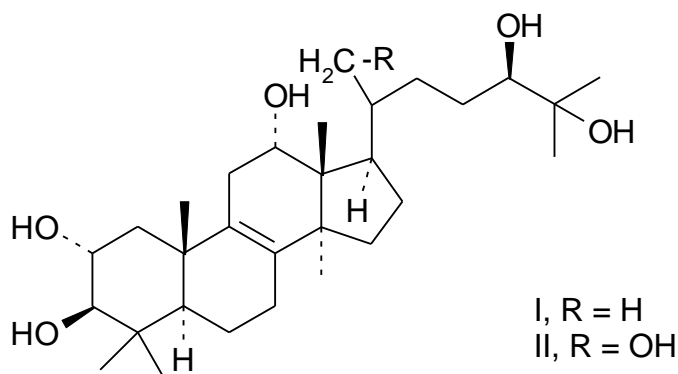
Vzorec LIV



Naematolon

Vzorec LV

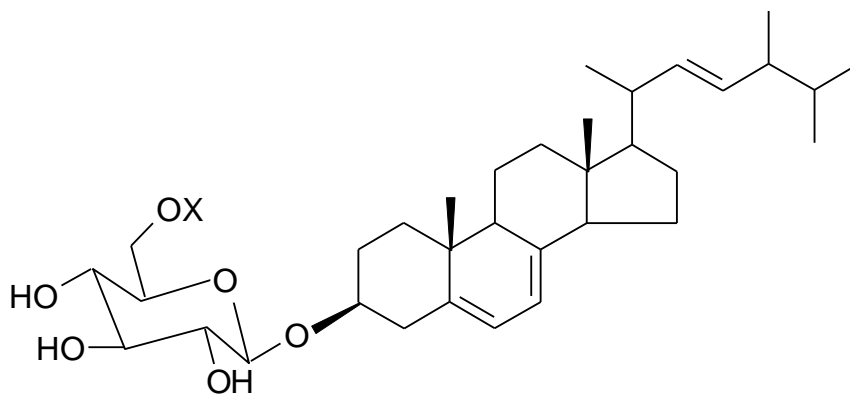
Fasciculol B (I), fasciculol C (II) a jejich depsipeptidy byly identifikovány v plodnicích *Naematoloma sublateritium* (syn. *Hypholoma*) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).⁴¹



Vzorec LVI

Titulní sloučenina (vzorec LVII, X = řetězec obsahující 2 a více CH₂ skupin) byla patentována v Japonsku. Její využití spočívá v prevenci a léčbě nemocí způsobených abnormálním rozkladem kyseliny hyaluronové (př. periodontitis neboli zánět ozubice, suchá pokožka, hrubá pokožka). Tato látka je obsažena v methanolových extraktech *Naematoloma*

sublateritium. Extrakty projevují 100% inhibici rozkladu kyseliny hyaluronové z lidských fibroblastů indukovaného histaminem. Na základě těchto poznatků již byly formulovány tablety, kapsle, krém, lotio, zubní pasta atd. obsahující patentované sloučeniny.⁴²

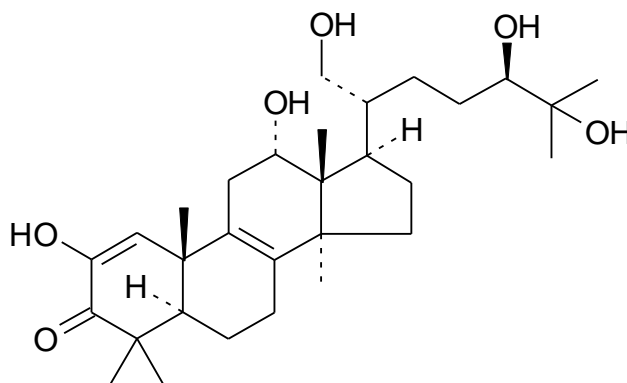


Vzorec LVII

Pozn. : Kyselina hyaluronová je druh mukopolysacharidu, který je důležitou součástí základní hmoty pojiva.

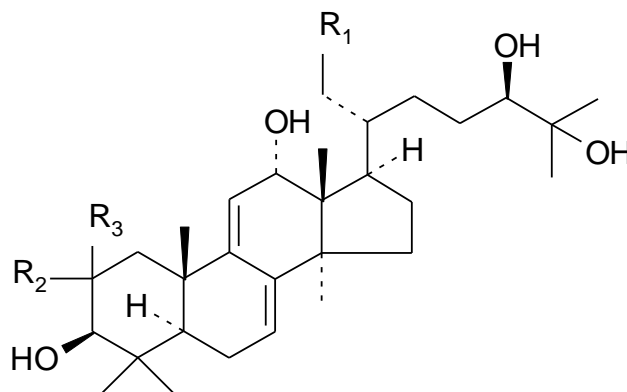
Dojde-li k rozštěpení k. hyaluronové enzymem hyaluronidázou, pojivo se naruší, čímž vzniká možnost šíření infekce ve tkáni.⁴³

Tři nové triterpenoidy **sublateriol A**, **B** (vzorec LIX: $R_1 = OH$, $R_2R_3 = O$, $\Delta 8$) a **C** (vzorec LIX: $R_1 = OH$, $R_2 = \alpha-OH$, $R_3 = \beta-H$, $\Delta 7,9(11)$) byly izolovány v Japonsku v roce 2001 z houby *Naematoloma sublateritium*. Jejich struktura byla objasněna na základě chemických spekter.⁴⁴



Sublateriol A

Vzorec LVIII



Vzorec LIX

2.9.8. *Sarcodon imbricatus* (L. ex Fr.) P. Karst.

Lošák jelení

Čeľad': Telephoraceae (Plesňákovité)

Fytochemická studie týkající se obsahových látek v extraktu z tohoto taxonu byla provedena pomocí tenkovrstvé chromatografie. Potvrdila se přítomnost ergosterolu a fungisterolu. Dále papírová a tenkovrstvá chromatografie prozradila výskyt tryptofanu, aminů, mannitolu, inositolu, polysacharidů a purinů (guanin, kyselina močová).⁴⁵

Koncentrace ¹³⁴Cs a ¹³⁷Cs v plodnicích 98 taxonů divoce rostoucích hub ze 73 různých lokalit na Ukrajině byly studovány gama-spektrometrickou metodou v letech 1993, 1996, 1998 a 1999. Obsah radiocesia v houbách byl různý. Existovaly mezidruhové rozdíly v obsahu akumulovaného radiocesia ve stejných lokalitách. Maximální hladina ¹³⁷Cs 17 117 000 Bq/kg suché hmotnosti byla nalezena ve vzorcích z oblasti Černobylu v roce 1993. Srovnání obdržných dat s předešlými údaji ukázalo, že nejvyšší hladiny radiocesia byly v mycosymbiotrofech (př. taxony čeledi Russulaceae, Boletaceae, Cortinariaceae, Paxillaceae). Koeficient akumulace zůstal u některých druhů vysoký i v roce 1999, *Sarcodon imbricatus* měl tuto hodnotu na 238.⁴⁶

Proto by mohly být houby považovány za hyperakumulátory rozkladných produktů radioaktivního štěpení a využívány k dlouhodobému radioekologickému monitorování kontaminovaných oblastí jako je oblast Černobylu po havárii v roce 1986.⁴⁶

3. Biologická aktivita zkoumaných druhů hub

3.1. Úvod

Chtěla bych zde uvést výsledky dvou na sobě nezávislých výzkumů, uskutečněných na různých vědeckých pracovištích. Výzkum z roku 2002 je aktuálnější, zabývá se širším spektrem účinku houbových extraktů a jsou použity zejména metody TLC. To však neubírá na důležitosti a serióznosti vědeckého bádání provedeného v letech 1978 – 1982 v tehdejším Československu.

3.2. Screening

V roce 2002 byl proveden ve švýcarském Institutu farmakognozie a fytochemie, na Univerzitě Lausanne, screening 57 evropských hub. Vybrané druhy byly testovány na baktericidní (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*), fungicidní (*Candida albicans*, *Cladosporium cucumerinum*), larvicidní (*Aedes aegypti*) aktivitu a dále na aktivitu proti měkkýšům (*Biomphalaria glabrata*), antioxidační a antiradikálovou. Druhy *Russula delica*, *Russula olivacea*, *Sarcodon imbricatus*, jimiž se zabývá má diplomová práce, byly rovněž zahrnuty do tohoto screeningu. Proto zde zmíním průběh a výsledky testování těchto tří taxonů.⁴⁷

3.2.1. Materiál

Zralé houby byly sbírány ve Švýcarsku od roku 1992 do roku 1995. Byly připraveny dichlormethanové a methanolové houbové extrakty.⁴⁷

3.2.2. Antibakteriální aktivita

Bacillus subtilis je G + bakterie, která není patogenní pro člověka. *E. coli* je G – , oportunní bakterie osidlující tenké střevo a je zodpovědná za mnoho močových infekcí. Antibakteriální aktivita každého extraktu byla stanovena na glass-backed silikagelu GF₂₅₄ pomocí tenkovrstvé chromatografie. Na desku bylo nanášeno 20 µg extraktu. Pro dichlormethanolové extrakty byla použita směs rozpouštědel petrolether : ethylacetát 1 : 1 a pro methanolové extrakty směs chloroform : methanol : voda 65 : 35 : 5. Jako pozitivní kontrola byl použit Chloramphenicol, širokospektré antibiotikum, (0,01 µg pro *B. subtilis* a 0,1 µg pro *E. coli*).⁴⁷

3.2.3. Fungicidní aktivita

Byly vybrány *Candida albicans*, jako lidský patogen, a fytopatogenní *Cladosporium cucumerinum*. Testování bylo rovněž prováděno pomocí TLC. Test s *C. albicans* byl účinný na glass-backed silikagelu a test s *C.cucumerinum* na aluminium-based silikagelu GF₂₅₄. Nanášeno bylo 100 µg extraktů v obou případech a použito stejné směsi rozpouštědel jako u antimikrobiální aktivity.⁴⁷

3.2.4. Larvicidní a molluscicidní aktivita

Komáři druhu *Aedes* přenáší arbovirus. Larvy komára *Aedes aegypti* byly testovány s extrakty se zvyšující se koncentrací. Počáteční koncentrace byla 500 µg/ml postupně se zvyšovala až do doby, kdy byly usmrceny všechny larvy.

Vodní plž *Biomphalaria glabrata* je zapojen do životního cyklu schistosomóz. Plž byl testován s extrakty od 400 µg/ml. Extrakty byly považovány za účinné, jestliže zabily 100% jedinců.⁴⁷

3.2.5. Antioxidační a antiradikálová aktivita

Lipidová peroxidace nebo poškození DNA jsou příklady oxidačního stresu související s aterosklerózou či rakovinou. Antioxidanty mohou těmto poškozením předcházet. Sloučeniny, které reagovaly pozitivně v antioxidačním a antiradikálovém testu jsou do budoucna nadějně.

Antioxidační a antiradikálové testy byly provedeny pomocí tenkovrstvé chromatografie na aluminium-backed silikagelu. Systém rozpouštědel byl použit stejný jako u antimikrobiální aktivity.

Diluční testy: Jako referenční látky byly vybrány Quercetin a 2,6 –di-*tert*-butyl-*p*-cresol. Základní roztoky byly připraveny ředěním geometrickou řadou: Objem 50 µg methanového roztoku 1,1-difenyl-2-picrylhydrazylu (DPPH = stabilní radikál) o koncentraci 0,22 mg/ml byl přidán k 225 µg methanolu v každé jamce z 96 jamek mikroděsky. Absorbance (A_0) byly měřena při 517 nm. Pak se přidal testovaný roztok (5 µg) a absorbance (A) změřena po 30 minutách. Aktivita roztoku je vyjádřena takto⁴⁷:

$$\text{Aktivita\%} = 100 - 100 A/A_0$$

3.2.6. Výsledky

Russula delica: dichlormethanový extrakt vykazoval atibakteriální aktivitu na *Bacillus subtilis* a molluscicidní aktivitu na *Biomphalaria glabrata*. Methanolvý extrakt neměl žádnou aktivitu

Russula olivacea: dichlormethanový extrakt vykazoval antibakteriální aktivitu na *Bacillus subtilis* i na *E. coli* a rovněž molluscicidní aktivitu na *Biomphalaria glabrata*. Methanolvý extrakt nebyl zaznamenán.

Sarcodon imbricatus: dichlormethanový extrakt vykazoval antibakteriální aktivitu na *Bacillus subtilis* i na *E. coli* a měl zároveň aktivitu antioxidační a antiradikálovou, obě srovnatelné s referenční látkou. Methanolvý extrakt neměl žádnou aktivitu.⁴⁷

3.3. **Ověřování antibiotické aktivity kultur bazidiomycetů**

V oddělení experimentální mykologie Mikrobiologického ústavu ČSAV, vedeném RNDr. V. Musílkem, CSc., se zabývali studiem některých biologicky aktivních kultur makromycetů. Byla vybudována sbírka kultur bazidiomycetů, z nichž většina byla izolována explantátovou metodou z čerstvých plodnic sbíraných v Čechách, na Moravě a na Slovensku. Celkem bylo během let 1978 – 1982 prověřeno 338 různých kmenů kultur bazidiomycetů, zahrnujících 195 druhů. Z tohoto souboru vykazovalo 101 druhů, tj. 51,7%, antibiotickou aktivitu. Uvedu zde pouze výsledek s údaji pro druh *Hypholoma sublateritium*, neboť ostatní druhy z mé práce do výzkumu zahrnuté nebyly.¹

3.3.1. Metodika testování

Jednotlivé kultury byly vždy nejméně ve dvou baňkách pěstovány za stejných podmínek, tj. na rotačním třepacím stroji v tekutém živném prostředí (sladince, popř. jiných kultivačních mediích) a po 14, 21, 28 dnech kultivace při 24 °C testovány na antibiotickou aktivitu. Jako reprezentant G+ bakterií byl používán *Bacillus subtilis*, G- bakterií *E. coli* a hub *Candida pseudotropicalis*. Vzorky kultivačního filtrátu s myceliem byly prověřovány na antibiotickou aktivitu metodou biologické titrace, tj. plotnovým difúzním testem. Testováno bylo množství 0,1 ml filtrátu. Současně byla stanovována suchá hmotnost vzorků mycelia, vyjádřená v mg/ml, dokumentující růst kultury. Otvory, do nichž byly kapány vzorky, měly průměr 8 mm. Antibiotická účinnost vzorků byla hodnocena průměrem inhibičních zón (mm).¹

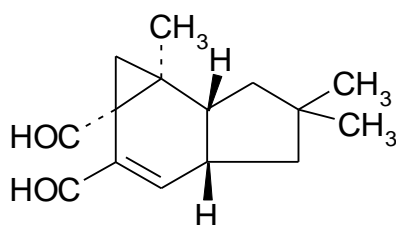
3.3.2. Výsledky

Hypholoma sublateritium: průměr inhibiční zóny u *Bacillus subtilis* činil 10 – 17 mm, u *E. coli* 11 mm a u *Candida pseudotropicalis* 11 – 22 mm. Suchá hmotnost vzorku mycelia byla 7,1 mg/ml.¹

3.4. Houby potenciálně karcinogenní a mutagenní

Stejně jako mnohé další přírodní složky potravy obsahují i houby potenciálně karcinogenní a mutagenní látky. Některé byly testovány na zvířatech a mikroorganismech a jejich aktivita byla potvrzena, nicméně je třeba si uvědomit, že pozitivní Amesův test ještě nemusí tradiční konzumní houby nezbytně řadit mezi karcinogeny. K pozitivně testovaným patří mj. také *Lactarius vellereus*. Tento taxon obsahuje dva seskviterpenové dialdehydy, **velleral** a **isovelleral**. Druhý z nich je prokazatelně mutagen.⁸

Dokazuje to studie prováděná ve Švédsku. Testovali zde 48 taxonů, aby ověřili jejich potenciální mutagenní aktivitu. 37 hub projevilo v *Salmonella*/microsomální zkoušce s TA98, TA2637 a TA100 významnou avšak u většiny z nich slabou mutagenní aktivitu. Signifikantní mutagenní aktivita byla nalezena zejména u metabolitu isovelleralu pocházejícího z *Lactarius vellereus*.⁴⁸



Isovelleral

Vzorec LX

3.5. Houby způsobující alergickou odezvu

Hypersenzitivní reakce na houby jsou všeobecně známé rizikové stavy. Člověk je běžně exponován vůči více než 100 houbovým druhům kontaminujícím vzduch. Jejich počet často mnohonásobně překračuje počty pylových zrn. Je zjištěno, že většina vzorků lidského séra obsahuje IgG vůči některým druhům hub a specifické IgE byly detekovány v séru mnoha atopických pacientů. Epidemiologické studie prozrazují, že existuje vztah mezi zvýšenou

koncentrací bazidiospor v ovzduší a zvýšeným výskytem akutní astmatické reakce. Je samozřejmé, že výskyt spor ve vzduchu není konstantní, ale mění se kvalitativně i kvantitativně v závislosti na ročním i denním období a na fyzikálních podmínkách prostředí, ve kterém se vyskytují. Houbové alergeny jsou komplexní částice. Imunoelektroforetický záznam vykazuje při imunizaci pokusného zvířete extraktem jednoho houbového druhu vysoký počet imunoprecipitátů. Na druhé straně se mohou vyskytovat specifické antigeny pro různé části jednoho houbového organismu (výtrusy, mycelium). Je to tedy velmi náročné až nemožné získat úplný antigenní produkt pro testování nebo desenzibilizaci.⁸

Alergeny, vlastní původci hypersenzitivní reakce, jsou chemicky identifikovatelné jen výjimečně. Alergeny rodu *Pleurotus* (který je v této práci zastoupen druhem *Panus conchatus*) představují skupinu 27 antigenů s molekulovou hmotností mezi 10500 až 25000 Da.⁸

Vážným projevem zvýšené reaktivity vůči houbovým antigenům je plicní hypersenzitivita (alergická alveolitida), která je obecně rozšířená po celém světě a postihuje především pracovníky zpracovávající houbové plodnice (mushroom worker's lung). Onemocnění je charakterizováno řadou respiračních symptomů, celkovou únavou, zvracením, bolestmi hlavy, horečkami, ztrátou hmotnosti, svalovými a kloubovými bolestmi.⁸

Příčinu alergických respiračních a kožních reakcí lze hledat mezi četnými druhy různých rodů hub. Má práce obsahuje takové rody dva. Rod *Hypholoma* spp.⁸, zastoupený druhem *Hypholoma sublateritium*, a rod *Pleurotus* spp.⁸, zastoupený druhem *Panus conchatus*.

3.6. Houby s účinky cytostatickými

V USA byla do roku 1966 prověřena protinádorová aktivita 7000 vzorků kultur kloboukatých hub, a to proti třem typům nádorů hlodavců (sarkomu 180, adenokarcinomu 755 a leukémii L1210). Výsledky průzkumu ukázaly, že 50 druhů náležejících do 20 rodů produkovalo do fermentačního média po čtyřech týdnech kultivace látky s inhibičním účinkem proti výše uvedeným nádorům. Pozitivní výsledky vykazovali také zástupci rodu *Hydnum*.

Rozsáhlé průzkumy ukázaly, že není kvantitativní korelace mezi aktivitou frakcionovaných produktů z hub na zvířeti a stupněm cytotoxicity vybraných mikrobiálních systémů. Růst některých druhů hub byl sledován na 50 různých živných půdách za účelem získání optimálního submersního růstu kultur. O povaze látek s protinádorovou aktivitou z většiny uvedených hub dosud nejsou podrobnější znalosti.¹

Po letech se však přeci jen podařilo identifikovat v Japonsku povahu protinádorově působící látky z rodu *Hydnum*. Dokazuje to, jak je důležité, aby se vědci zabývali potenciálně aktivními substancemi.

Z druhu *Hydnum repandum* a *H. repandum* var. *album* byla izolována chemická sloučenina nazvaná **repandiol**. Je to nový cytotoxický diepoxid s chemickou strukturou objasněnou na základě spektroskopické analýzy jako (2R,3R,8R,9R)-4,6-dekadien-2,3:8,9-diepoxy-1,10-diol. Repandiol ukazuje potenciální cytotoxickou aktivitu proti různým nádorovým buňkám.⁴⁹

3.7. Houby vykazující antigenotoxickou a bio-antimutagenní aktivitu

Screening ,jehož výsledky byly zveřejněny v roce 2002 katedrou genetické toxikologie a nádorové biologie univerzity v Ljubljani, sledoval antigenotoxickou a bio-antimutagenní aktivitu extraktů (methanol/voda) 89 druhů stopkovýtusých hub. Na základě SOS/umu testu byla monitorována schopnost extraktů inhibovat UV zářením indukovanou expresi umuC genu v *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002. Sedmnáct extraktů projevilo schopnost inhibovat expresi umuC z více než 50 %. Tyto extrakty byly dále hodnoceny, a sice na schopnost inhibovat UV zářením indukovanou mutaci v *Escherichia coli* WP2. Jen pět extraktů zároveň inhibovalo i mutaci u *E. coli*. Extrakty z *Lactarius vellereus* a *Russula integra* patřily k těmto pěti. Čeleď Russulaceae se jevila zvláště zajímavá pro další výzkum.⁵⁰

Další výzkum na univerzitě v Ljubljani hodnotil nejprve řadu hub rostoucích ve Slovinsku. Kritériem byla jejich anti-genotoxická aktivita, nejvíce účinný byl taxon *Lactarius vellereus*. S tímto druhem pak provedli screening zaměřený na genotoxickou a anti-genotoxickou aktivitu methanolových extraktů za použití testu bakteriální reversní mutace se *Salmonella typhimurium* TA98 a testu savčích buněk s lidskými nádorovými buňkami jater (HepG2). Hodnocena byla míra poškození DNA. Extrakty nevyvolávaly žádné mutace v *S. typhimurium* TA98 a žádné poškození DNA v HepG2 buňkách. Proti nepřímo působícímu mutagenu 2-amino-3-methylimidazo(4,5-f)chinolinu (IQ) byla u extraktů zaznamenána významná na dávce závisící antimutagenní aktivita, zatímco proti přímému mutagenu 4-nitrochinolinoxidu (4-NOO) nepůsobily. Extrakty tedy projevily ochranný efekt proti IQ indukované genotoxicitě v savčích buňkách lidského původu. Pokud byly pohromadě HepG2 buňky, methanolový extrakt *L. vellereus* a IQ, byl genotoxický účinek posledně jmenovaného v závislosti na dávce redukován. Výzkum ukázal, že methanolové extrakty *Lactarius vellereus* mají vysoce protektivní účinek proti IQ indukovanému poškození DNA v savčích

buňkách. *L. vellereus* může být pokládán za přírodní zdroj antimutagenů s potenciálním farmakologickým uplatněním v prevenci rakoviny.⁵¹

4. Sekvenční injekční analýza

4.1. Volné radikály a antioxidanty

4.1.1. Volné radikály

Atom nebo molekula obsahující alespoň jeden orbital s jediným tedy nepárovým elektronem se nazývá volný radikál. Radikály mohou být neutrální částice nebo záporně či kladně nabitě ionty. To záleží na tom, zda počet protonů v atomových jádrech radikálu odpovídá počtu elektronů v orbitalech (neutralita) či nikoli (ion). Většina biomolekul nejsou radikály, neboť obsahují orbitály plně obsazené dvěma elektrony.⁶⁶

Bylo získáno mnoho dokladů o tom, že v organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku a reaktivních forem dusíku. Jen některé z reaktivních forem kyslíku a dusíku jsou volné radikály, tedy látky s nepárovým elektronem. Tyto látky mají značný fyziologický i patogenetický význam. Jde o látky, které pohotově reagují s různými biologickými strukturami, mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami a proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy (nukleovými kyselinami) i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však působí jako toxické látky a jako desinformační agenti, schopní organismus poškodit a dokonce i usmrtit.⁶⁶

V molekule některé (vazebné) orbitály tvoří chemické vazby mezi jednotlivými atomy. Volný radikál z těchto „ normálních ” molekul vzniká trojím způsobem: homolytickým štěpením kovalentní (dvouelektronové) chemické vazby, přičemž každý fragment získá jeden nepárový elektron, nebo přidáním jednoho elektronu k normální molekule, tj. redukcí, nebo naopak ztrátou jednoho elektronu, což je oxidace. K homolytickému štěpení je třeba hodně energie, př. vysoká teplota, ultrafialové nebo ionizační záření. V biologických systémech však volné radikály vznikají energeticky snadnějším způsobem jako je odejmutí či přijetí elektronu.⁶⁶

Volné radikály vznikají v našem organismu jako vedlejší produkt látkové výměny v buňkách. Jak už bylo řečeno, plní v organismu řadu důležitých fyziologických funkcí.⁶⁷

Jsou tedy zcela obecným metabolitem v každé buňce a každá buňka musí být vybavena prostředky, které ji před těmito reaktivními látkami chrání. ⁶⁶

Tvoří-li se však volné radikály z různých důvodů v nadměrném množství nebo nejsou-li dostatečně rychle likvidovány, stávají se pro svou reaktivitu nebezpečnými. Narušují buněčné membrány, ničí DNA a mohou být příčinou rozvoje závažných patologických projevů. Dochází tak k urychlení procesu degenerace a stárnutí buněk. Jestliže volné radikály oxidují DNA v buněčném jádru, vyvolávají v buňce mutace, které mohou být počátkem rakoviny, oxidace cholesterolových částic v krvi může způsobit ukládání tukových látek ve stěnách tepen, což může postupně vést k srdečnímu infarktu a mrtvici. Volné radikály se také pravděpodobně účastní vzniku katarakty (šedý zákal), imunodeficiencie, chorobných kloubních změn a předčasného stárnutí. ⁶⁷

K volným radikálům reaktivních forem kyslíku patří: superoxid ($O_2^{\bullet-}$), hydroxylový radikál (HO^{\bullet}), peroxy (ROO^{\bullet}), alkoxy (RO^{\bullet}), hydroperoxy (HO_2^{\bullet}). Volné radikály reaktivních forem dusíku jsou: oxid dusnatý (NO^{\bullet}), oxid dusičitý (NO_2^{\bullet}). ⁶⁶

Reaktivní formy kyslíku se účastní uvolňování a přeměny energie nezbytné pro životní pochody, jsou součástí enzymových mechanismů a některé z nich jsou významnými signálními molekulami v buněčném informačním systému. Škodí pouze tehdy, vymknou-li se přísné kontrole, kterou každý aerobní organismus získal v průběhu biologického systému. ⁶⁶

4.1.2. Antioxidační ochranný systém

Vzestup koncentrace kyslíku v zemské atmosféře způsobený před 2,5 miliardami let fotosyntetickou aktivitou sinic musel zavinit stres, který mohly přežít jen druhy, u nichž se vyvinuly mechanismy chránící je před vysoce reaktivním prvkem (a hlavně před jeho metabolity). Organismus používá tři možných typů ochrany. Nejbezpečnějším způsobem je bránit se tvorbě nadměrného množství reaktivních forem kyslíku a dusíku například regulací aktivity enzymů, které je tvoří, nebo vychytáváním tranzitních prvků z reaktivních pozic. Druhou možností je záchyt a odstranění radikálů, které se již vytvořily. V literatuře se tyto látky označují jako vychytávače či zametače (scavengers), lapače (trappers) a zhášecí (quenchers). Tyto pojmy nejsou založeny na chemickém principu, kterým ochranné látky působí, a tak je vymezení jejich obsahu problematické. Mnohem výstižnější je dělení

antioxidantů na enzymy a na látky dávající s reaktivními formami kyslíku a dusíku stálejší a tudíž méně toxické produkty. ⁶⁶

Pro tvorbu a funkci antioxidantních enzymů je zapotřebí dostatečné množství některých vitamínů, minerálů a stopových prvků a dalších látek s antioxidantními účinky, které systém podporují. Tělo si vytváří vlastní antioxidanty, ale vitamíny, minerály a sloučeniny známé jako fytochemické látky jich poskytují více. ⁶⁷

Na antioxidantní obraně se podílejí též obecné reparační mechanismy poškozených biomolekul. Fosfolipázy odstraňují poškozené mastné kyseliny z fosfolipidů, oxidačně modifikované proteiny se rozkládají proteolyticky a zvláštní reparační enzymy opravují poškozenou DNA. ⁶⁶

Antioxidanty jsou sloučeniny, které se podílejí na inaktivaci volných radikálů a jejich odstranění z buněk. Tím chrání jak samotné buňky, tak celý organismus. Jsou obsaženy v potravinách a stále častěji dostupné formou různých potravních doplňků. Jako antioxidanty působí některé vitamíny, které chrání tkáňové buňky před poškozením a navíc mohou být účinné v prevenci chorob. Také flavonoidy, fytochemické látky a karotenoidy, které snižují riziko onemocnění a mohou zmírnit příznaky některých nemocí, působí jako antioxidanty. ⁶⁷

Porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku a dusíku se nazývá oxidační stres. Může být vyvolán nadměrnou produkcí reaktivních forem kyslíku a dusíku, nedostatečnou funkcí antioxidantního ochranného systému nebo kombinací obou těchto nedostatků. ⁶⁶

4.1.3. Antioxidantní terapie

Ochrana organismu proti oxidačnímu poškození je systém, ve kterém antioxidanty a celá jejich seskupení vzájemně spolupracují. Funkce jednoho antioxidantu velmi často podmiňuje účinek jiného článku soustavy. Tato skutečnost je velice významná pro pochopení poruch antioxidantní ochrany a pro účelné preventivní a terapeutické zásahy. ⁶⁶

Oxidační stres, patologická nerovnováha vzniku reaktivních forem kyslíku a dusíku a jejich odstraňování je nedílnou součástí řady nemocí a u některých i primární příčinou chorobného stavu. U četných chorobných stavů dochází nejen k poklesu kapacity antioxidantních systémů, ale i ke zvýšené tvorbě radikálů. ⁶⁶

Velmi důležité je podávání antioxidantů jedincům oslabeným po nemoci, příp. starším nebo nezdravě a jednostranně se stravujícím lidem, jelikož jejich organismus produkuje těchto látek méně. Podávání antioxidantů má své opodstatnění i v případě obyvatel velkoměst, sportovců a osob náchylných k nádorovým onemocněním.⁶⁷

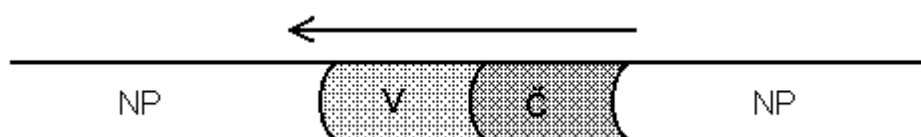
Mnoho experimentálních studií *in vitro* a *in vivo* prokazuje příznivý vliv antioxidantů v různých kombinacích a modelech. Na celém světě proběhlo a stále probíhá mnoho klinických studií s antioxidační terapií lidí. Jejich výsledky nejsou jednoznačné nejspíše proto, že oxidační stres je jen jedním z dějů probíhajících při těchto onemocněních. Úspěch antioxidační terapie závisí na stupni poznání úlohy volných kyslíkových radikálů v patogenezi dané nemoci.⁶⁶

4.2. Sekvenční injekční analýza

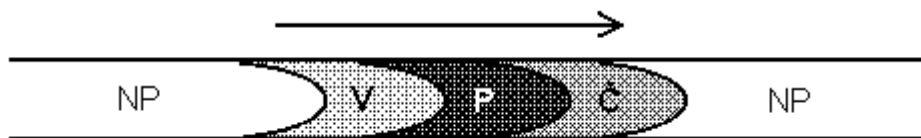
Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis, SIA) patří do skupiny průtokových analytických technik. Umožňuje racionalizovat a automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků instrumentálními metodami, čímž se podstatně zvyšuje produktivita zejména rutinních stanovení. Je to relativně nová a dále se rozvíjející metoda která nachází uplatnění v rozmanitých odvětvích analytické praxe.⁶⁸

4.2.1. Princip a vlastnosti metody SIA

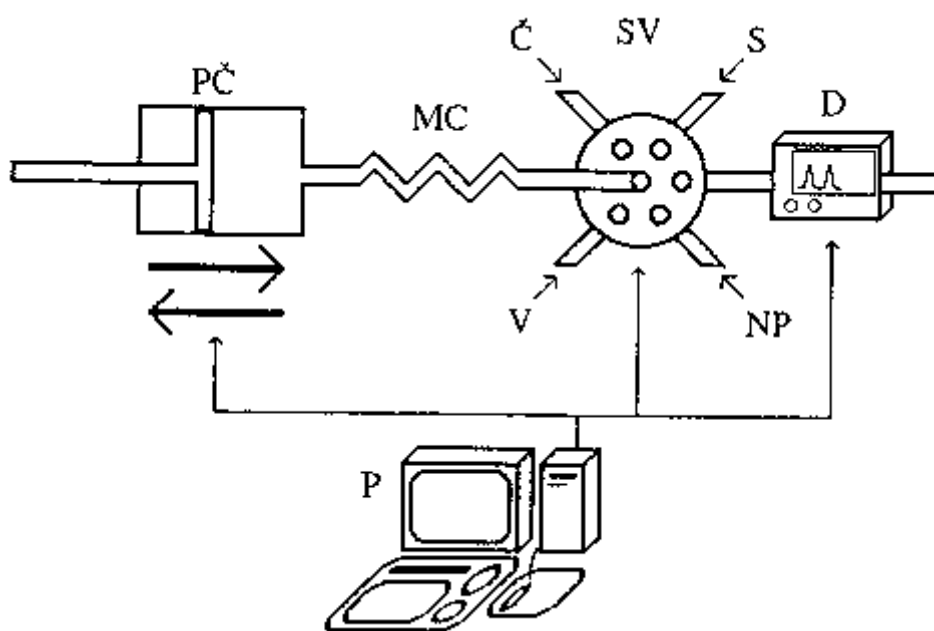
Analyt, který je obsažen v roztoku vzorku, je třeba převést reakcí s činidlem na detegovatelný (např. barevný) produkt. Měří se vhodná analytická vlastnost tohoto produktu (např. absorbance při určité vlnové délce). Technika SIA používá princip, jehož charakteristickým rysem jsou oddělené měřicí cykly. Nejprve dochází k postupnému (jednorázovému) nasátí zóny nosného média, vzorku a činidla do jednobanového systému za využití selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla (obr. 15). Následně je směr pohybu pístu čerpadla obrácen a dochází k promísení zóny vzorku a činidla (obr. 16), vzniklý produkt je dopraven do detektoru. Tímto se uzavírá jeden cyklus a výsledný analytický signál je získán ve formě píku. V podstatě se jedná o záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu jeho zóny detektorem.⁶⁸



Obr. 15: Dávkované zóny při zpětném směru toku (NP – nosný proud, V – vzorek, Č– činidlo)



Obr. 16: Vytlačování jednotlivých zón včetně vznikající zóny produktu do detektoru (NP – nosný proud, V – vzorek, P – produkt, Č – činidlo)



Obr. 17: Schéma běžné SIA sestavy (PČ – pístové čerpadlo, SV – selekční ventil, Č – činidlo, S – standard, V – vzorek, NP – nosný proud, MC – mísící cívka, D – detektor, P – počítač)

Konvenční uspořádání hlavních jednotek SIA systému (obr. 17) tvoří jednobanální dvousměrné pístové čerpadlo, vícecestný ventil, vhodný detektor, mísící cívka, která zároveň slouží jako pojistka proti vniknutí vzorku a činidel do čerpadla, a spojovací materiál (obvykle plastické hadičky s vnitřním průměrem 0,7 – 0,8 mm). Systém SIA v podstatě pracuje v cyklu naprogramovaných pohybů pístu čerpadla, synchronizovaných s přepínáním pozic selekčního ventilu. Přesná synchronizace a opakovatelnost těchto kroků je nutnou podmínkou k dosažení reprodukovatelné disperze jednotlivých zón v SIA systému a tím i k získání reprodukovatelného koncentračního gradientu reakčního produktu, resp. odpovědi detektoru. Nezbytnou součástí SIA systému musí proto být i vhodný mikroprocesor (nejlépe PC) s příslušným programovým vybavením, který zároveň řídí kroky měřicího cyklu a současně

sbírá, uchovává a vyhodnocuje výstupní data. Průtokové rychlosti v SIA se obvykle pohybují okolo $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a doba trvání jednoho měřicího cyklu většinou nepřesahuje 30 s. ⁶⁸

4.2.2. Uplatnění SIA v praxi

Potenciál využití SIA v analytické praxi je značný a bude se zřejmě dále rozšiřovat. Technika SIA vyniká rychlostí, jednoduchostí, flexibilitou a plnou automatizací. Proto se jeví jako velmi vhodný prostředek všude tam, kde je nutno analyzovat velké série vzorků (např. rutinní analýzy vod, potravin, krve, moči), sledovat změny koncentrace důležitých analytů v průběhu různých procesů (řízení a optimalizace biotechnologických výrob, monitorování hladin léčiv nebo jejich metabolitů v tělních tekutinách pacientů), studovat odpověď buněk, membrán či orgánů na různé vnější podněty (např. ve farmaceutickém výzkumu). ⁶⁸

4.2.3. Stanovení antioxidační aktivity

Oxidační stres může být způsoben oslabením antioxidační ochrany organismu. A naopak dlouho trvající a intenzivní oxidační záření může vyčerpat nebo oslabit antioxidační systém. Jsou popsány i případy indukce antioxidačních enzymů. Proto je měření jednotlivých složek a testování kapacity systému prakticky významné. ⁶⁶

Poločas existence volných radikálů bývá velmi krátký. Proto je jejich studium technicky náročné. ^{Št.} Radikály reaktivních forem kyslíku (ROO^\bullet , HO^\bullet , RO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$) jsou velmi reaktivní sloučeniny značně rozdílné životnosti a chemických vlastností, jejich přímá detekce je nesnadná. K určení celkové antioxidační aktivity se proto častěji užívají stabilní radikálové sloučeniny. ⁶⁹

Látky zpomalující oxidační proces inaktivací volných radikálů, nebo tzv. zametače (scavengers) volných radikálů se označují jako primární antioxidy. Antioxidační aktivita může být určena přímo v komplexním vzorku nebo v modelových systémech. Jako modelové oxidační systémy jsou k určení antioxidační aktivity alternativně využívány tyto:

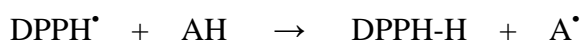
- odbarvení β -karotenu
- peroxidace methyllinoleátu
- inhibice chemiluminiscence luminolu (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalazindion)
- inhibice chemiluminiscence tetralinu (1,2,3,4-tetrahydronaftalen)
- odbarvení ABTS^+ radikálu (2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kys.))

- inhibice tvorby thiokyanátu železitého
- odbarvení DPPH radikálu (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl)

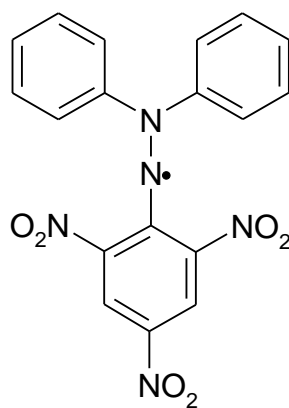
Tyto modelové oxidační systémy umožňují snadný screening a porovnání primárních antioxidantů. Testy tohoto typu jsou vhodné pro určení celkového antioxidačního účinku vzorku.⁶⁹

4.2.4. Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu

Stanovení antioxidační aktivity sloučeniny či extraktů umožňuje reakce se stabilním radikálem 2,2-difenyl-1,1-pikrylhydrazylem (DPPH). Lze jej považovat za velmi stabilní radikál, který může být inaktivován pouze antioxidantem (AH), který je donorem atomu vodíku. Redukci DPPH doprovází pokles absorbance při dané vlnové délce. Absorpční maximum pro DPPH je při $\lambda = 525 \text{ nm}$.⁷⁰



Obr. 18: Průběh reakce DPPH radikálu s antioxidačně působící látkou



DPPH radikál

Vzorec LXI

K inaktivaci DPPH radikálu dochází také vlivem světla a působením singletového kyslíku. Vzhledem k této možnosti musí být tedy pokles absorbance DPPH správně interpretován.⁷¹

Reakce probíhá v organickém (methanol, ethanol, benzen, dioxan) nebo vodně organickém (ethanol 50%) prostředí. Nejlepší průběh reakce je bez přídavku pufrů. Doporučované koncentrace DPPH se pohybují v rozmezí $1 \cdot 10^{-3}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ M, v závislosti na použitých objemech činidla a vzorku a charakteru stanovovaného vzorku. Antioxidační účinek lze vyjádřit v procentech poklesu absorbance oproti slepému vzorku.⁷⁰

5. Tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography, TLC)

5.1. Úvod

Chromatografie je separační proces, používaný k dělení směsi látek na jednotlivé složky. V jeho průběhu tyto složky interagují různým způsobem (na základě termodynamických odlišností) v systému dvou fází: stacionární (adsorbent) a mobilní (rozpouštědlo, eluent). Má tři základní fáze: nanesení vzorku, dělicí proces a detekci.⁷²

Tenkovrstvá chromatografie má velkou variační šíři: využívá stacionární fáze fixované nebo sypané, nenasyčených a nasycených komor a různého přístrojového vybavení, což jí umožňuje výrazně ovlivňovat dělení. Je široce používána.⁷²

Dělení směsi látek probíhá na základě kapilárního nasávání rozpouštědla stacionární fází, protože deska je svou dolní hranou ponořena do eluční soustavy v chromatografické nádobě. Přitom se uplatňují podle povahy sorbetu a složení mobilní fáze všechny známé principy chromatografického dělení a to buď každý sám nebo ve vzájemné kombinaci. Tento typ umožňuje výkonné dělení (pracuje se 400 až 3000 teoretickými patry) podle charakteru systému a způsobu provedení. Využití tenkovrstvé chromatografie je hlavně kvalitativně-analytické tedy pro rychlou kontrolu jiných způsobů dělení (destilace, sloupcové chromatografie, rekrystalizace aj.).⁷²

5.2. Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S 1: toluen + ethylformiát + kyselina mravenčí

50 : 40 : 10

S 2: propanol + voda

90 : 10

5.3. Chromatografické adsorbenty

25 TLC aluminium sheets 20 x 20 cm, Silica gel 60 Merck®

25 TLC aluminium sheets 20 x 20 cm, Silica gel 60 F₂₅₄ Merck®

5.4. Detekční činidla

D 1: UV $\lambda = 254$ nm

Chromatogram byl pozorován pod UV lampou $\lambda = 254$ nm. Pozitivní reakce se projevuje vznikem různě tmavých skvrn, ve kterých je zhasen fluoreskující luminofor vrstvy chromatogramu

D 2: UV $\lambda = 365$ nm

Chromatogram byl pozorován pod UV lampou $\lambda = 365$ nm. Pozitivní reakce se projevuje vznikem fluoreskujících skvrn.

D 3: Acetanhydrid – kyselina sírová (Liebermann-Burchardovo činidlo) ⁷³

Před použitím bylo opatrně za chlazení smícháno 5 ml acetanhydridu s 5 ml koncentrované kyseliny sírové a získaná směs opatrně přidána do 50 ml ochlazeného absolutního ethanolu. Chromatogram byl zahříván při teplotě 100 °C 10 minut a vyhodnocen pod UV světlem $\lambda = 365$ nm. Při pozitivní reakci vznikají fluoreskující skvrny.

D 4: Anisaldehyd – kyselina sírová ⁷³

Do roztoku 0,5 ml anisaldehydu v 50 ml kyseliny octové byl přidán 1 ml kyseliny sírové. Chromatogram byl zahříván na 100 – 105 °C než různě barevné skvrny dosáhly maximální intenzity.

D 5: 2,6-Dibromchinonchlorimid (Gibbsovo činidlo) ⁷³

Po postřiku čerstvě připraveným 0,4% methanolvým roztokem 2,6-dibromchinonchlorimidu byl chromatogram umístěn do komory obsahující 25% hydroxid amonný. Fenolické sloučeniny tvoří s činidlem žluté až hnědé skvrny podle doby působení hydroxidů amonných.

D 6: Difenylamin – anilin – kyselina fosforečná ⁷⁴

1 g anilinu a 1 g difenylaminu bylo rozpuštěno v 100 ml acetonu. 10 ml tohoto roztoku bylo před použitím smícháno s 1 ml 85% kyseliny fosforečné. Po postřiku byl chromatogram zahříván při 120 °C asi 5 minut. Vznikají různě barevné skvrny.

D 7: Dragendorffovo činidlo podle Muniera ⁷³

Roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bizmutitého a 20 g kyseliny vinné bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody.

Roztok B: 16 g jodidu draselného bylo rozpuštěno ve 40 ml destilované vody.

Zásobní roztok byl připraven smícháním roztoku A a B v poměru 1:1 (v/v), který může být uchován po několik měsíců v lednici.

Postřikovací roztok byl připraven rozpuštěním 10 g kyseliny vinné v 50 ml destilované vody a přidáním 5 ml zásobního roztoku. Alkaloidy jsou po reakci s detekčním činidlem zbarveny oranžově

D 8: Fast Blue B salt ⁷³

Postřikovací roztok I: čerstvě připravený 0,5% vodný roztok Fast Blue B salt

Postřikovací roztok II: 0,1 N NaOH

Chromatogram je nejprve postříkán postřikovacím roztokem I, po uschnutí chromatogramu postřikovacím roztokem II.

Vznikají různě zbarvené skvrny.

D 9: Glukóza – anilin (Schweppovo činidlo) ⁷³

Roztok A: 10% vodný roztok glukózy

Roztok B: 10% ethanolový roztok anilinu

Činidlo bylo připraveno smícháním roztoků A a B (po 20 ml) a zředěno na 100 ml n-butanolem. Chromatogram byl zahříván 5 – 10 minut na 125 °C. Vznikají červené až hnědé skvrny.

D 10: Hexakynoželezitan draselný – chlorid železitý ⁷³

2% roztok chloridu železitého byl smíchán s 1% roztokem hexakynoželezitanu draselného (1 : 1). Vznikají modré skvrny. Činidlo je stálé nejdéle 5 minut. Vznikají modré, resp. zelené skvrny.

D 11: Hydroxylamin – chlorid železitý ⁷³

Roztok A: byl připraven rozpuštěním 20 g chloridu hydroxylaminia v 50 ml vody a doplněním do 200 ml ethanolem.

Roztok B: byl připraven rozpuštěním 50 g hydroxidu draselného v minimálním množství vody a zředěním na 500 ml ethanolem.

Postřikovací roztok I: byl získán smícháním roztoku A s roztokem B v poměru 1:2 a odfiltrováním vyloučeného chloridu draselného.

Postřikovací roztok II: byl získán rozpuštěním 10 g chloridu železitého ve 20 ml 36% kyseliny chlorovodíkové a protřepáním s 200 ml diethyletheru do vzniku homogenního roztoku. K detekci byl použit nejprve postřikovací roztok I, po uschnutí chromatogramu pak postřikovací roztok II. Vznikají různě zbarvené skvrny.

D 12: Isatin – octan zinečnatý ⁷³

Isatin (1 g) a octan zinečnatý (1,5 g) byly rozpuštěny ve 100 ml 95% isopropylalkoholu za tepla do 80 °C. 1 ml octové kyseliny bylo přidáno po ochlazení. Chromatogram byl ponechán asi 20 hodin při pokojové teplotě a byl pozorován. Při pozitivní reakci byly pozorovány růžové až červené skvrny.

D 13: 1,2-Naftochinon-4-sulfonová kyselina – kyselina chloristá ⁷³

0,1 g 1,2-naftochinon-4-sulfonové kyseliny bylo rozpuštěno ve 100 ml směsi (20 ml ethanol + 10 ml 60% kyselina chloristá + 1 ml formaldehyd + 9 ml destilovaná voda). Po postřiku činidlem byl chromatogram rozehrán na 70 – 80 °C a byly pozorovány různě barevné skvrny.

D 14: Ninhydrin – dusičnan měďnatý ⁷⁴

Roztok A: byl připraven smícháním 0,2% roztoku ninhydrinu v 50 ml absolutního ethanolu, 10 ml ledové kyseliny octové a 2 ml 2,4,6 kolidinu.

Roztok B: 1% roztok trihydrátu dusičnanu měďnatého v absolutním ethanolu. Před použitím byl smíchán roztok A s roztokem B v poměru 5 : 3. Po postřiku byl chromatogram zahříván při 100 °C 1 – 2 minuty. Při pozitivní reakci byly pozorovány různě zbarvené skvrny.

D 15: Paulyho činidlo (diazotovaná kyselina sulfanilová) ⁷³

4,5 g kyseliny sulfanilové bylo za tepla rozpuštěno ve 45 ml kyseliny chlorovodíkové (12 mol.l⁻¹) a zředěno vodou na 500 ml. 10 ml tohoto roztoku bylo ochlazen v chladničce a pak k němu bylo přidáno 10 ml ochlazeného 4,5% roztoku dusitanu sodného. Získaný roztok byl ponechán 15 minut v chladničce. Bezprostředně před použitím byl smíchán s 20 ml 10% roztoku uhličitanu sodného. Pozitivně reagující látky tvoří s činidlem žluté skvrny.

D 16: Vanilin – kyselina sírová⁷³

Vanilin (3 g) byl rozpuštěn v ethanolu (100 ml) a do roztoku přidána koncentrovaná kyselina sírová (3 ml). Chromatogram byl zahříván na 110 °C. Vznikají různé barevné skvrny.

D 17: 2,4-Dinitrofenylhydrazin⁷³

Postřikovací roztok B: 10 ml 36% kyseliny chlorovodíkové bylo přidáno k roztoku 1 g 2,4-Dinitrofenylhydrazinu v 1000 ml ethanolu.

D 18: Anthron⁷³

0,3 g Anthronu bylo rozpuštěno v 10 ml kyseliny octové a 20 ml ethanolu. Poté byly přidány k roztoku 3 ml kyseliny fosforčné a 1 ml vody. Po postřiku byl chromatogram zahříván 5 - 6 minut při 110 °C. Ketózy a oligosacharidy obsahující ketózy vytváří žluté skvrny.

D 19: Peroxid vodíku⁷³

0,3% vodný roztok peroxidu vodíku. Po postřiku byl chromatogram pozorován pod dlouhovlnným UV zářením dokud modrá fluorescence skvrn nedosáhla maxima.

D 20: Bromkresolová zeleň⁷³

0,04 g bromkresolové zeleně bylo rozpuštěno v 100 ml ethanolu a po kapkách byl přidáván 0,1 N roztok hydroxidu sodného, dokud nevzniklo stálé modré zbarvení. Vznikají modré skvrny.

D 21: Chlorid železitý⁷³

1-5% roztok chloridu železitého v 0,5 N kyselině chlorovodíkové. Hydroxámové kyseliny vytváří červené skvrny, fenoly modré či zelené skvrny.

D 22: 4-Aminoantipyrin-ferrikyanid draselný⁷³

Posřikovací roztok I : 2% 4-Aminoantipyrin v ethanolu.

Postřikovací roztok II : 8% vodný roztok ferrikyanidu draselného.

Po postřiku roztokem I a roztokem II byl chromatogram umístěn do komory s hydroxidem amonným 25%. Vznikají červenooranžové až lososově růžové skvrny.

D 23: Fosfomolybdenová kyselina⁷³

5% ethanolický roztok kyseliny fosfomolybdenové. Po posřiku byl chromatogram umístěn do komory a zahříván při 120 °C dokud nevznikly nejintenzivnější skvrny.

D 24: Berberinové činidlo⁷⁵

10 mg berberinsulfátu bylo rozpuštěno ve 100 ml ethanolu. Po homogenním postřiku byly pozorovány pod UV zářením světla žlutě fluoreskující skvrny na světle žlutém podkladu.

IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

1. Potřeby

1.1. Rozpouštědla

Aceton č.

Diethylether p.a.

Ethanol (s 5% methanolu) č.

Ethylformiát č.

Formaldehyd 36 – 38% p.a.

Isopropylalkohol 95% p.a.

Methanol č.

1-Propanol č.

Toluen p.a.

Voda destilovaná

Voda superčistá

1.2. Chemikálie

Acetanhydrid č.

4-Aminoantipyrin č.

Anilin č.

Anisaldehyd p.a.

Anthron č.

Berberinsulfát č.

Bromkresolová zeleň č.
2,4-Dinitrofenylhydrazin č.
2,6-Dibromchinonchlorimid č.
Difenylamin č.
Dusičnan bizmutitý zásaditý p.a.
Dusičnan měďnatý p.a.
Dusitan sodný p.a.
Ferrikyanid draselný p.a.
Fast Blue B salt p.a.
D-Glukóza č.
Hexakynoželezitan draselný č.
Hydroxid amonný 25% č.
Hydroxid draselný č.
Hydroxid sodný č.
Hydroxylaminhydrochlorid p.a.
Chlorid manganatý tetrahydrát p.a.
Chlorid železitý č.
Isatin č.
Jodid draselný č.
2,4,6-Kolidin p.a.
Křemelina – celit Hyflosupercell (John Manville) č.
Kyselina chloristá 70% p.a.
Kyselina chlorovodíková 36% p.a.
Kyselina octová 98% p.a.
Kyselina fosfomolybdenová p.a.
Kyselina fosforečná 85% p.a.
Kyselina mravenčí 85% p.a.
Kyselina sírová 96% p.a.
Kyselina sulfanilová p.a.
Kyselina vinná p.a.
1,2-Naftochinon-4-sulfonová kyselina p.a.
Ninhydrin p.a.
Octan zinečnatý č.
Peroxid vodíku 3% vodný

Uhličitan sodný č.

Vanilin p.a.

1.3. Stanovovaná látka

houbové extrakty č. 1 - 14

1.4. Laboratorní sklo a přístroje

Kádinky

Zkumavky

Stojan na zkumavky

Pipeta automatická

Filtrační papír

Digitální stopky Q & Q

Váhy - digitální KERN 572-33

Váhy - digitální analytické ADA

Ruční mixér Moulinex (Spiralio)

UV lampa Camag 254/365 nm

Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin)

Horkovzdušná sušárna HS 31A

Vakuová odparka Büchi Rotavapor R – 114

FIAlabTM, ALITEA[®]

2. Příprava extraktů

2.1. Použitý materiál:

Plodnice vybraných taxonů hub (viz tab.2), klasifikovány Východočeskou mykologickou společností (dr. Věra Samková), byly zmrazeny tekutým dusíkem a do doby zpracování uchovávány v plastických kontejnerech v atmosféře dusíku při -23 °C až -27 °C. Jejich sběr probíhal v letech 2001 – 2003 na různých lokalitách České republiky.⁷⁸

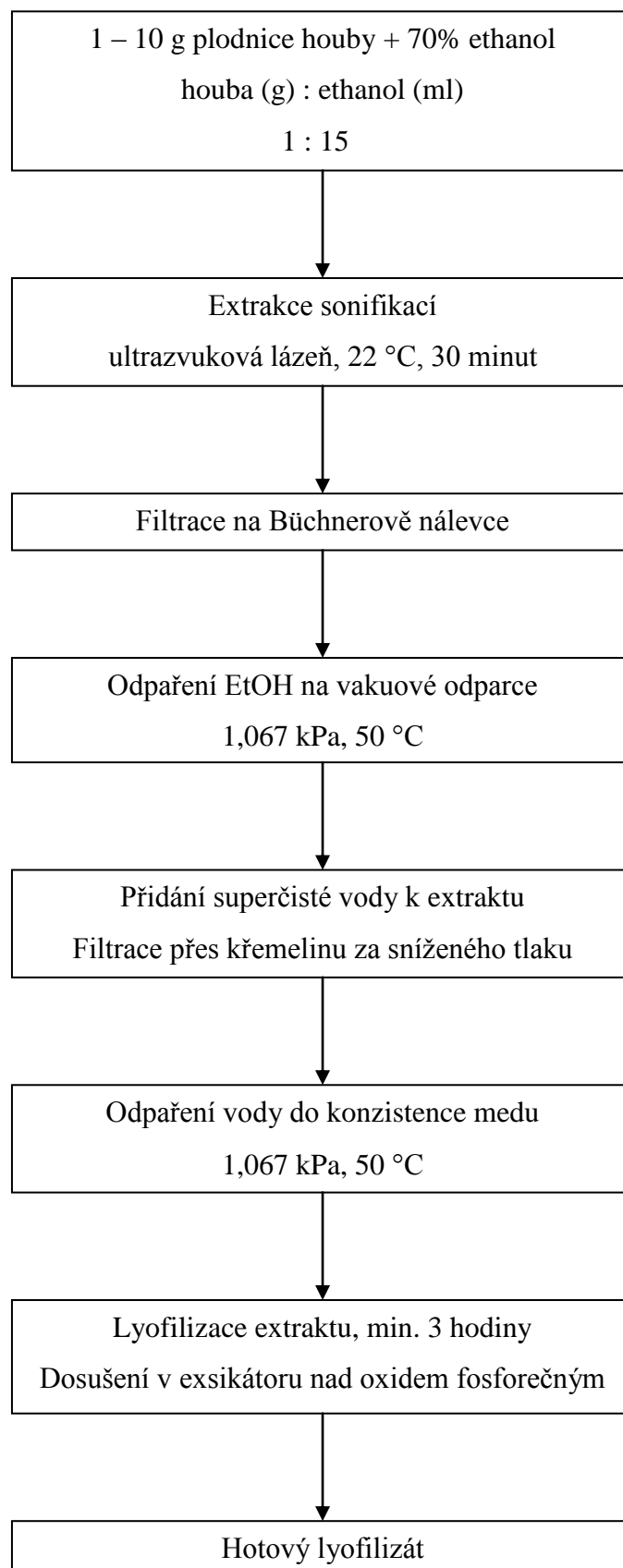
Tab. 2: Místo nalezení a nálezce hub⁷⁸

Číslo taxonu	Název taxonu	Místo nalezení	Nálezce
1	<i>Leccinum quercinum</i>	Neznámé	Neznámý
2	<i>Albatrellus ovinus</i>	Račín, les V. od vsi	M. Macek
3	<i>Panus conchatus</i>	Nový Hradec Králové: les U Dvou závor	M. Dobešová
4	<i>Lactarius blennius</i>	Kal u Nové Paky	M. Junková
5	<i>Lactarius deterrimus</i>	Hradec Králové, Sítovka	M. Junková
6	<i>Lactarius vellereus</i>	Svinary, les Dehetník, 1km S obce	V. Samková
7	<i>Russula acrifolia</i>	Neznámé	Neznámý
8	<i>Russula coerulea</i>	Nový Hradec Králové: les V	L. Opletal
9	<i>Russula delica</i>	Černilov, trávník v obci	V. Samková
10	<i>Russula integra</i>	Račín, les V. od vsi	M. Macek
11	<i>Russula olivacea</i>	Horní Morava: les V	L. Opletal
12	<i>Hydnum repandum</i>	Černilov, les Kartouz, 2km S obce	V. Samková
13	<i>Hypholoma sublateritium</i>	Nový Hradec Králové, les u Sítovky	M. Junková
14	<i>Sarcodon imbricatus</i>	Velký Vřešťov, les V dubech	M. Dobešová

2.2. Postup přípravy lyofilizátu

K naváženému vzorku hub (1 g – 10 g podle dostupného množství) se přidá 70% ethanol (předem připravený zředěním 95% ethanolu a superčisté vody) v poměru množství houby v gramech ku ethanolu v mililitrech 1 : 15. Plodnice se v kádince rozdrtí pomocí mixéru a spolu s ethanolem přemístí do Erlenmayerovy baňky, která se překryje alobalem. Extrakce probíhá sonifikací v ultrazvukové lázni při laboratorní teplotě, stupni intenzity nastaveném na 10, po dobu 30 minut. Poté se extrakt odfiltruje od pevného podílu houbové hmoty na Büchnerově nálevce, použitím vodní vývěvy. Pevný podíl se promyje ještě 3 x 10 ml 70% ethanolu a opět zfiltruje. Spojený filtrát se zahustí na rotační odparce za sníženého tlaku (1,067 kPa) při teplotě do 50 °C na objem asi 10 – 15 ml. V této fázi by měl být extrakt zbaven ethanolu. K zahuštěnému extraktu se přidá 5 ml superčisté vody a roztok se zfiltruje na filtračním tubusu (v němž je na dně vložen malý smotek vaty, převrstvený asi 3 mm vrstvou čištěné křemeliny a ta překryta opět vatou) za sníženého tlaku. Křemelina se promyje ještě 3 x 5 ml superčisté vody. Poté se z extraktu na rotační odparce za sníženého tlaku při 50 °C odpařuje voda tak dlouho, až má extrakt konzistenci medu. Následná lyofilizace probíhá nejméně 3 hodiny. Lyofilizát se ihned umístí na minimálně 6 hodin do exsikátoru nad oxid fosforečný, kde dochází k odstranění poslední zbytkové vody. Po dosušení se lyofilizovaný extrakt přeplní do vzduchotěsně uzavíratelných lahviček, převrství argonem a uzavře.⁷⁸

Takto připravený lyofilizát je možné využít jako výchozí materiál pro detekci obsahových látek hub tenkovrstvou chromatografií. a pro měření antioxidační aktivity sledovaných taxonů.



Obr. 19: Schéma postupu přípravy lyofilizátu

3. Sekvenční injekční analýza

3.1. Stanovení antioxidační aktivity DPPH testem pomocí SIA

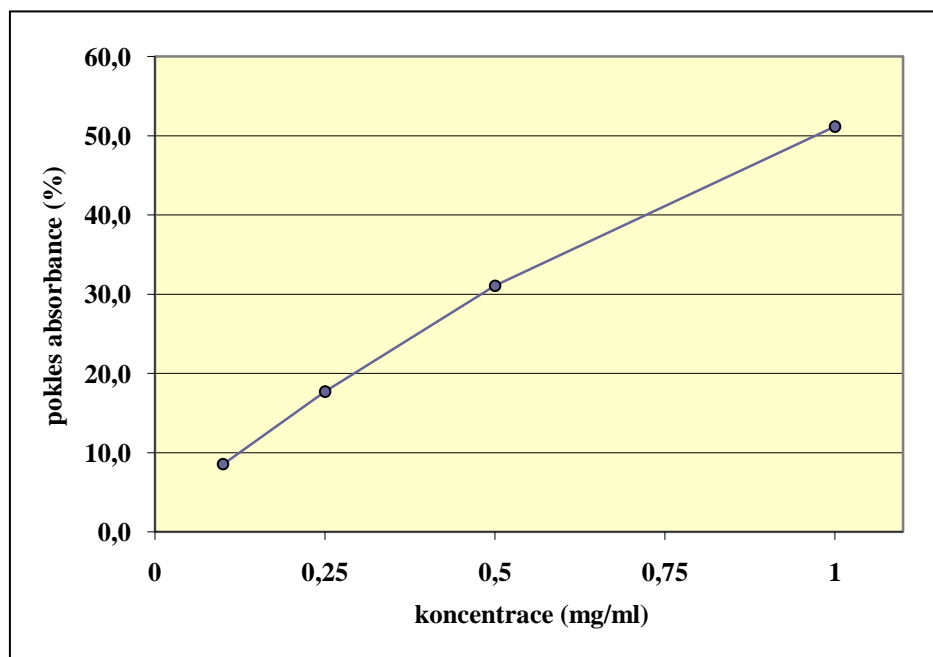
3,9 mg DPPH radikálu bylo rozpuštěno v 52 ml 96% ethanolu a ve 100 ml odměrné baňce doplněno vodou na 100 ml. K úplnému rozpuštění a odvzdušnění roztoku bylo třeba použít 5 minutové sonifikace v ultrazvukové lázni. Takto byl připraven roztok DPPH radikálu v 50% ethanolu v den měření vždy čerstvý. Jako slepý vzorek byl použit 50% ethanol. Měřený vzorek byl připraven rozpuštěním lyofilizátu (o hmotnosti 4 mg) v 50% ethanolu tak, aby vznikla koncentrace 1 mg/ml. Postupným ředěním byly připraveny další tři koncentrace 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml. Rovněž všechny připravené koncentrace měřeného vzorku a slepý vzorek byly odplyněny v ultrazvukové lázni. Po nasátí roztoku DPPH (30 μ l) přístrojem (FIALabTM, ALITEA[®] USA) mezi dvě zóny měřeného vzorku (po 25 μ l), resp. slepého vzorku, došlo k reakci. Po 30 sekundách byla přístrojem změřena absorbance při $\lambda = 525$ nm.

Antioxidační účinek byl vyjádřen v procentech poklesu absorbance oproti slepému vzorku. Standardem byl trolox, který byl měřen při koncentraci 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,025 mg/ml. Jednotlivé naměřené údaje jsou pro každý taxon uvedeny v tabulce a vyhodnoceny v grafu.

3.2. Hodnoty naměřených antioxidačních aktivit u sledovaných taxonů

Tab. 2 : *Leccinum quercinum*

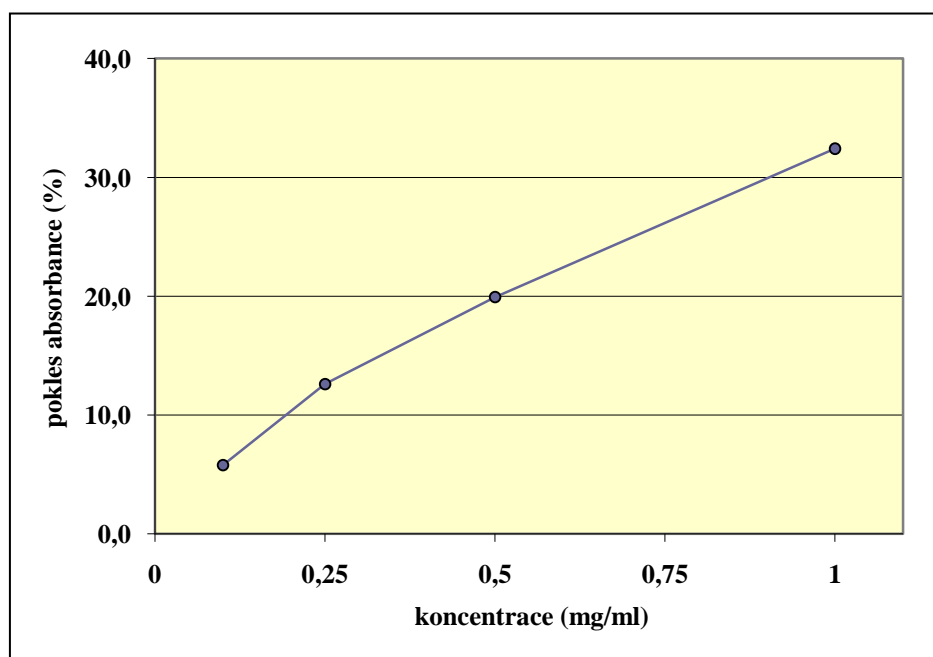
Koncentrace (mg/ml)	1,0	0,5	0,25	0,1
Pokles absorbance (%)	51,16	31,07	17,7	8,54



Graf 1 : *Leccinum quercinum* – závislost poklesu absorbance na koncentraci

Tab. 3 : *Albatrellus ovinus*

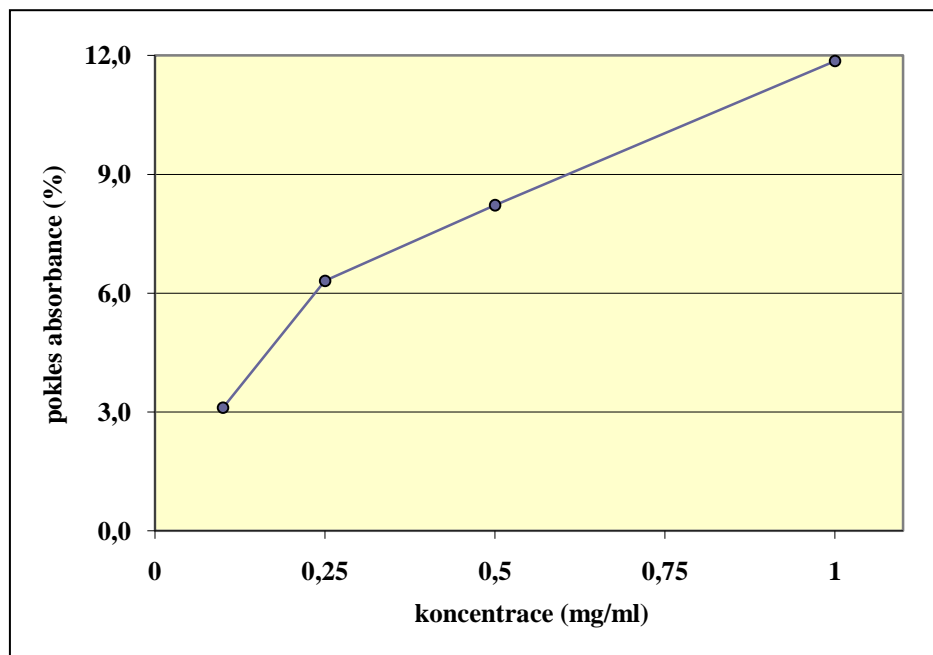
Koncentrace (mg/ml)	1,0	0,5	0,25	0,1
Pokles absorbance (%)	32,41	19,92	12,60	5,79



Graf 2 : *Albatrellus ovinus* – závislost poklesu absorbance na koncentraci

Tab. 4 : *Panus conchatus*

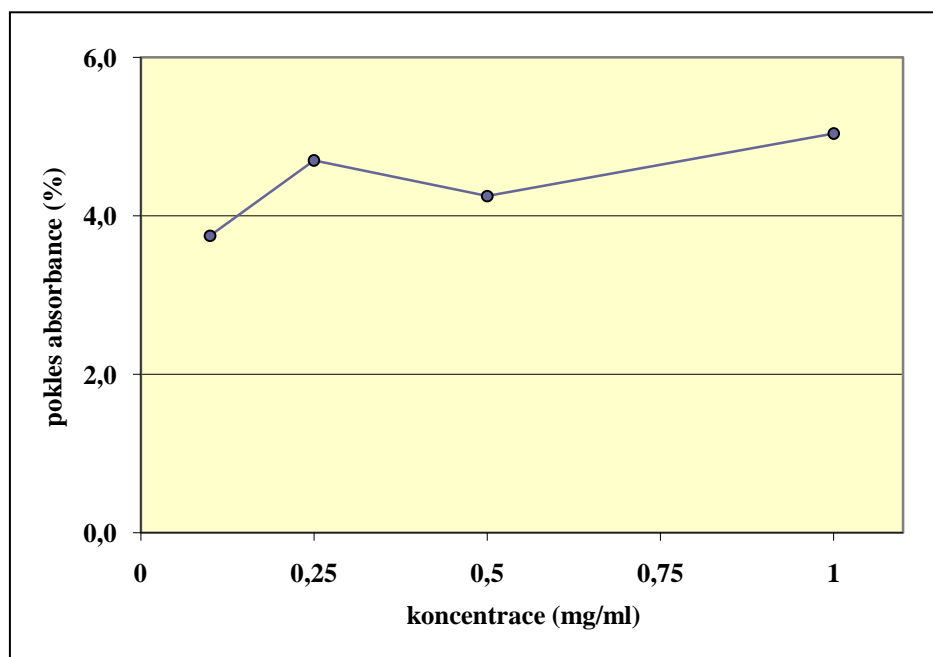
Koncentrace (mg/ml)	1,0	0,5	0,25	0,1
Pokles absorbance (%)	11,86	8,22	6,31	3,11



Graf 3 : *Panus conchatus* – závislost poklesu absorbance na koncentraci

Tab. 5 : *Lactarius blennius*

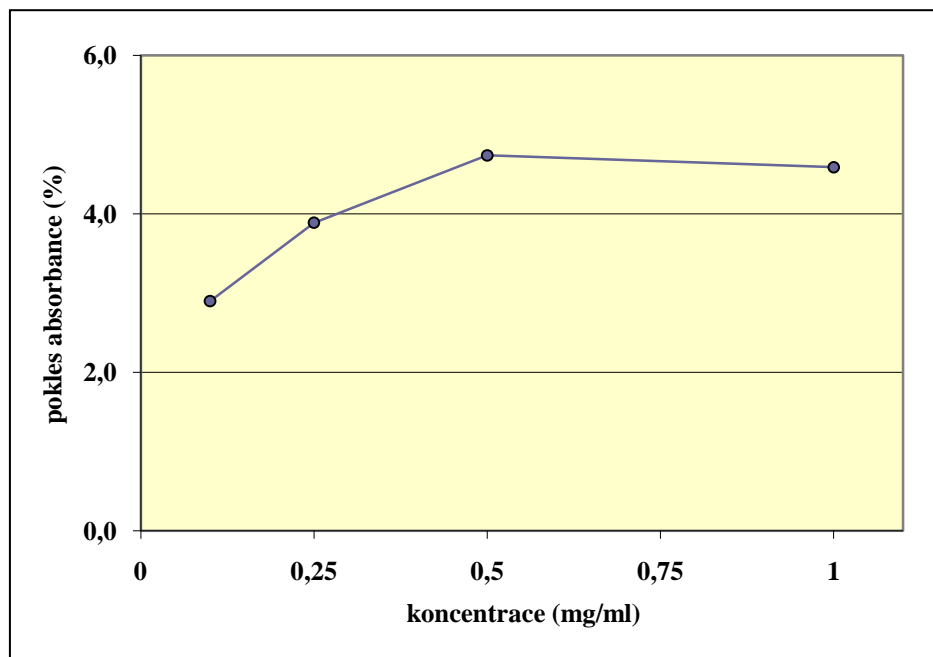
Koncentrace (mg/ml)	1,0	0,5	0,25	0,1
Pokles absorbance (%)	5,04	4,25	4,70	3,75



Graf 4 : *Lactarius blennius* – závislost poklesu absorbance na koncentraci

Tab. 6 : *Lactarius deterrimus*

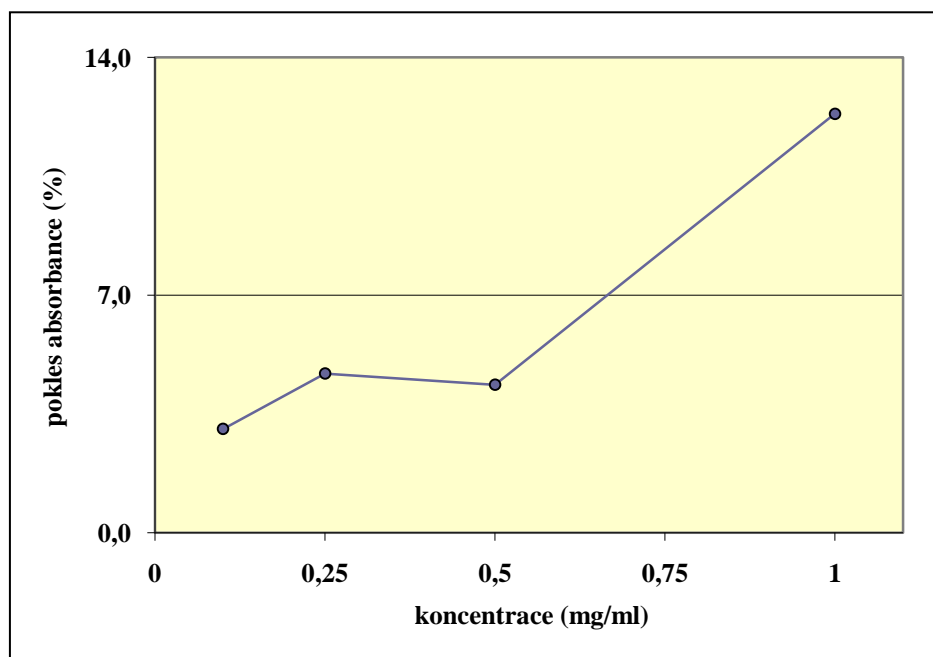
Koncentrace (mg/ml)	1,0	0,5	0,25	0,1
Pokles absorbance (%)	4,59	4,74	3,89	2,90



Graf 5 : *Lactarius deterrimus* – závislost poklesu absorbance na koncentraci

Tab. 7 : *Lactarius vellereus*

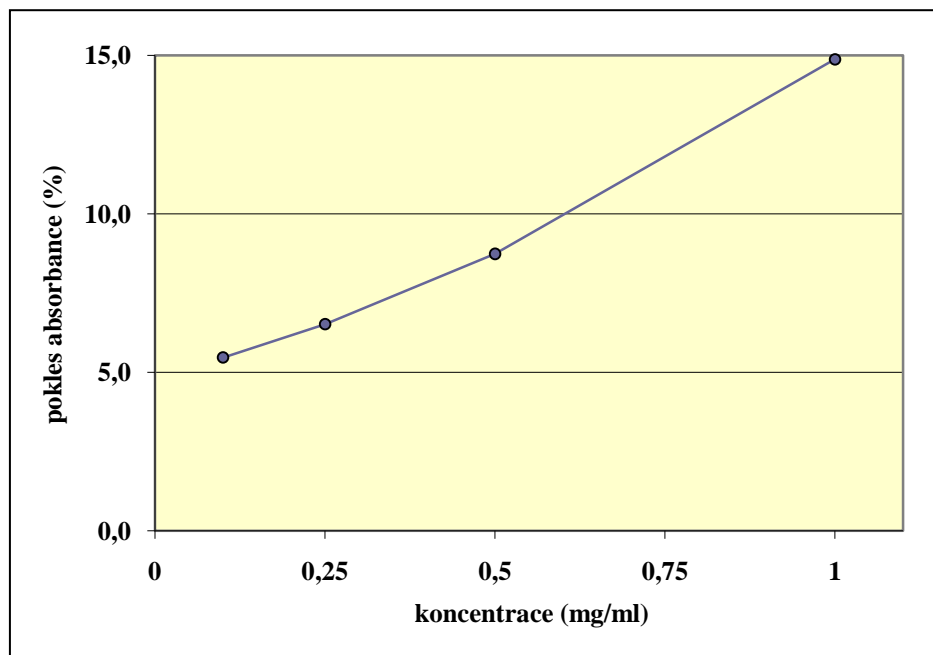
Koncentrace (mg/ml)	1,0	0,5	0,25	0,1
Pokles absorbance (%)	12,34	4,36	4,69	3,06



Graf 6 : *Lactarius vellereus* – závislost poklesu absorbance na koncentraci

Tab. 8 : *Russula acrifolia*

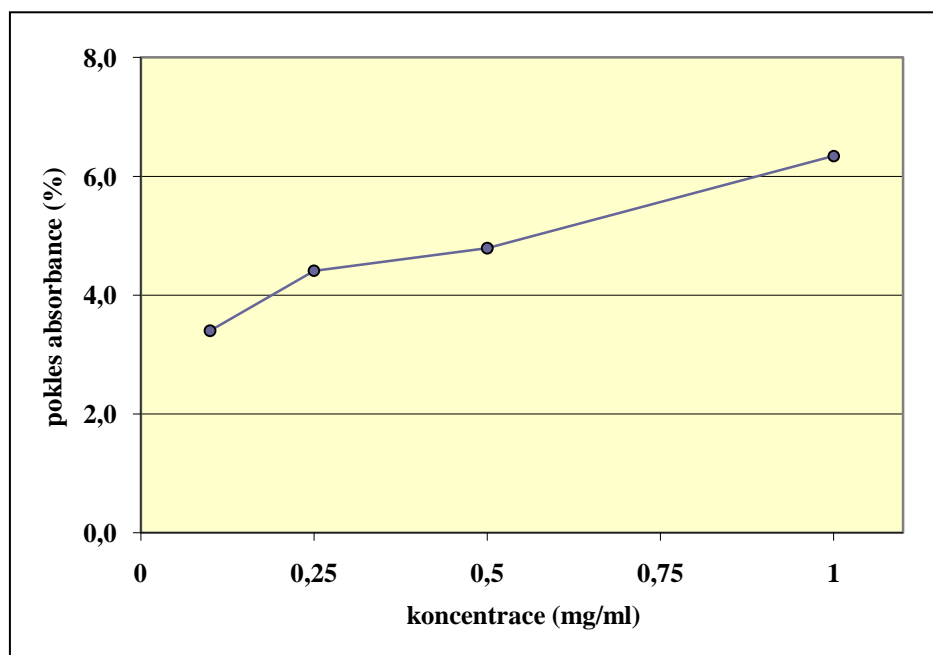
Koncentrace (mg/ml)	1,0	0,5	0,25	0,1
Pokles absorbance (%)	14,88	8,74	6,52	5,47



Graf 7 : *Russula acrifolia* – závislost poklesu absorbance na koncentraci

Tab. 9 : *Russula coerulea*

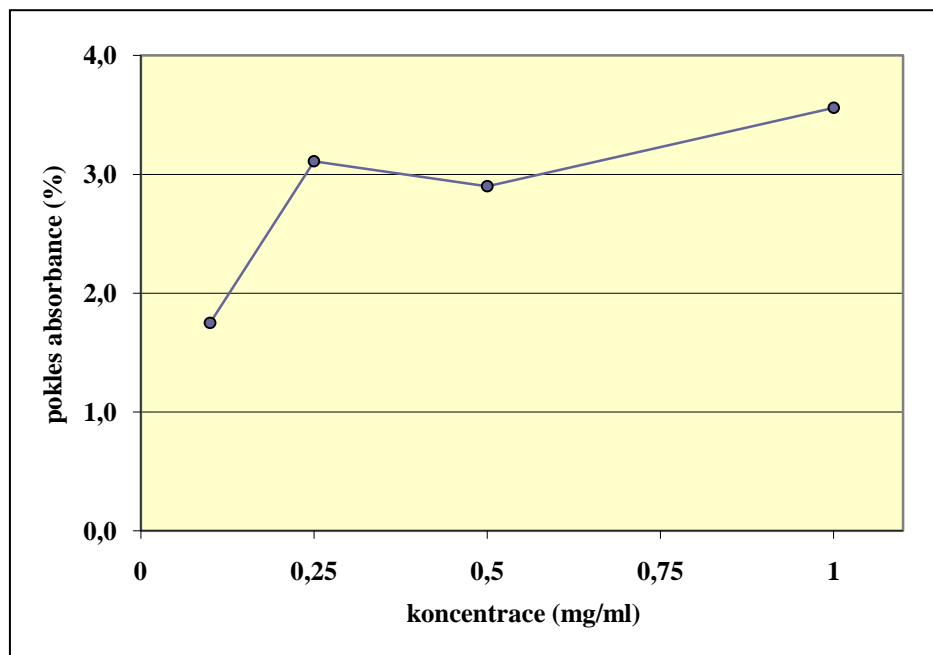
Koncentrace (mg/ml)	1,0	0,5	0,25	0,1
Pokles absorbance (%)	6,34	4,79	4,41	3,40



Graf 8 : *Russula coerulea* – závislost poklesu absorbance na koncentraci

Tab. 10 : *Russula delica*

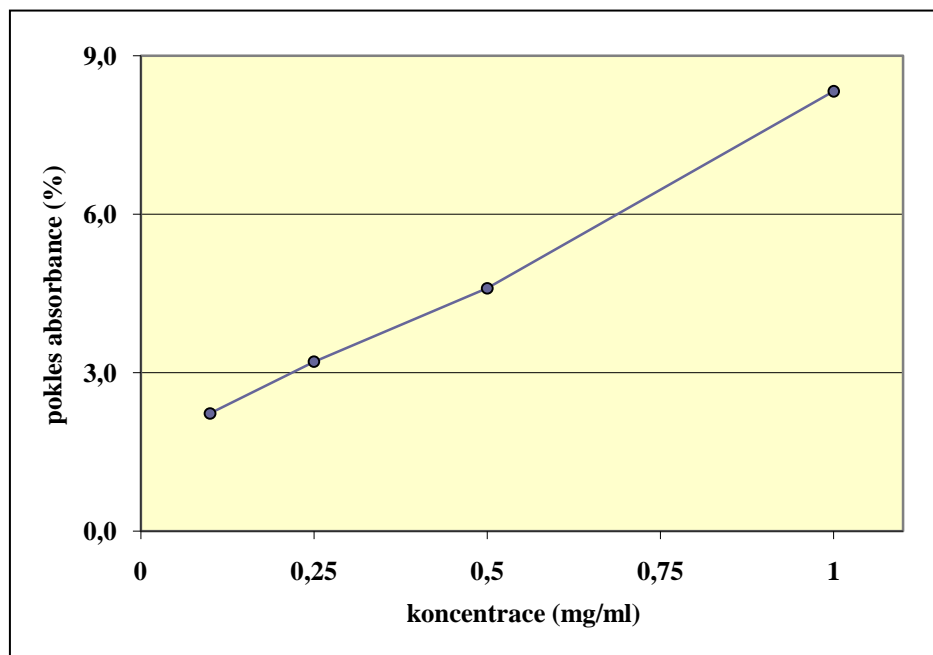
Koncentrace (mg/ml)	1,0	0,5	0,25	0,1
Pokles absorbance (%)	5,04	4,25	4,70	3,75



Graf 9 : *Russula delica* – závislost poklesu absorbance na koncentraci

Tab. 11 : *Russula integra*

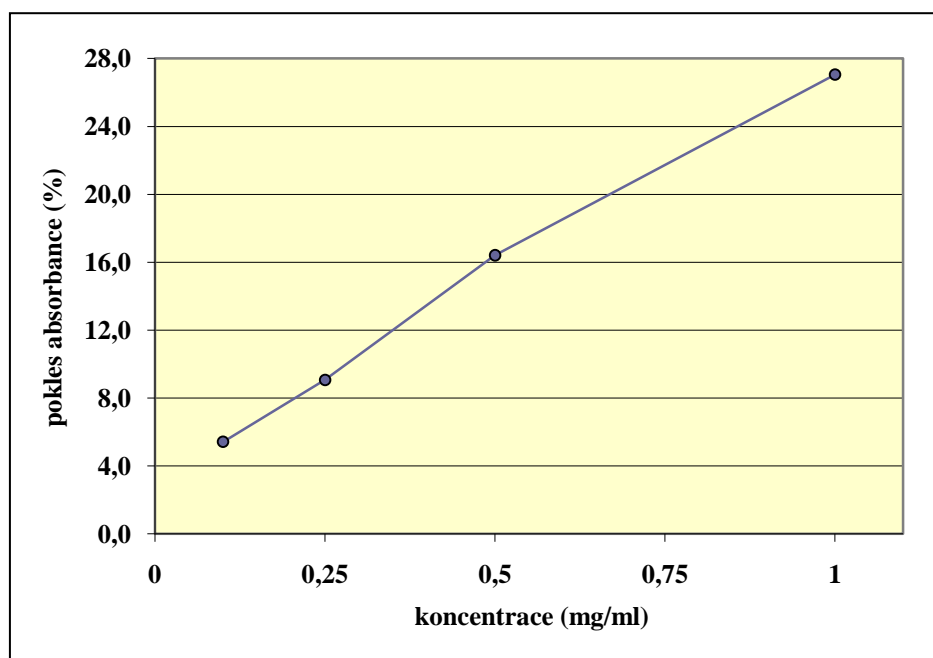
Koncentrace (mg/ml)	1,0	0,5	0,25	0,1
Pokles absorbance (%)	8,33	4,6	3,21	2,23



Graf 10 : *Russula integra* – závislost poklesu absorbance na koncentraci

Tab. 12 : *Russula olivacea*

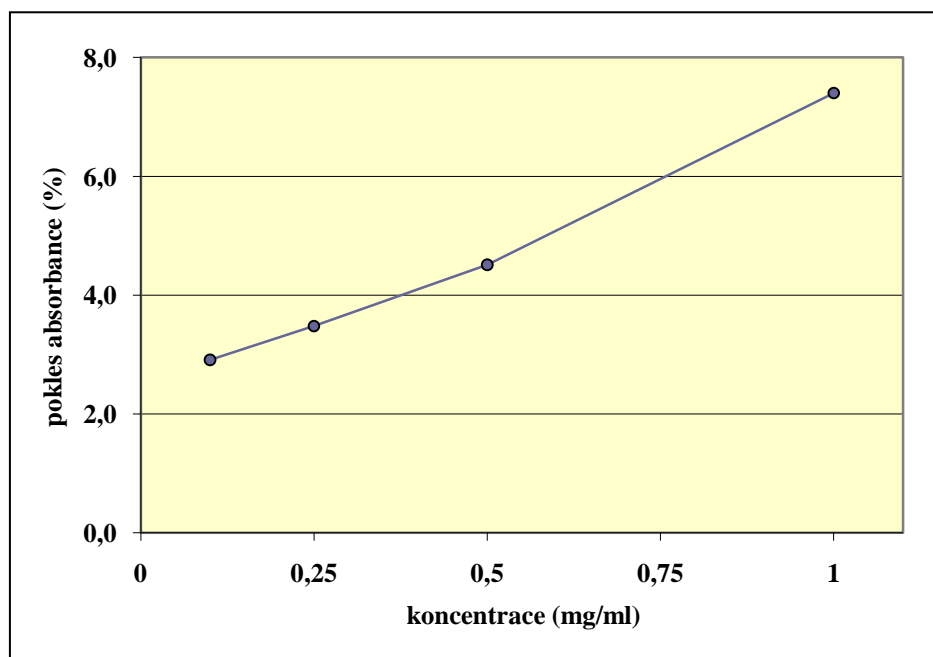
Koncentrace (mg/ml)	1,0	0,5	0,25	0,1
Pokles absorbance (%)	27,05	16,41	9,07	5,42



Graf 11 : *Russula olivacea* – závislost poklesu absorbance na koncentraci

Tab. 13 : *Hydnum repandum*

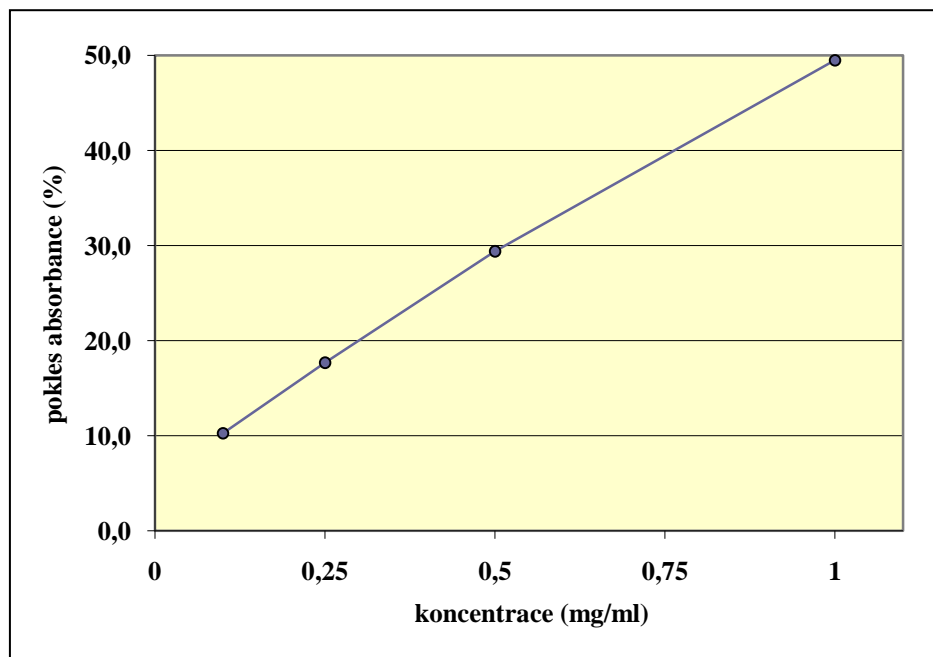
Koncentrace (mg/ml)	1,0	0,5	0,25	0,1
Pokles absorbance (%)	7,40	4,51	3,48	2,91



Graf 12 : *Hydnum repandum* – závislost poklesu absorbance na koncentraci

Tab. 14 : *Hypholoma sublateritium*

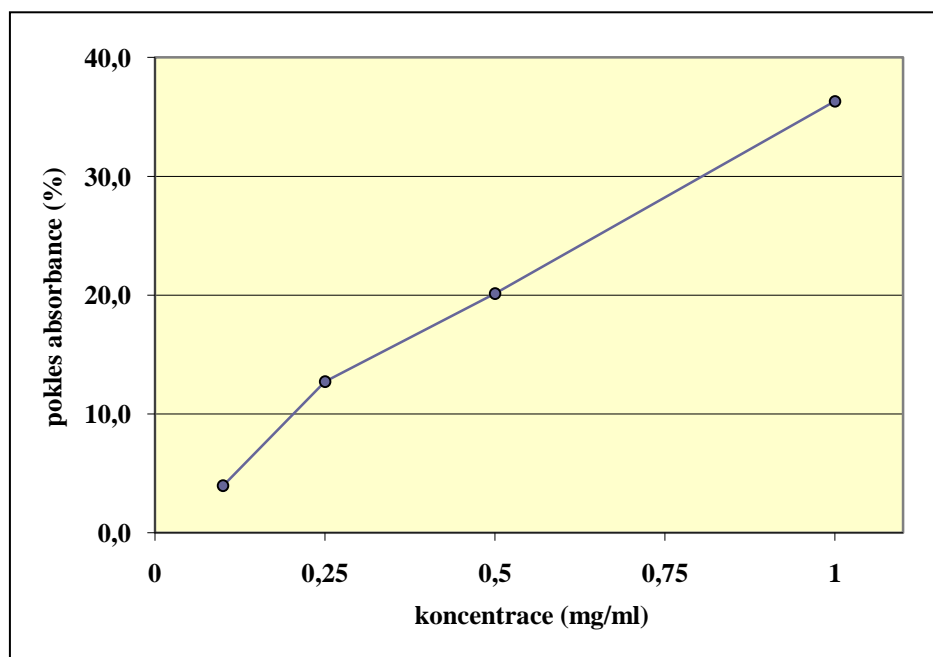
Koncentrace (mg/ml)	1,0	0,5	0,25	0,1
Pokles absorbance (%)	49,75	29,40	17,68	10,26



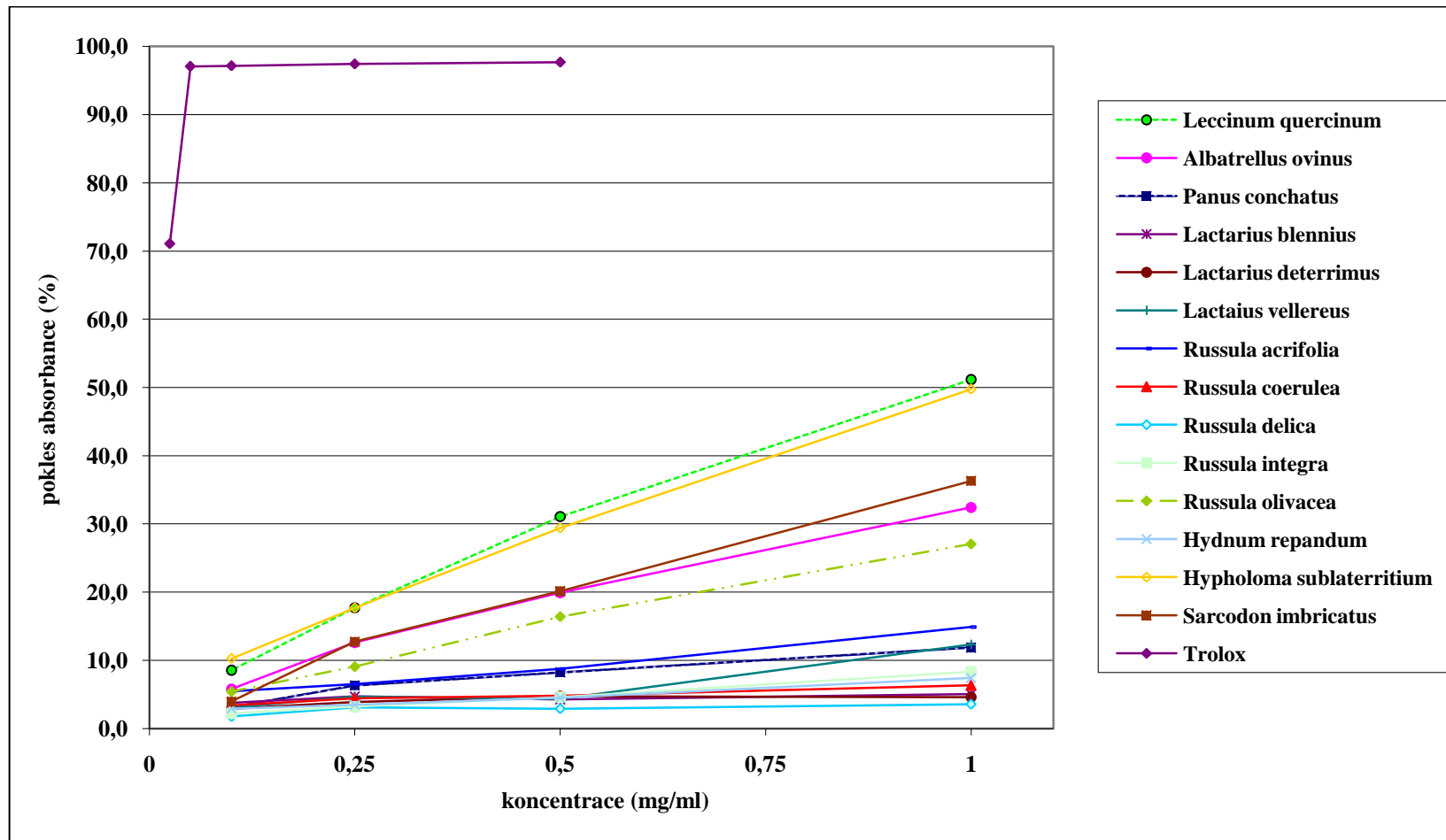
Graf 13 : *Hypholoma sublateritium* – závislost poklesu absorbance na koncentraci

Tab. 15 : *Sarcodon imbricatus*

Koncentrace (mg/ml)	1,0	0,5	0,25	0,1
Pokles absorbance (%)	36,31	20,13	12,72	3,96



Graf 14 : *Sarcodon imbricatus* – závislost poklesu absorbance na koncentraci



Graf 15: Porovnání antioxidačních aktivit sledovaných taxonů a standardu (Trolox)

4. Hodnocení extraktů

4.1. Hodnocení extraktů tenkovrstvou chromatografií

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna vzestupným způsobem ve chromatografických komorách sycených minimálně 60 minut parami elučních soustav.

Adsorbent: 25 TLC aluminium sheets 20 x 20 cm, Silica gel 60 Merck[®]
25 TLC aluminium sheets 20 x 20 cm, Silica gel 60 F₂₅₄ Merck[®]

Dráha: 80 mm

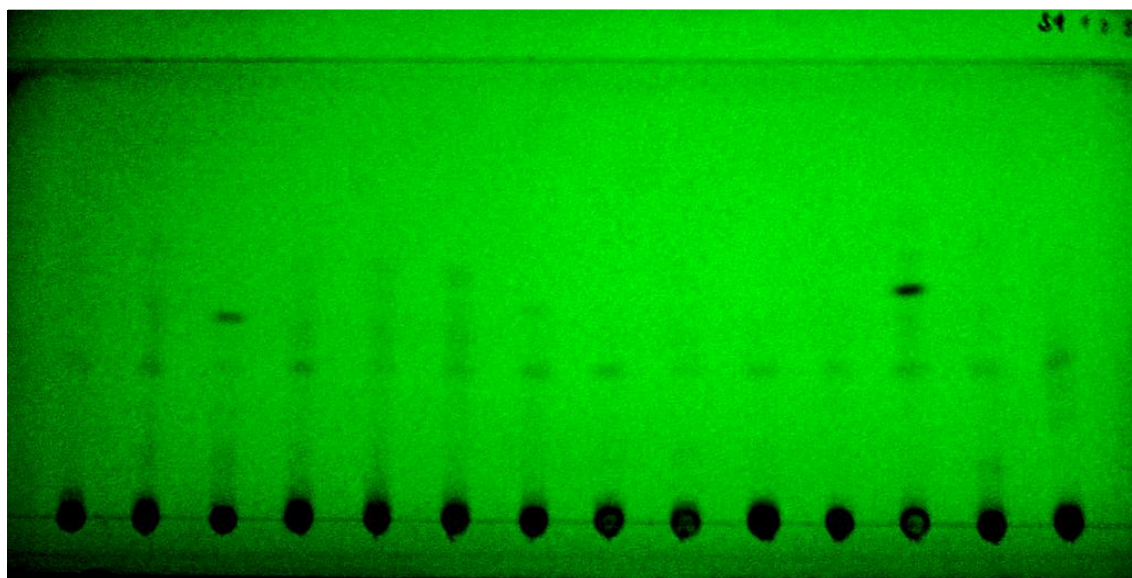
Nanáška: 15 μ l (1,9 cm kapiláry) 50% (methanol/voda) roztoku houbového extraktu
(0,01 g v 1 ml)

Soustavy: S 1: toluen + ethylformiát + kyselina mravenčí
50 : 40 : 10
S 2: propanol + voda
90 : 10

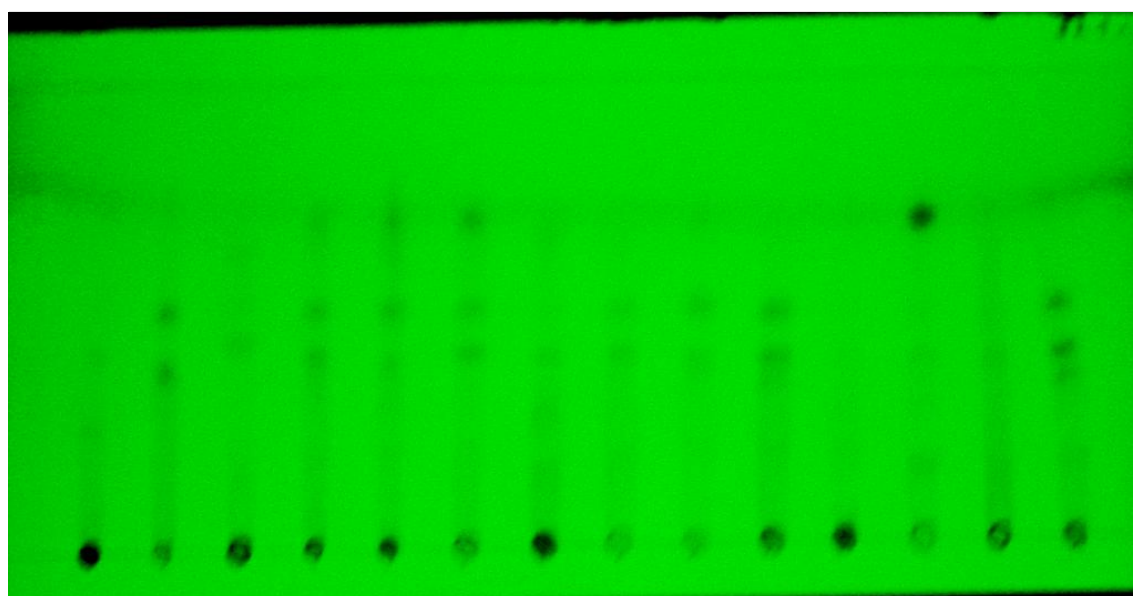
Vyvíjení: 1x

Detekce: D 1 – D 24

Detekce pod UV $\lambda = 254$ nm

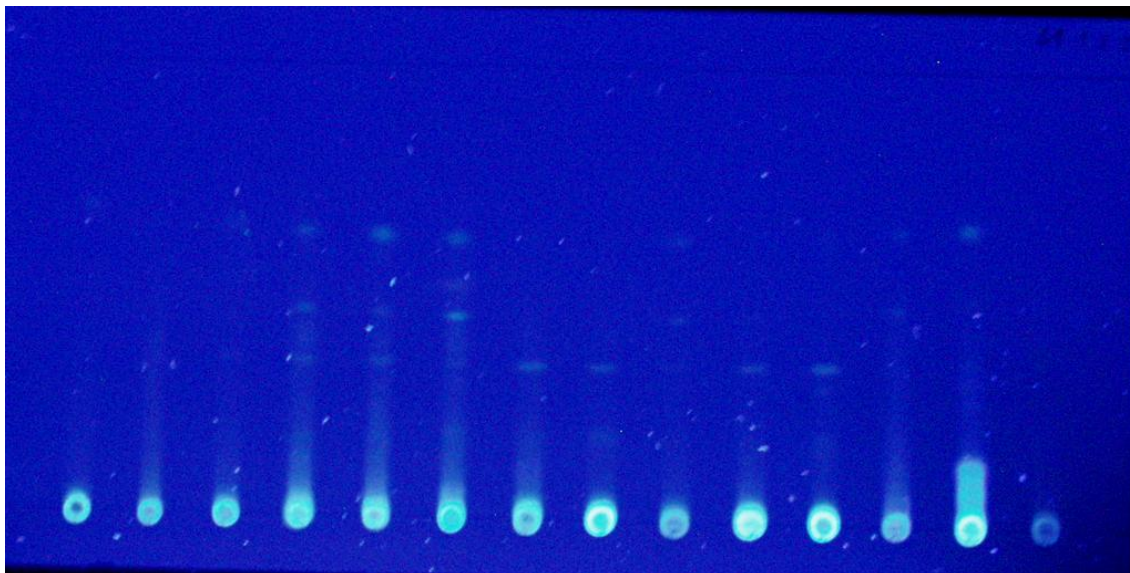


Obr. 20: S 1, D 1

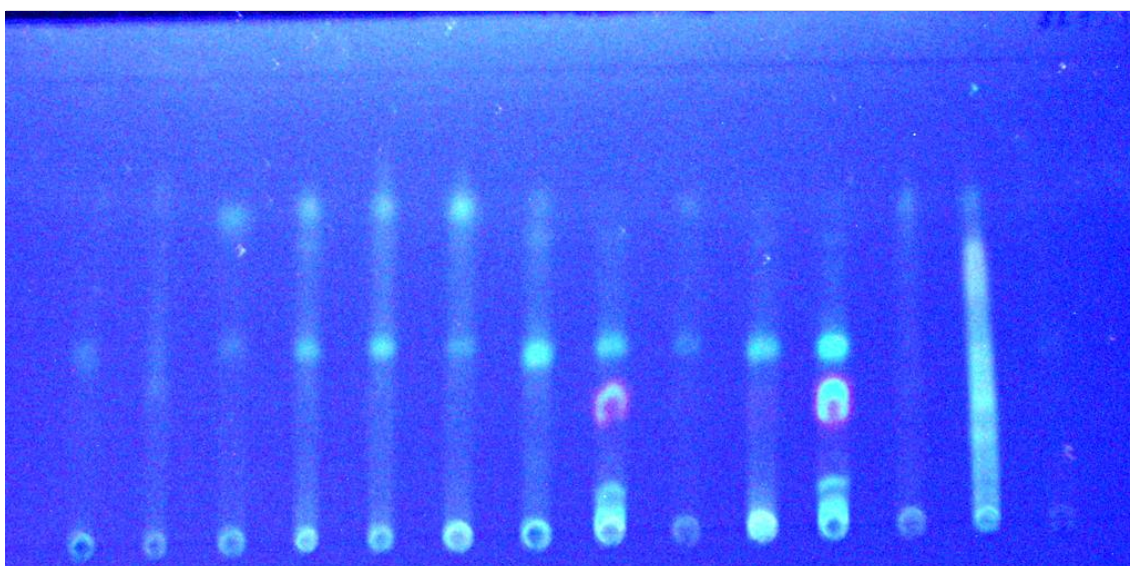


Obr. 21: S 2, D 1

Detekce pod UV $\lambda = 365$ nm

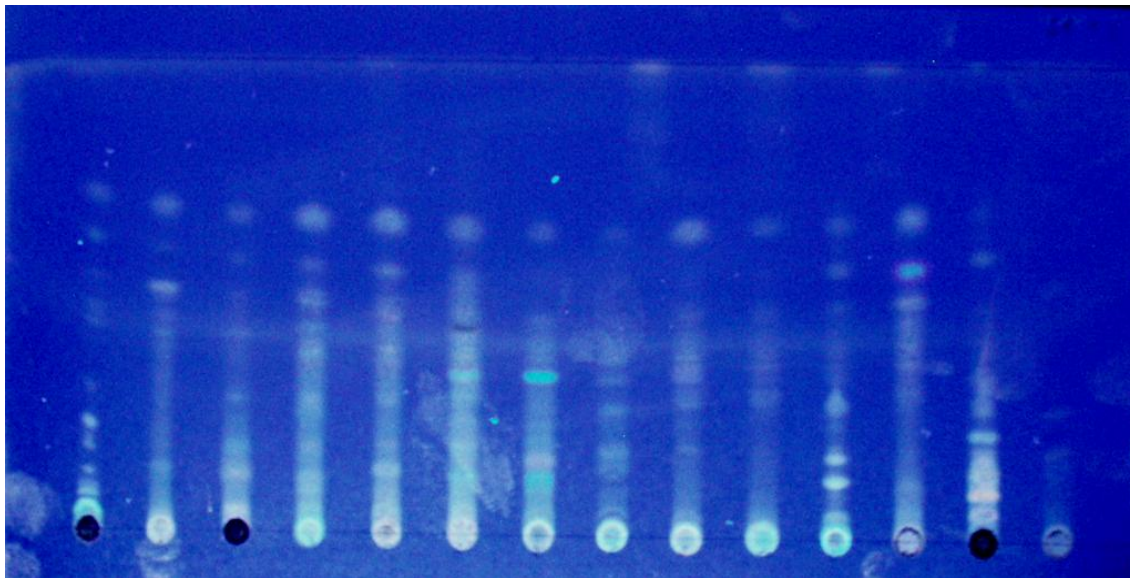


Obr. 22: S 1, D 2

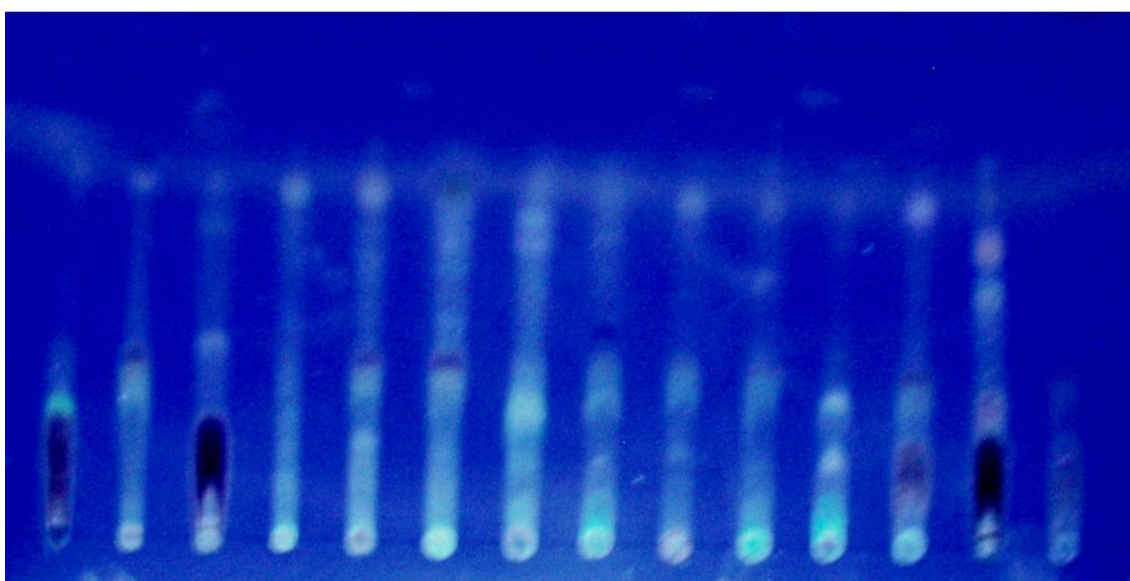


Obr. 23: S 2, D 2

Detekce na steroly, steroidy a triterpenické glykosidy

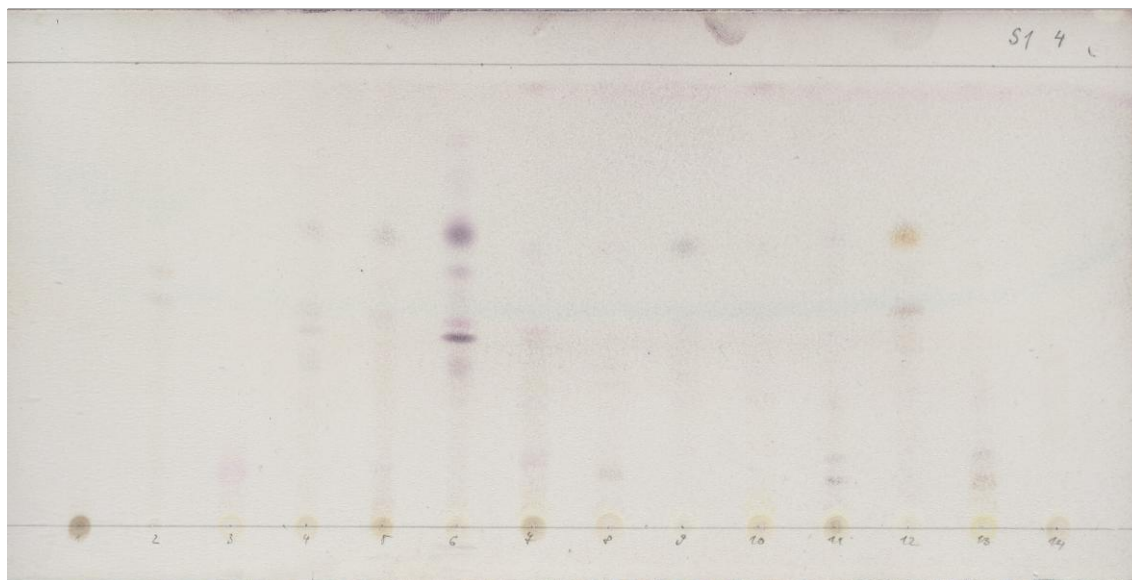


Obr. 24: S 1, D 3

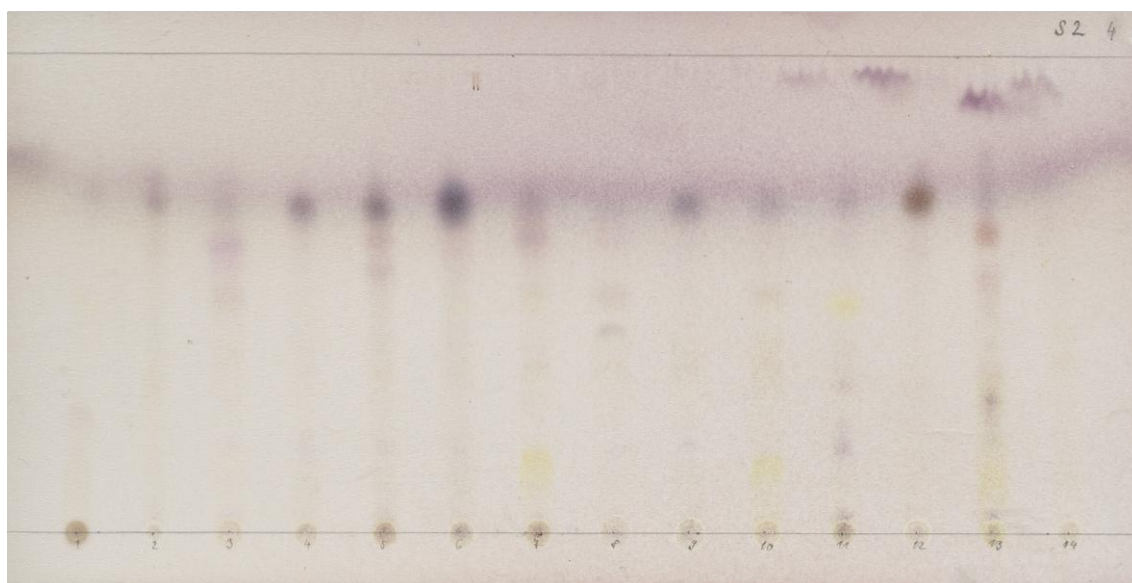


Obr. 25: S 2, D 3

Detekce na cukry, steroidy a terpeny

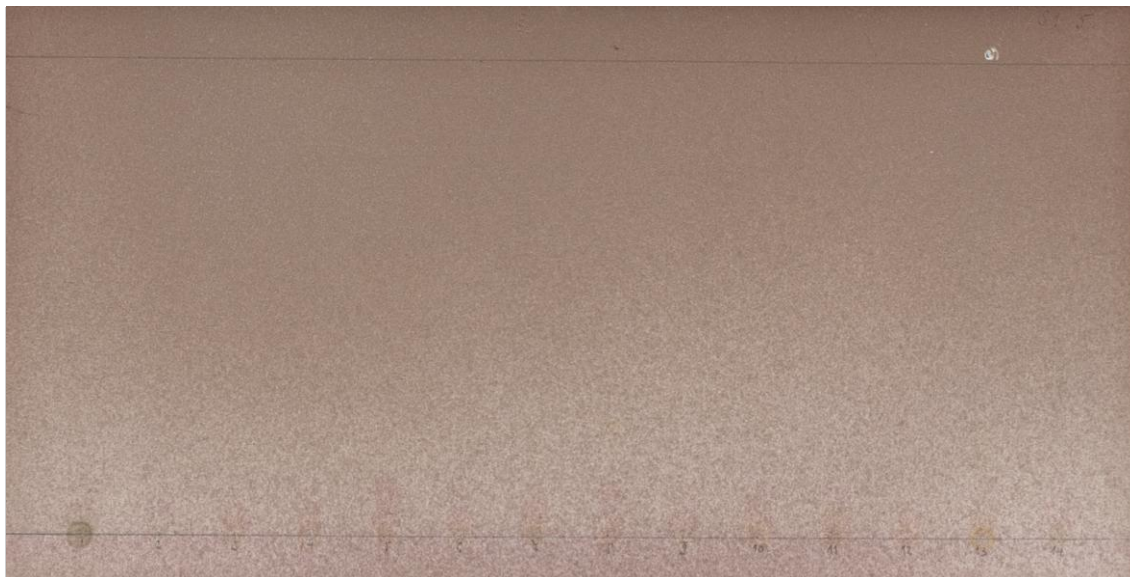


Obr. 26: S 1, D 4



Obr. 27: S 2, D 4

Detekce na fenolické sloučeniny

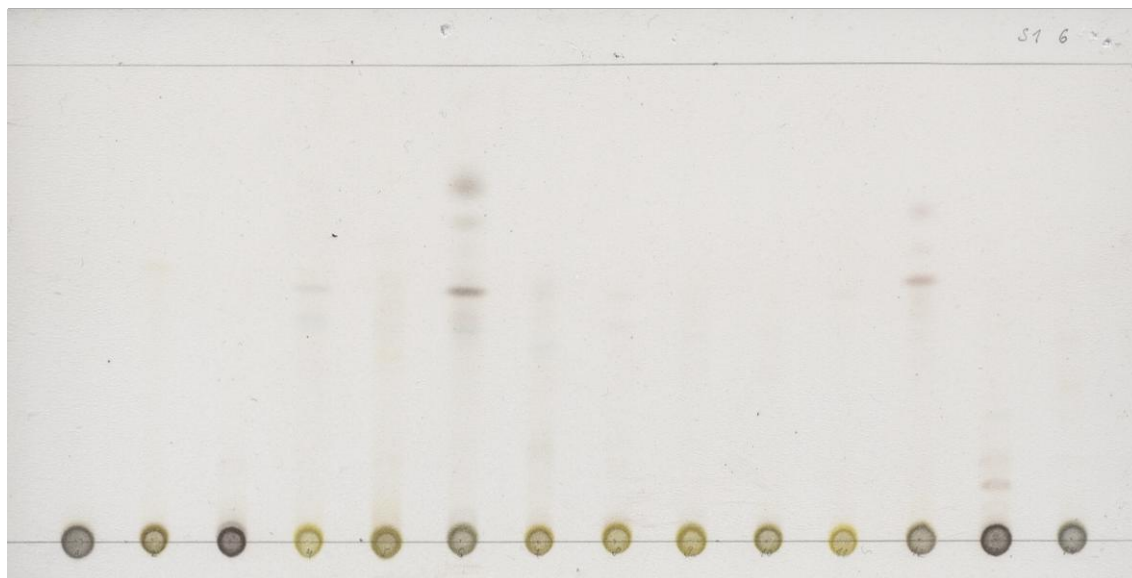


Obr. 28: S 1, D 5

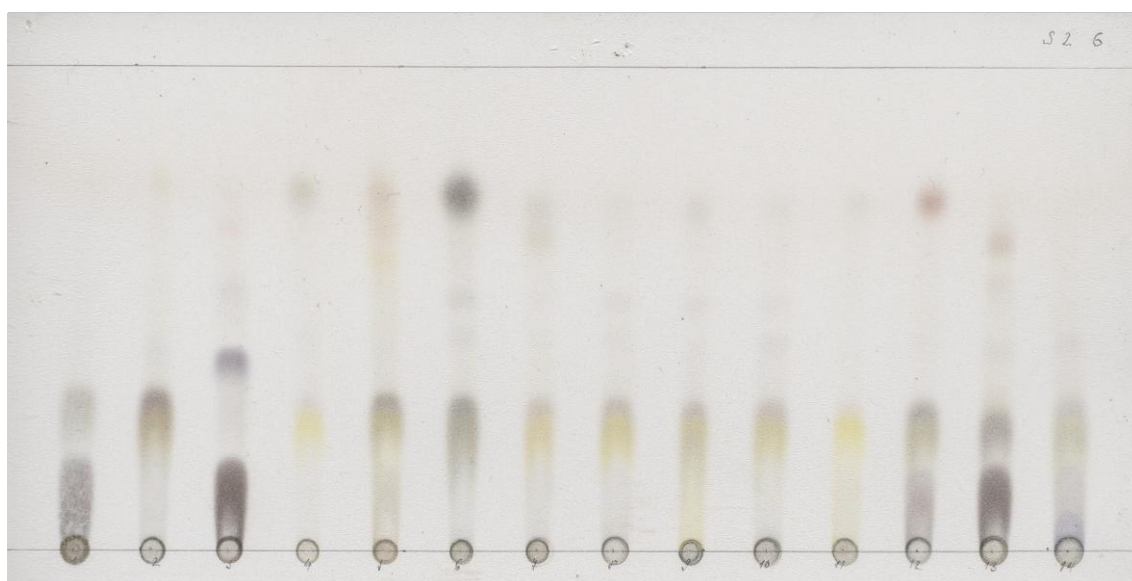


Obr. 29: S 2, D 5

Detekce na cukry

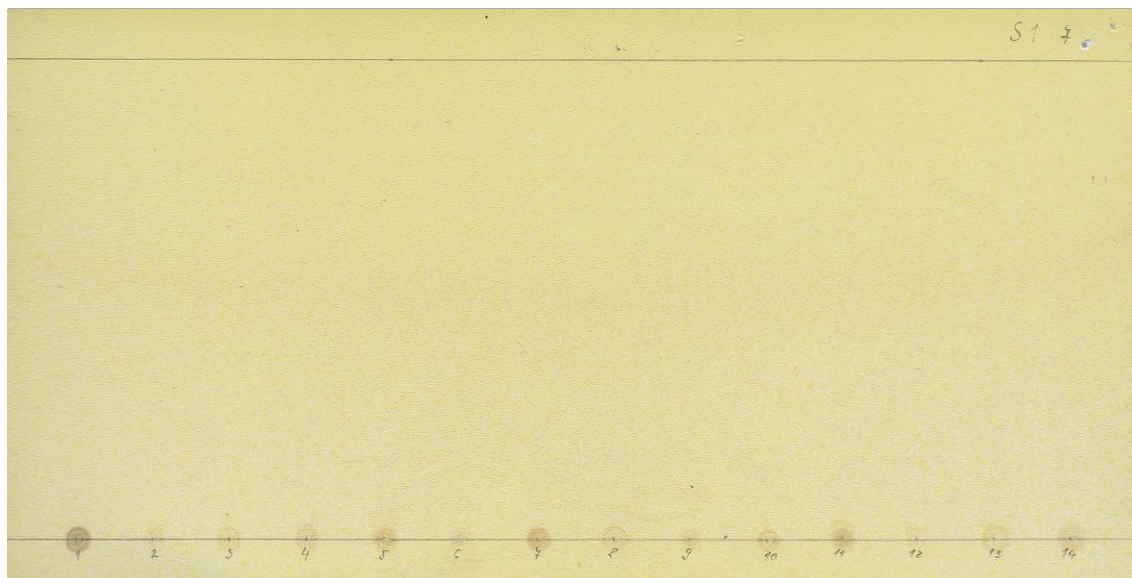


Obr. 30: S 1, D 6

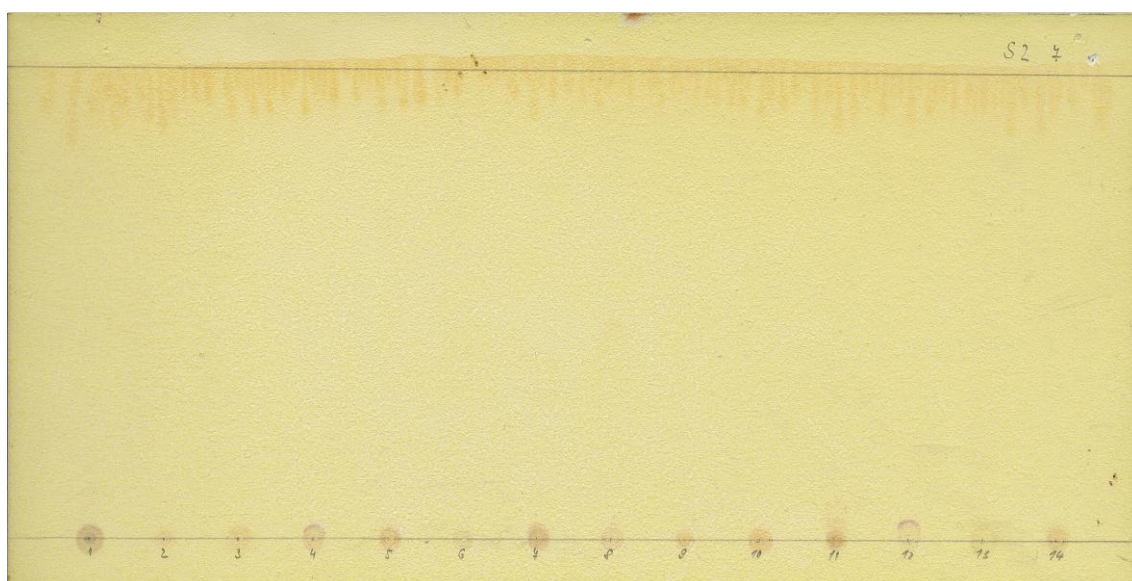


Obr. 31: S 2, D 6

Detekce na alkaloidy

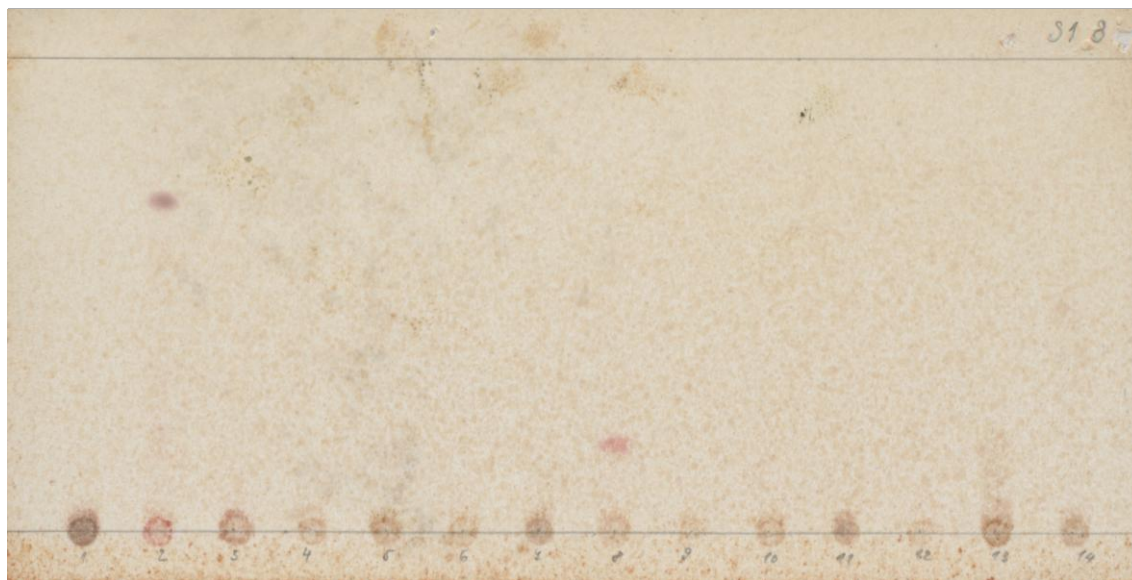


Obr. 32: S 1, D 7

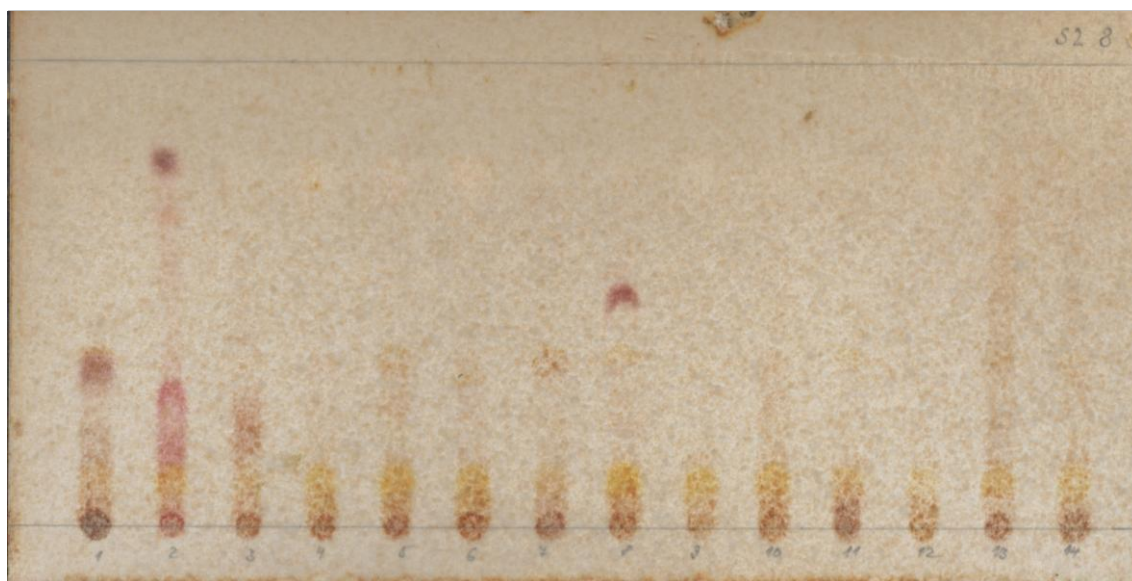


Obr. 33: S 2, D 7

Detekce na fenolické sloučeniny

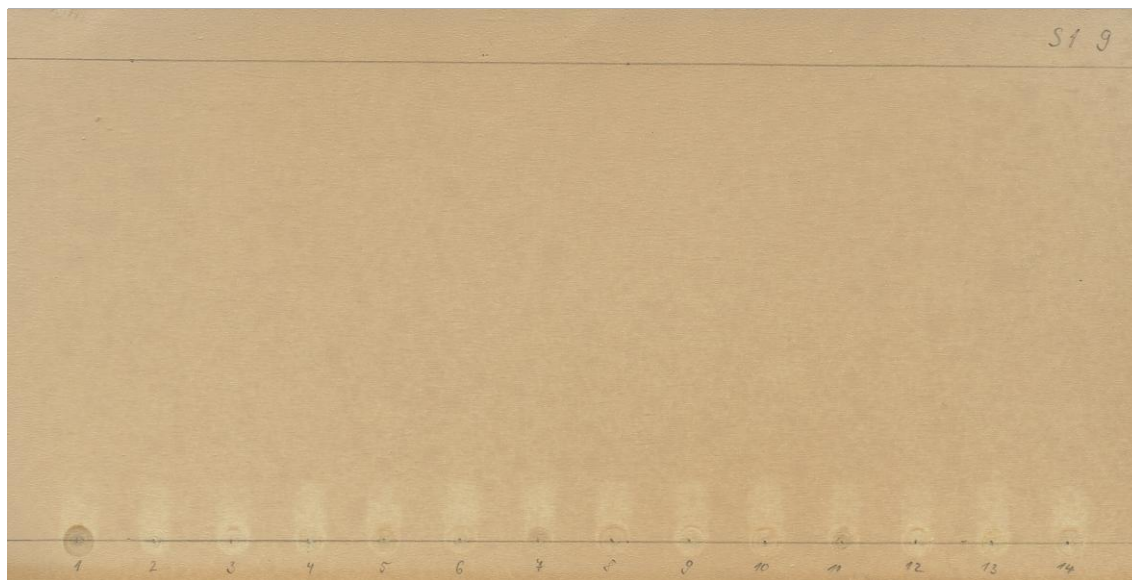


Obr. 34: S 1, D 8

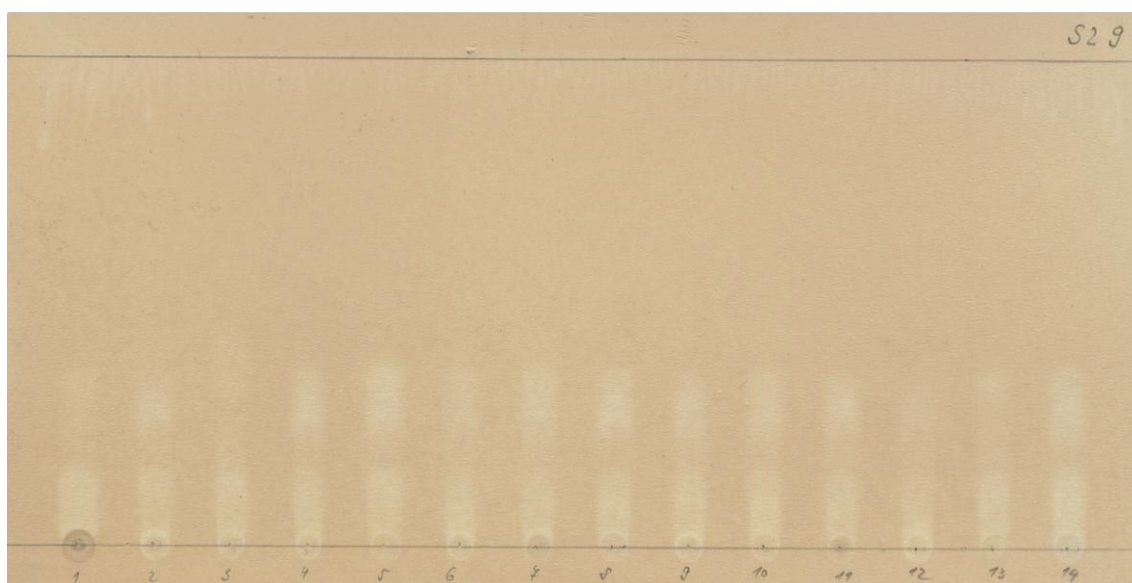


Obr. 35: S 2, D 8

Detekce na karboxylové kyseliny

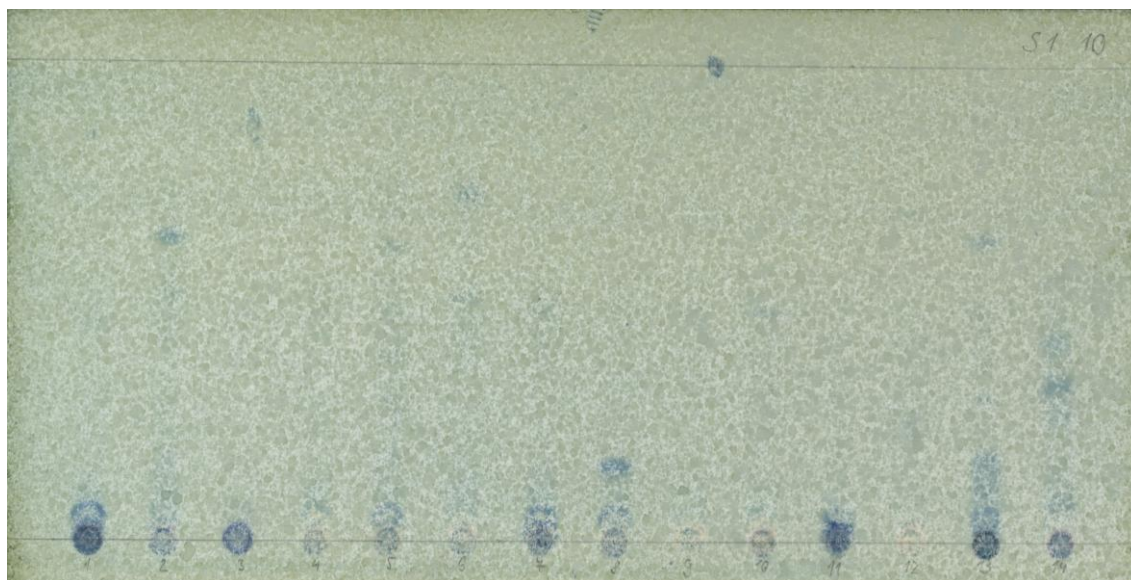


Obr. 36: S 1, D 9

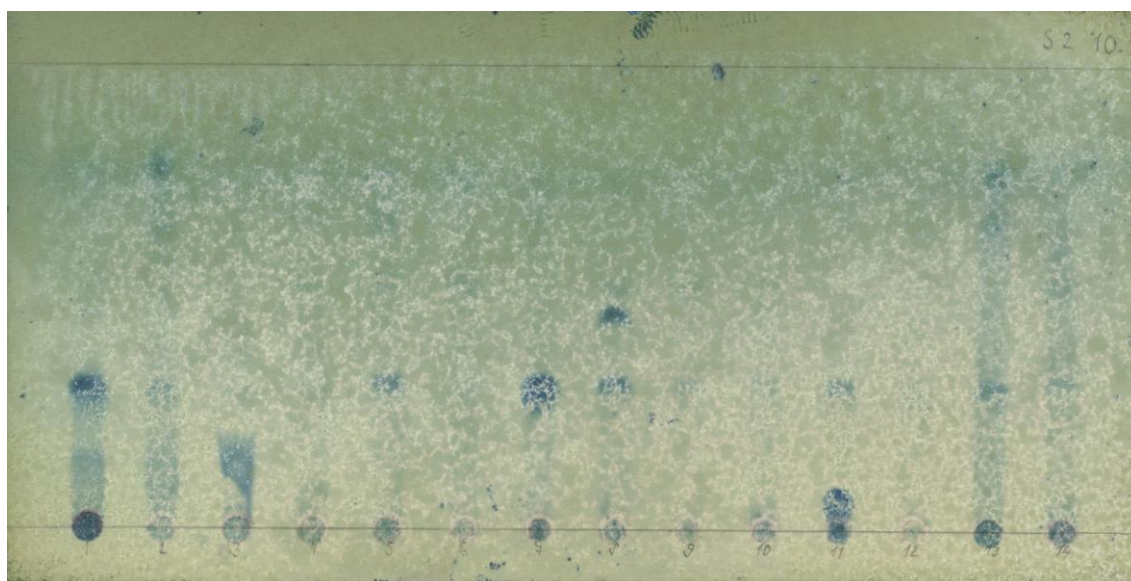


Obr. 37: S 2, D 9

Detekce na redukující látky (např. fenoly, aminy, thiosírany, isothiokyanáty)



Obr. 38: S 1, D 10

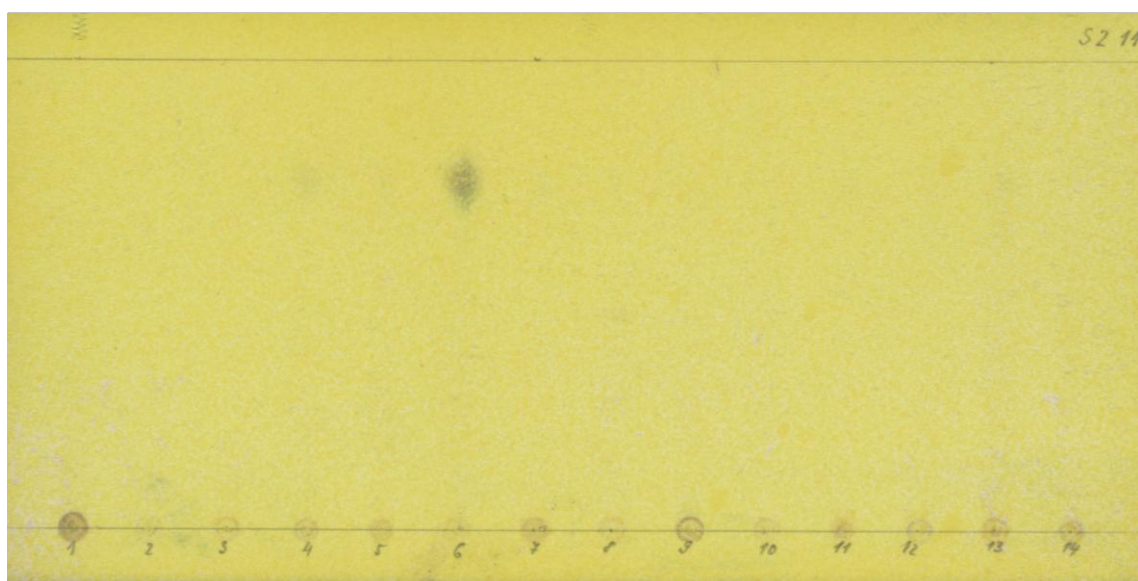


Obr. 39: S 2, D 10

Detekce na laktony

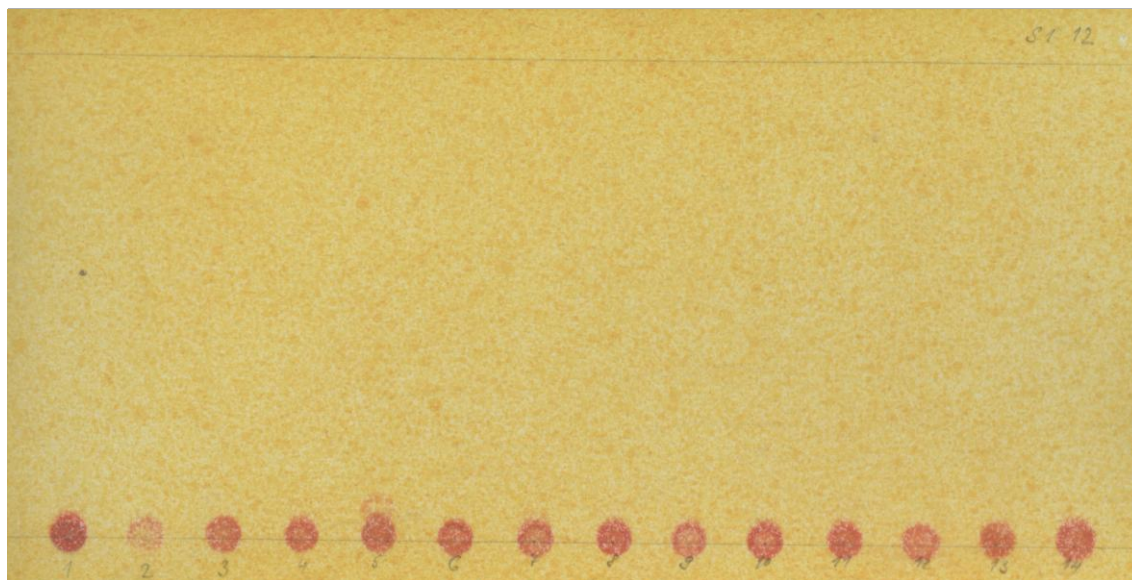


Obr. 40: S 1, D 11

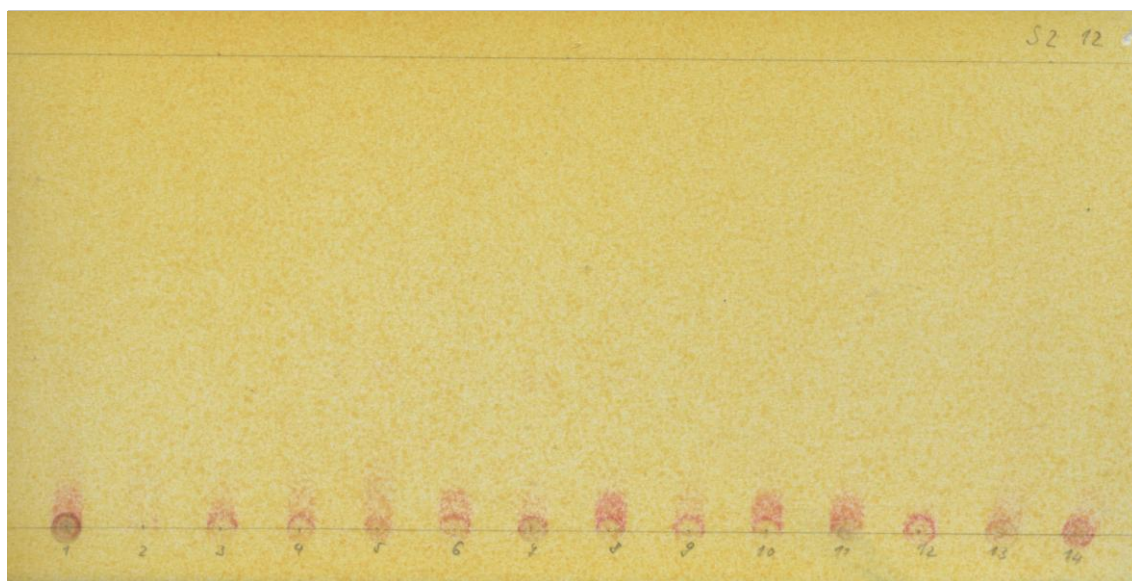


Obr. 41: S 2, D 11

Detekce na aminokyseliny

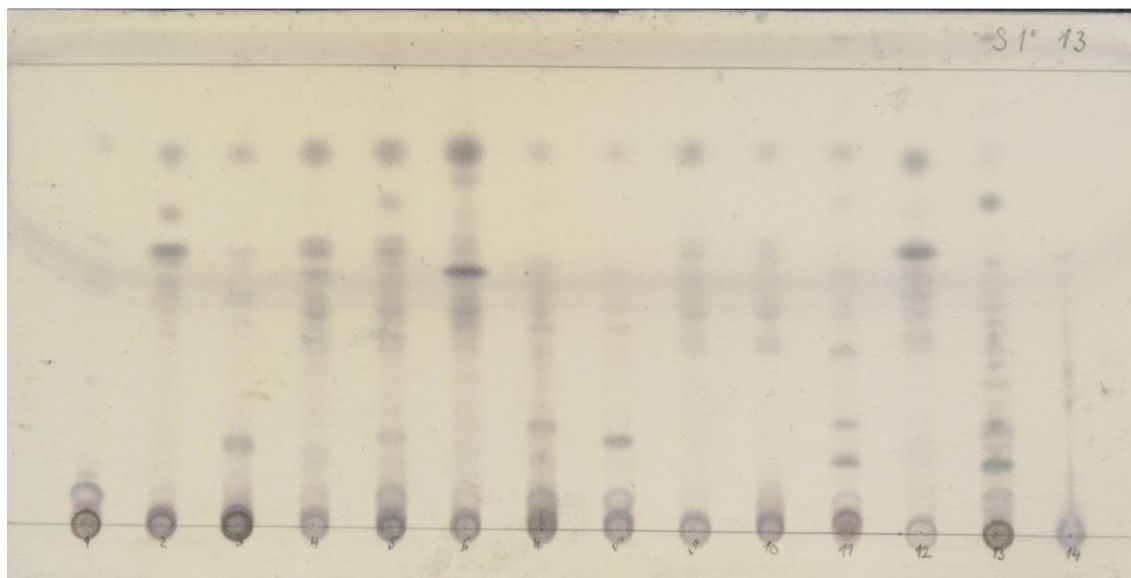


Obr. 42: S 1, D 12

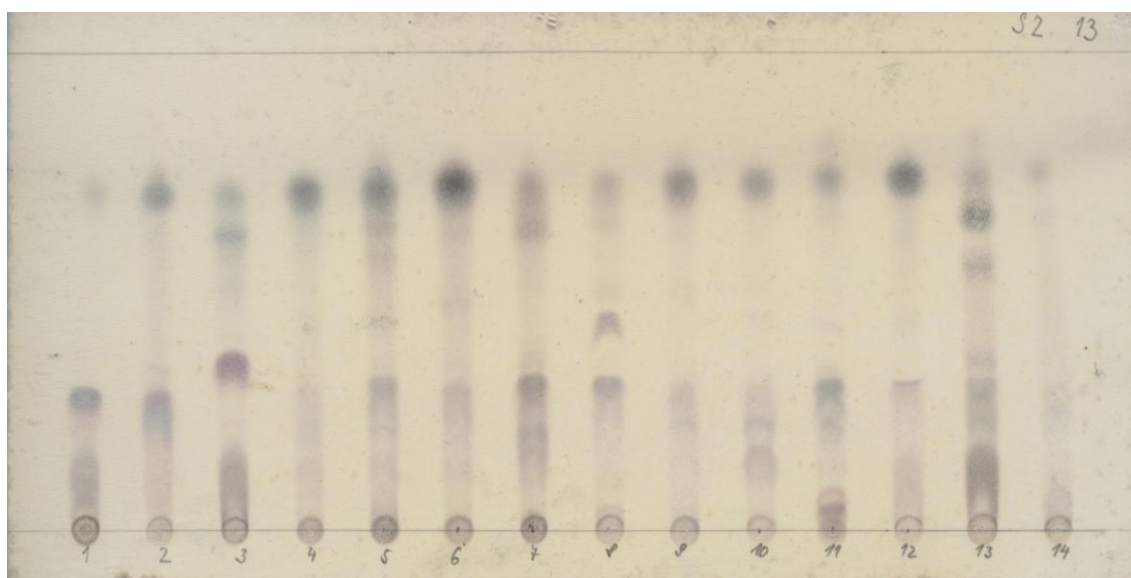


Obr. 43: S 2, D 12

Detekce na steroly

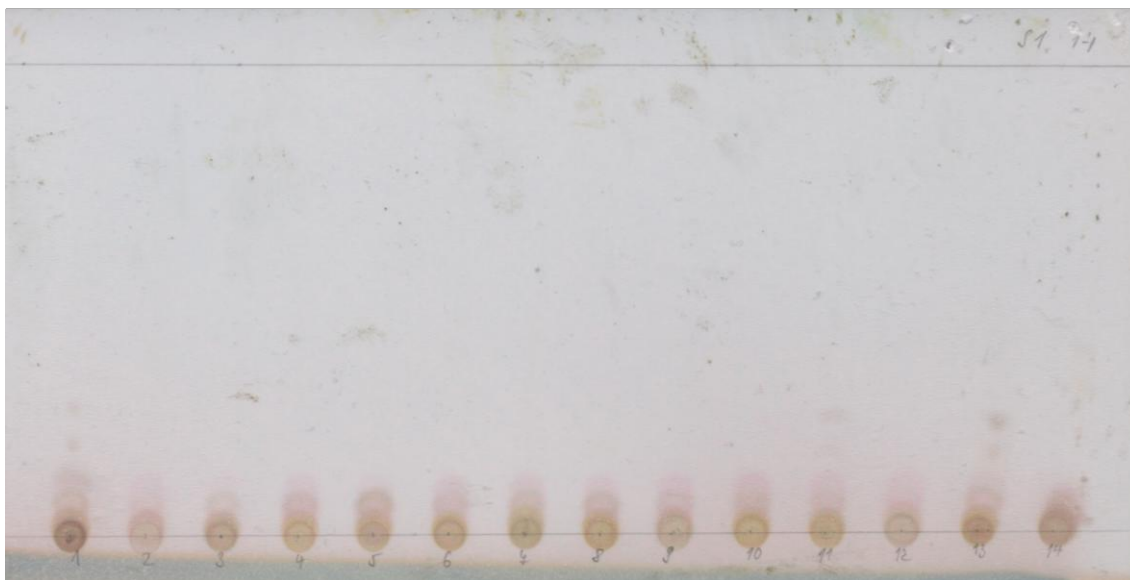


Obr. 44: S 1, D 13

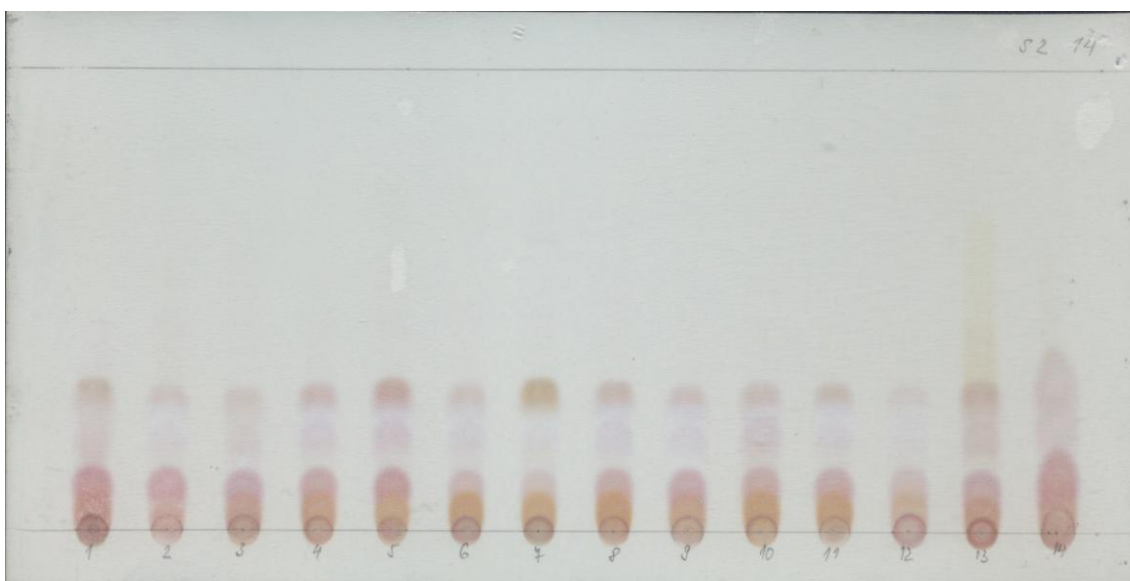


Obr. 45: S 2, D 13

Detekce na aminokyseliny

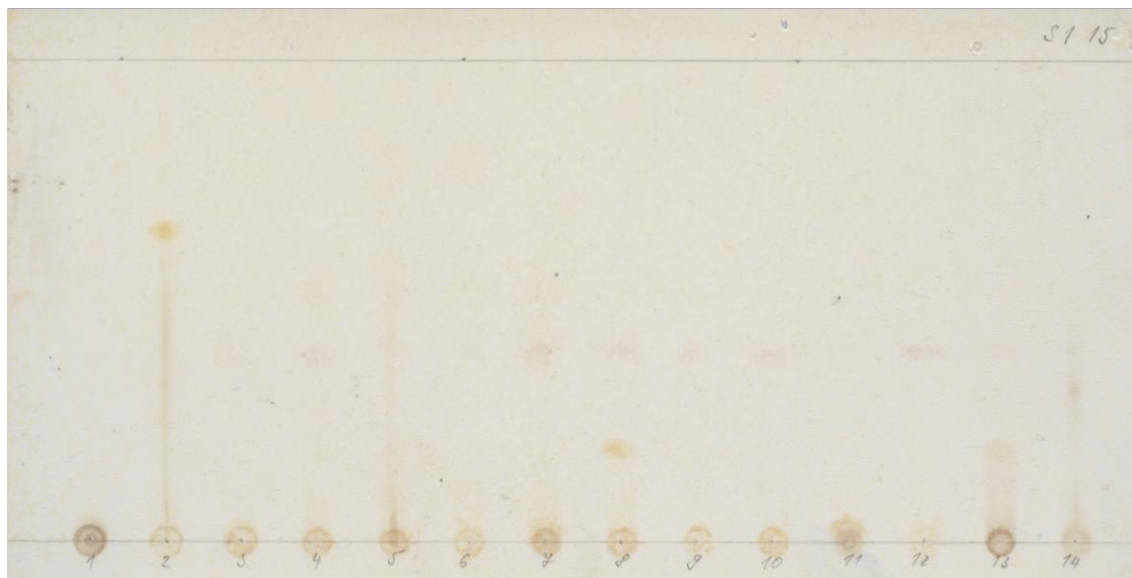


Obr. 46: S 1, D 14



Obr. 47: S 2, D 14

Detekce na fenoly a aminy

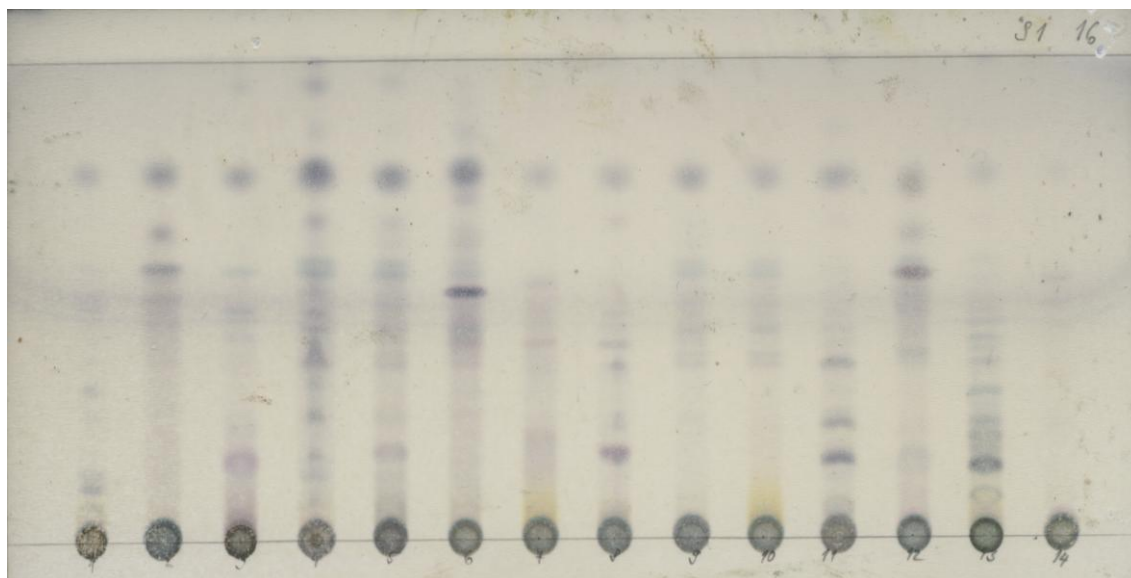


Obr. 48: S 1, D 15

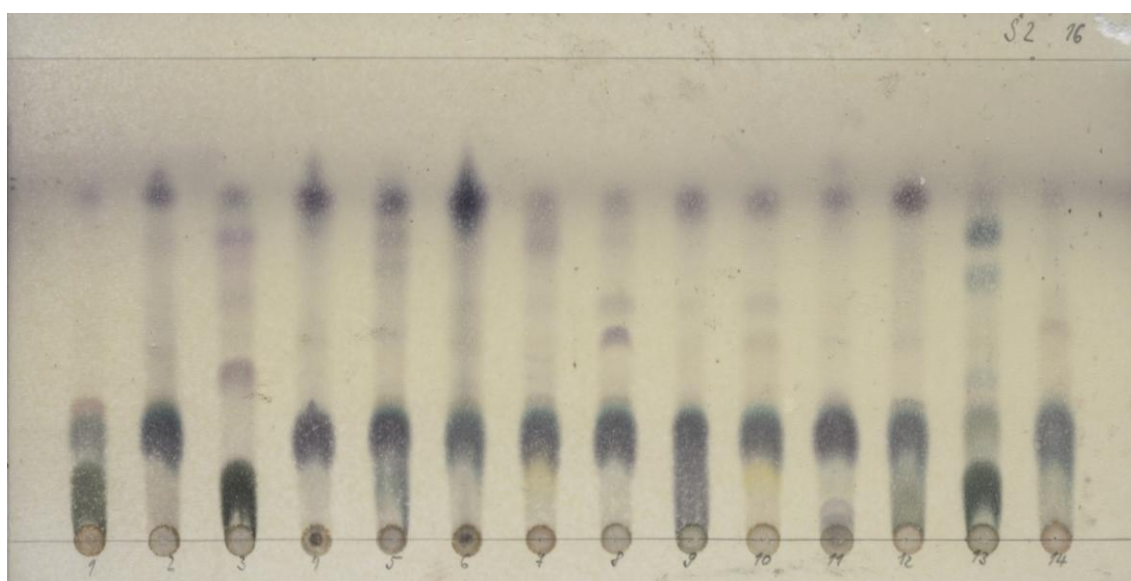


Obr. 49: S 2, D 15

Detekce na fenoly, steroidy, vyšší alkoholy, těkavé látky

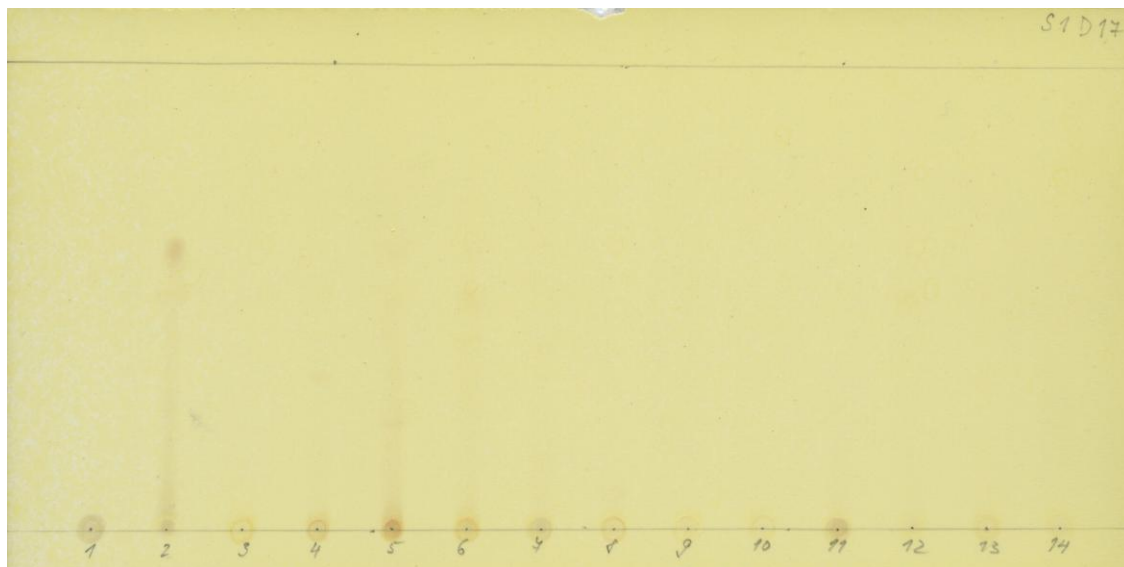


Obr. 50: S 1, D 16

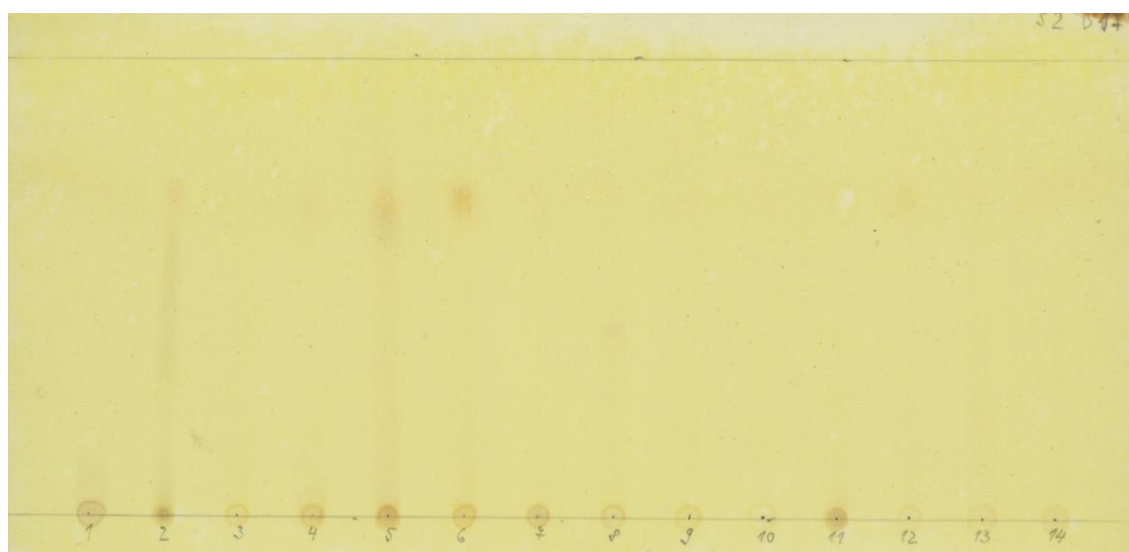


Obr. 51: S 2, D 16

Detekce na volné aldehydy, keto-skupiny a ketózy

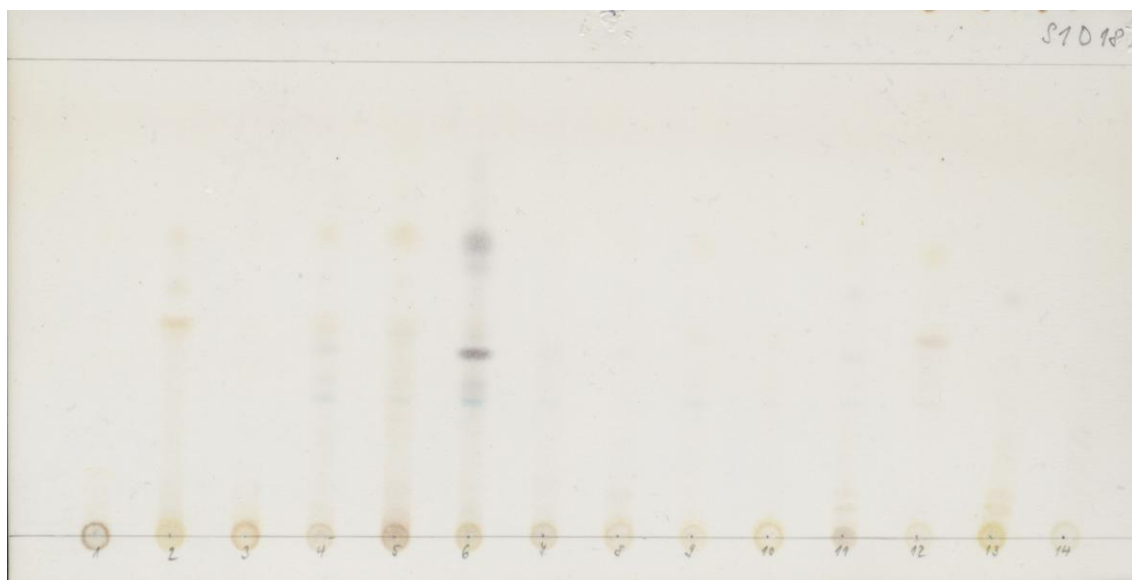


Obr. 52: S 1, D 17

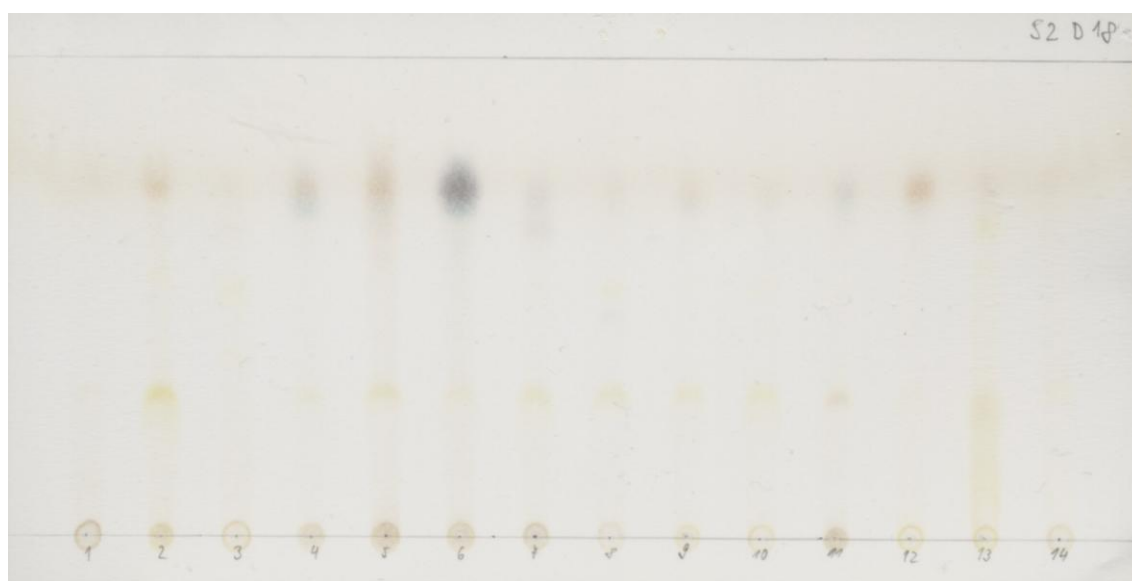


Obr. 53: S 2, D 17

Detekce na ketózy

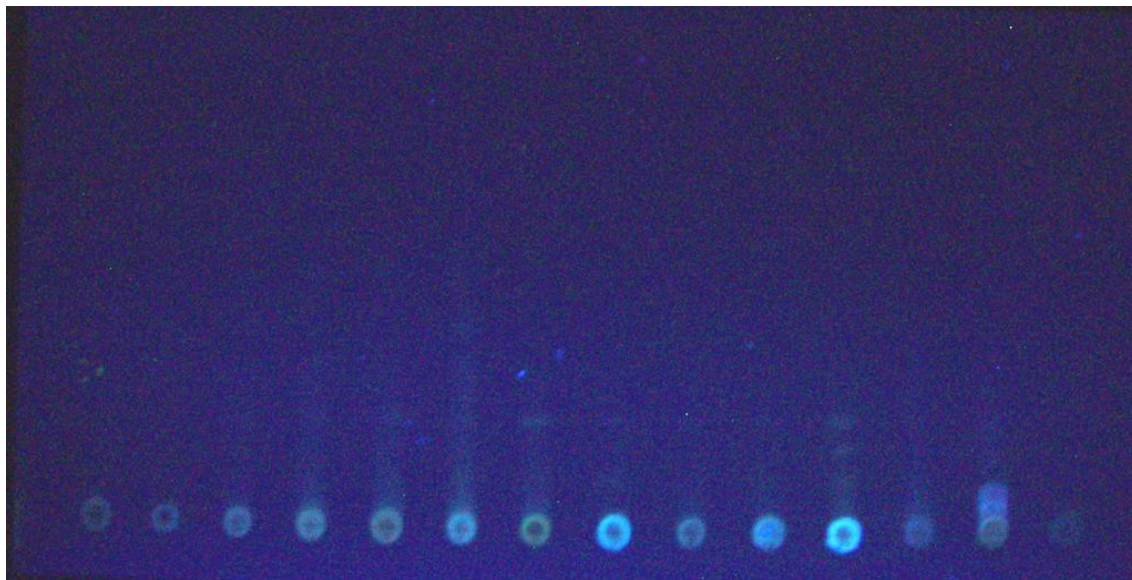


Obr. 54: S 1, D 18

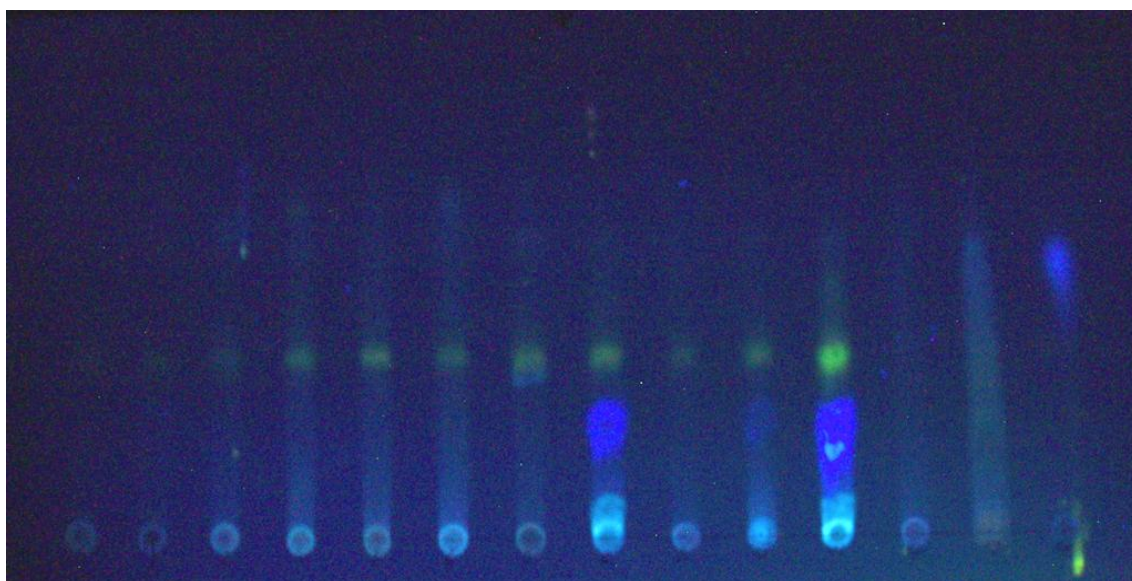


Obr. 55: S 2, D 18

Detekce na organické kyseliny (aromatické)

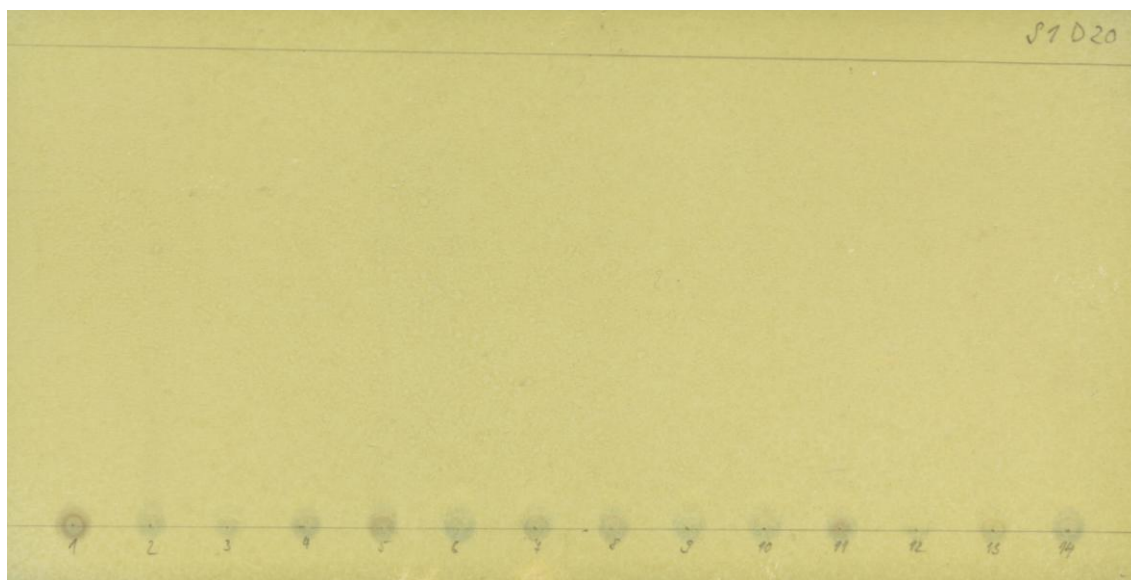


Obr. 56: S 1, D 19

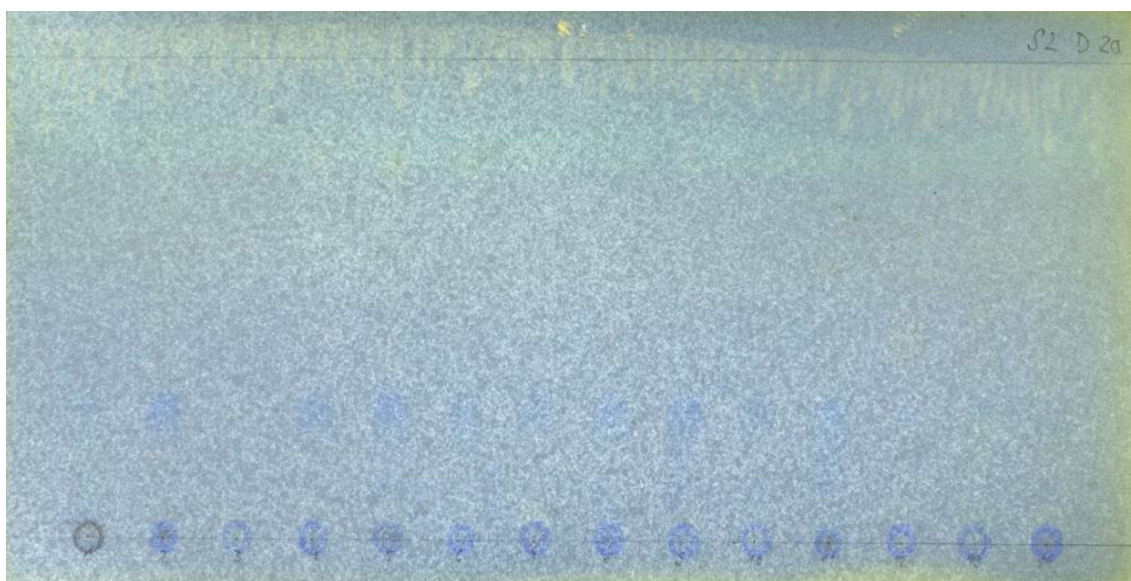


Obr. 57: S 2, D 19

Detekce na organické kyseliny (alifatické)

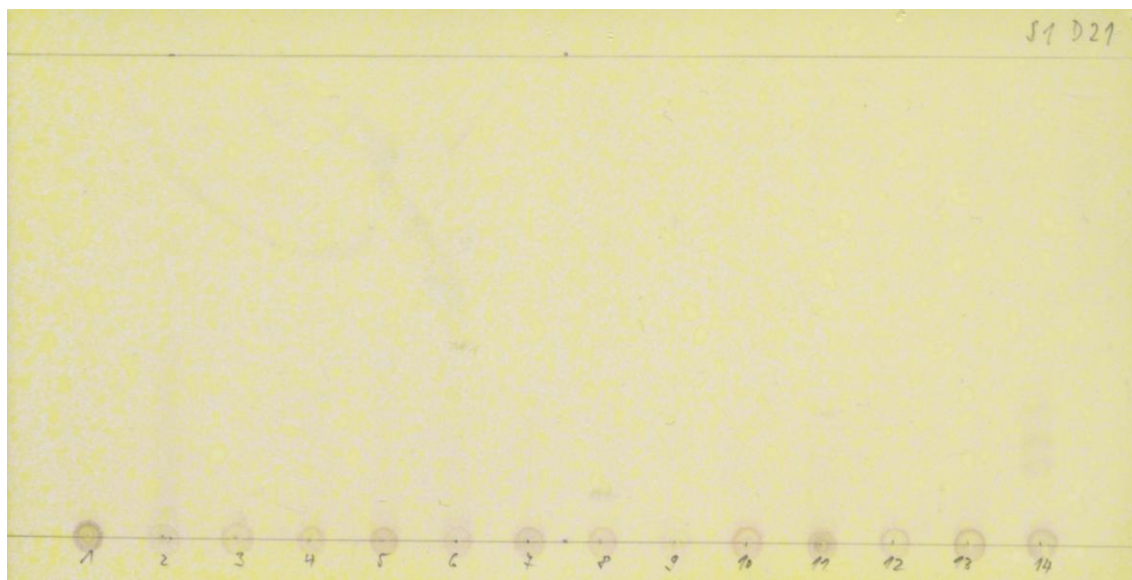


Obr. 58: S 1, D 20

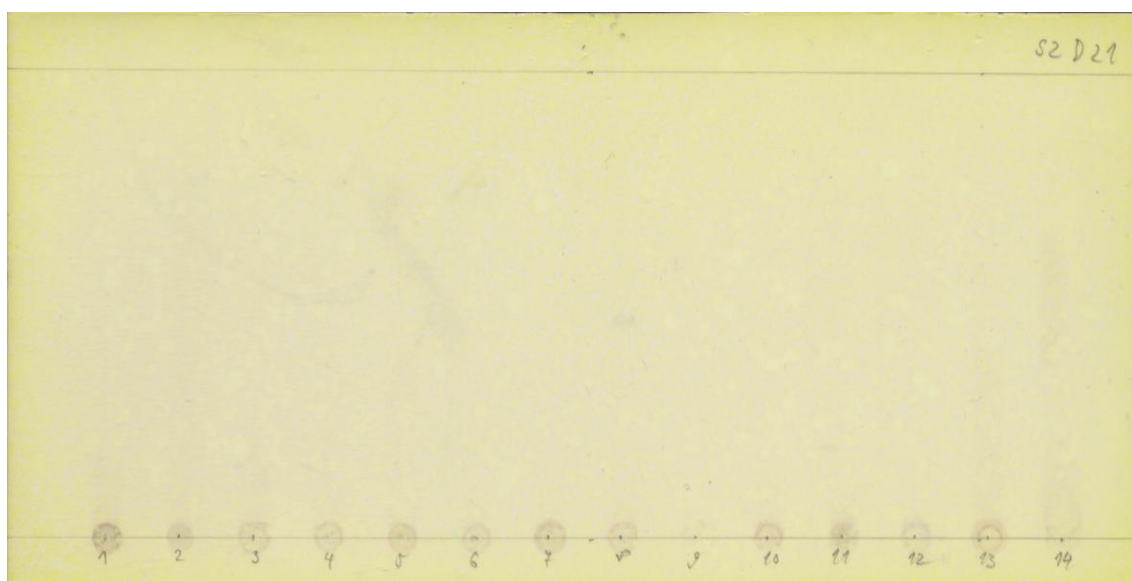


Obr. 59: S 2, D 20

Detekce na fenoly a hydroxámové kyseliny

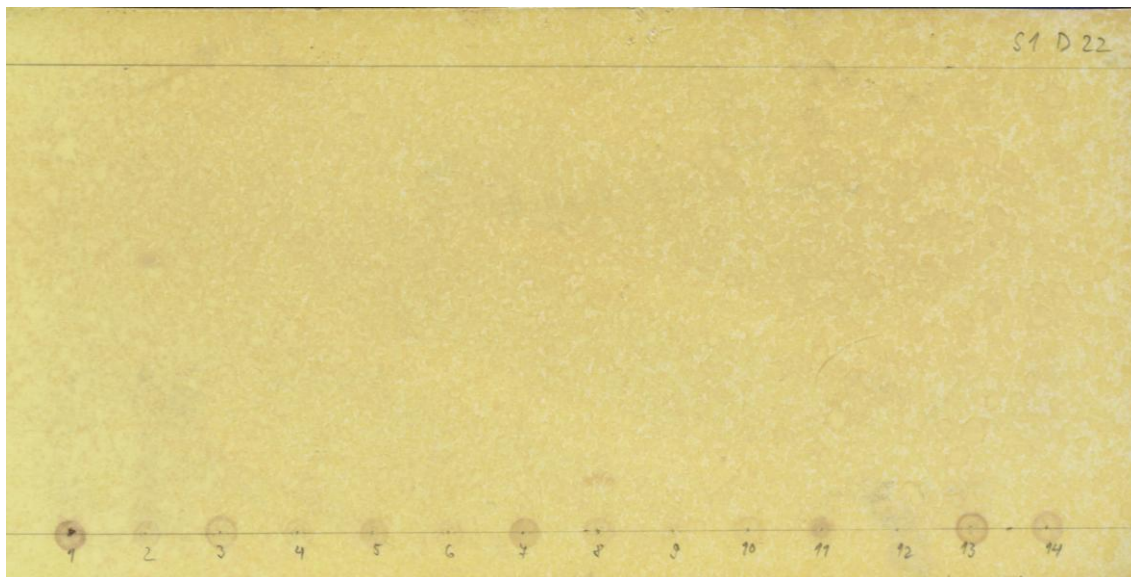


Obr. 60: S 1, D 21

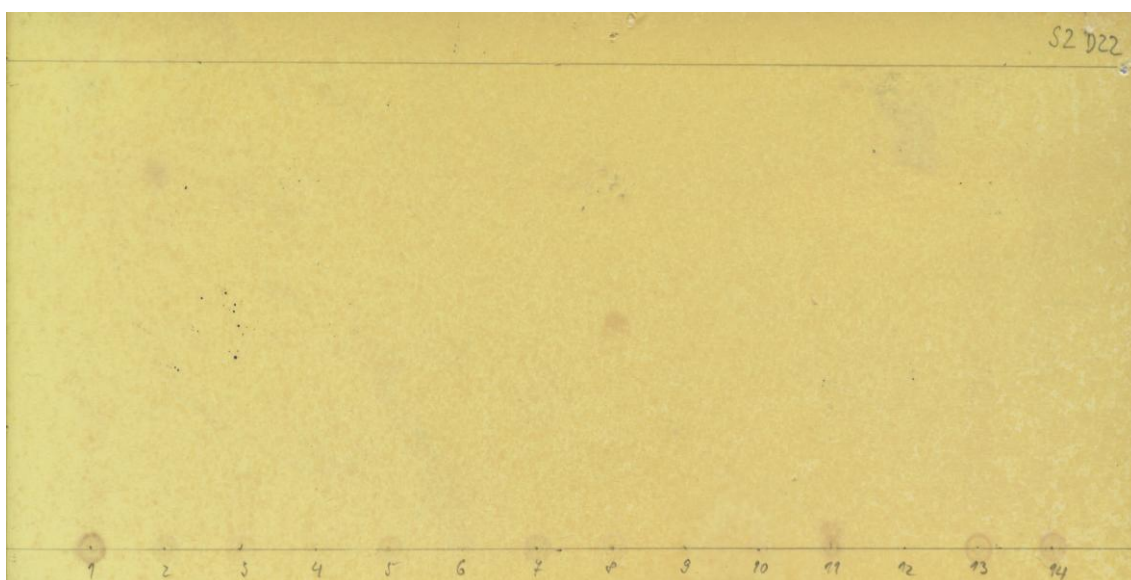


Obr. 61: S 2, D 21

Detekce na fenoly

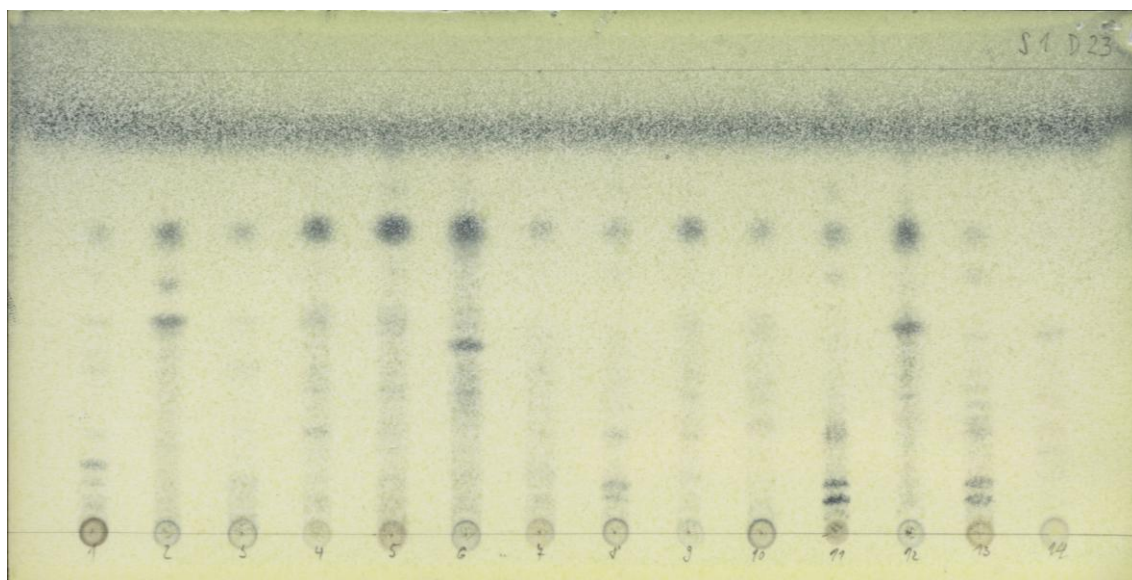


Obr. 62: S 1, D 22

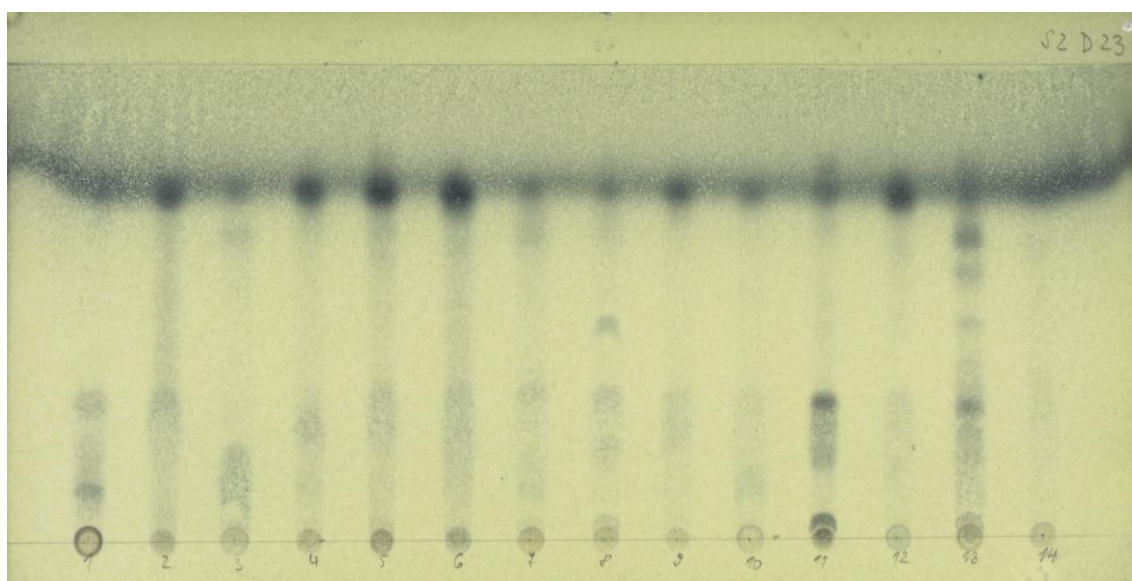


Obr. 63: S 2, D 22

Detekce na steroly a redukující látky

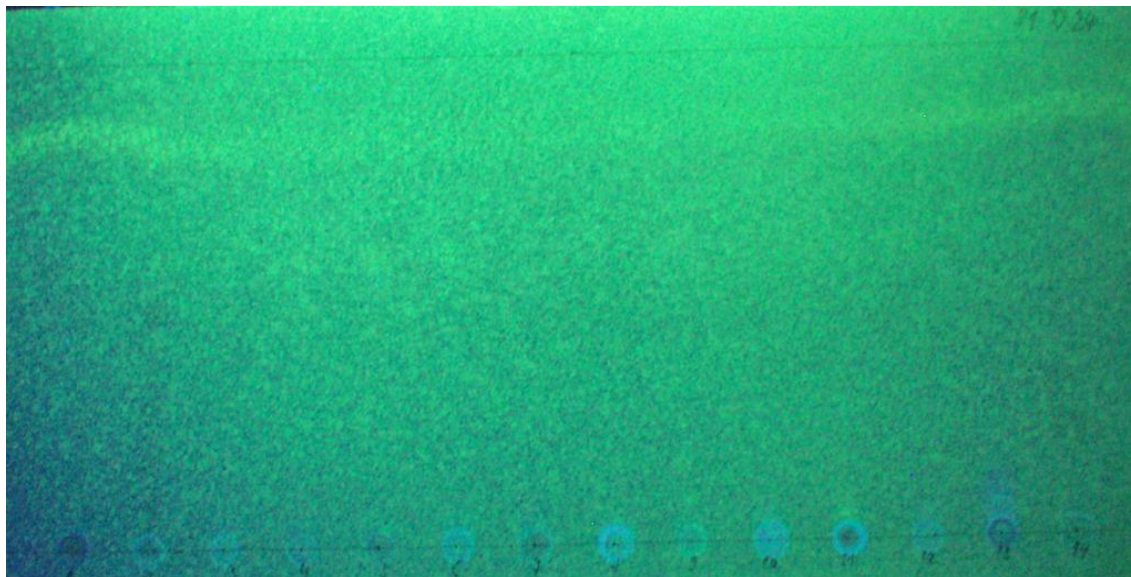


Obr. 64: S 1, D 23

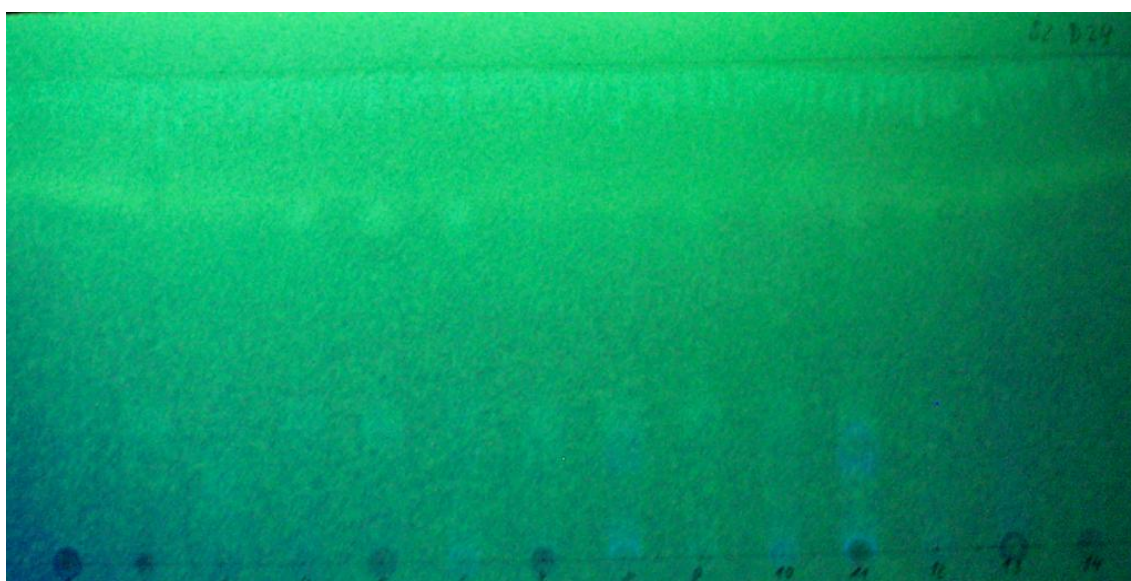


Obr. 65: S 2, D 23

Detekce na tuky



Obr. 66: S 1, D 24



Obr. 67: S 2, D 24

4.2. Vyhodnocení reakcí na detekce D 1 – D 24

Vysvětlivky k tabulkám č.16 – 19

ST + pozitivní reakce při detekci na startu

ST 0 nebyla pozorována pozitivní reakce na detekci na startu

X + počet pozitivních reakcí na detekci na dráze ($X = 1, 2, 3 \dots$)

0 žádná pozitivní reakce na detekci na dráze

Tab. 16: Pozitívni reakce na detekce u sledovaných taxonů

Číslo taxonu	Taxon	D1, S1	D1, S2	D2, S1	D2, S2	D12, S1	D12, S2	D14, S1	D14, S2	D8, S1	D8, S2	D15, S1	D15, S2
1.	<i>Leccinum quercinum</i>	ST+,2+	ST+,0	ST+,0	ST+,1+	ST+,0	ST+,1+	ST+,5+	ST+,4+	ST+,0	ST+,3+	ST+,0	ST+,0
2.	<i>Albatrellus ovinus</i>	ST+,1+	ST+,2+	ST+,0	ST+,2+	ST+,0	ST0,0	ST+,2+	ST+,3+	ST+,1+	ST+,4+	ST+,1+	ST0,1+
3.	<i>Panus conchatus</i>	ST+,1+	ST+,1+	ST+,0	ST+,2+	ST+,0	ST+,0	ST+,2+	ST+,4+	ST+,0	ST+,2+	ST+,0	ST+,0
4.	<i>Lactarius blennius</i>	ST+,1+	ST+,3+	ST+,3+	ST+,2+	ST+,0	ST+,1+	ST+,3+	ST+,4+	ST+,0	ST+,2+	ST+,1+	ST+,0
5.	<i>Lactarius deterrimus</i>	ST+,1+	ST+,3+	ST+,3+	ST+,2+	ST+,1+	ST+,1+	ST+,2+	ST+,4+	ST+,0	ST+,3+	ST+,0	ST+,0
6.	<i>Lactarius vellereus</i>	ST+,2+	ST+,3+	ST+,3+	ST+,2+	ST+,0	ST+,1+	ST+,3+	ST+,4+	ST+,0	ST+,3+	ST+,1+	ST+,0
7.	<i>Russula acrifolia</i>	ST+,2+	ST+,1+	ST+,1+	ST+,1+	ST+,0	ST+,1+	ST+,3+	ST+,3+	ST+,0	ST+,3+	ST+,1+	ST+,1+
8.	<i>Russula coerulea</i>	ST+,1+	ST+,2+	ST+,1+	ST+,4+	ST+,0	ST+,1+	ST+,3+	ST+,4+	ST+,1+	ST+,4+	ST+,2+	ST+,1+
9.	<i>Russula delica</i>	ST+,1+	ST+,2+	ST+,2+	ST+,1+	ST+,0	ST+,1+	ST+,2+	ST+,4+	ST0,0	ST+,2+	ST+,1+	ST+,0
10.	<i>Russula integra</i>	ST+,1+	ST+,2+	ST+,1+	ST+,2+	ST+,0	ST+,1+	ST+,3+	ST+,4+	ST+,0	ST+,3+	ST+,1+	ST+,0
11.	<i>Russula olivacea</i>	ST+,1+	ST+,0	ST+,1+	ST+,4+	ST+,0	ST+,1+	ST+,4+	ST+,4+	ST+,0	ST+,3+	ST+,1+	ST+,1+
12.	<i>Hydnum repandum</i>	ST+,2+	ST+,1+	ST+,2+	ST+,0	ST+,0	ST+,0	ST+,2+	ST+,3+	ST+,0	ST+,2+	ST0,1+	ST0,0
13.	<i>Hypholoma sublateritium</i>	ST+,2+	ST+,0	ST+,1+	ST+,1+	ST+,0	ST+,1+	ST+,4+	ST+,4+	ST+,1+	ST+,2+	ST+,1+	ST+,0
14.	<i>Sarcodon imbricatus</i>	ST+,1+	ST+,3+	ST+,0	ST+,0	ST+,0	ST+,1+	ST+,2+	ST+,2+	ST+,0	ST+,2+	ST+,1+	ST+,0
Detekovatelné skupiny		UV λ = 254 nm	UV λ = 254 nm	UV λ = 365 nm	UV λ = 365 nm	Aminokyseliny	Aminokyseliny	Aminokyseliny	Aminokyseliny	Fenoly, Aminy	Fenoly, Aminy	Fenoly, Aminy	Fenoly, Aminy

Tab. 17: Pozitivní reakce na detekce u sledovaných taxonů

Číslo taxonu	Taxon	D21, S1	D21, S2	D22, S1	D22, S2	D5, S1	D5, S2	D10, S1	D10, S2	D9, S1	D9, S2	D11, S1	D11, S2
1.	<i>Leccinum quercinum</i>	ST+,0	ST+,0	ST+,0	ST+,0	ST+,0	ST+,2+	ST+,1+	ST+,2+	ST+,0	ST+,0	ST+,0	ST+,0
2.	<i>Albatrellus ovinus</i>	ST0,0	ST+,0	ST0,1+	ST+,1+	ST0,1+	ST0,1+	ST+,1+	ST+,3+	ST0,0	ST0,0	ST+,0	ST0,0
3.	<i>Panus conchatus</i>	ST+,0	ST+,0	ST0,0	ST+,0	ST+,1+	ST+,1+	ST+,0	ST+,1+	ST0,0	ST0,0	ST+,0	ST+,0
4.	<i>Lactarius blennius</i>	ST+,0	ST+,0	ST0,0	ST0,0	ST+,1+	ST+,1+	ST+,1+	ST+,0	ST0,0	ST0,0	ST0,0	ST+,0
5.	<i>Lactarius deterrimus</i>	ST+,0	ST+,0	ST0,0	ST+,0	ST+,1+	ST+,2+	ST+,2+	ST+,1+	ST0,0	ST0,0	ST+,0	ST+,0
6.	<i>Lactarius vellereus</i>	ST+,1+	ST+,0	ST0,0	ST0,0	ST+,1+	ST0,2+	ST+,3+	ST+,0	ST0,0	ST0,0	ST0,0	ST0,1+
7.	<i>Russula acrifolia</i>	ST+,0	ST+,0	ST0,0	ST+,0	ST+,1+	ST+,2+	ST+,2+	ST+,1+	ST0,0	ST0,0	ST+,0	ST+,0
8.	<i>Russula coerulea</i>	ST+,1+	ST+,1+	ST0,1+	ST+,1+	ST+,1+	ST0,2+	ST+,2+	ST+,2+	ST0,0	ST0,0	ST0,0	ST+,0
9.	<i>Russula delica</i>	ST0,0	ST0,0	ST0,0	ST0,0	ST0,1+	ST0,2+	ST+,0	ST+,1+	ST0,0	ST0,0	ST0,0	ST+,0
10.	<i>Russula integra</i>	ST+,0	ST+,0	ST0,0	ST0,0	ST+,1+	ST+,2+	ST+,2+	ST+,1+	ST0,0	ST0,0	ST0,0	ST+,0
11.	<i>Russula olivacea</i>	ST+,1+	ST+,0	ST+,1+	ST+,1+	ST+,0	ST+,2+	ST+,0	ST+,2+	ST0,0	ST0,0	ST+,0	ST+,0
12.	<i>Hydnum repandum</i>	ST+,0	ST+,0	ST0,0	ST0,0	ST+,0	ST+,1+	ST0,0	ST+,0	ST0,0	ST0,0	ST0,0	ST+,0
13.	<i>Hyphoploma sublateritium</i>	ST+,0	ST+,0	ST+,0	ST+,0	ST+,0	ST+,1+	ST+,3+	ST+,2+	ST0,0	ST0,0	ST+,0	ST+,0
14.	<i>Sarcodon imbricatus</i>	ST+,3+	ST0,0	ST+,0	ST+,0	ST0,0	ST+,1+	ST+,3+	ST+,1+	ST0,0	ST0,0	ST+,0	ST+,0
	Detekovatelné skupiny	Fenoly, Hydroxámové kyseliny	Fenoly, Hydroxámové kyseliny	Fenoly	Fenoly	Fenoly	Fenoly	Redukující sloučeniny (fenoly, ...)	Redukující sloučeniny (fenoly, ...)	Karboxylové kyseliny	Karboxylové kyseliny	Laktony	Laktony

Tab. 18: Pozitivní reakce na detekce u sledovaných taxonů

Číslo taxonu	Taxon	D23, S1	D23, S2	D13, S1	D13, S2	D3, S1	D3, S2	D16, S1	D16, S2	D24, S1	D24, S2	D7, S1	D7, S2
1.	<i>Leccinum quercinum</i>	ST+,7+	ST+,3+	ST+,4+	ST+,5+	ST0,7+	ST0,2+	ST+,5+	ST+,4+	ST0,0	ST0,0	ST+,0	ST+,0
2.	<i>Albatrellus ovinus</i>	ST+,3+	ST+,2+	ST+,3+	ST+,2+	ST+,5+	ST+,2+	ST+,4+	ST+,3+	ST+,0	ST0,1+	ST0,0	ST+,0
3.	<i>Panus conchatus</i>	ST+,1+	ST+,3+	ST+,4+	ST+,4+	ST0,7+	ST+,3+	ST+,5+	ST+,5+	ST+,0	ST0,0	ST+,0	ST+,0
4.	<i>Lactarius blennius</i>	ST+,4+	ST+,3+	ST+,8+	ST+,1+	ST+,8+	ST+,1+	ST+,14+	ST+,2+	ST0,0	ST0,2+	ST+,0	ST+,0
5.	<i>Lactarius deterrimus</i>	ST+,3+	ST+,2+	ST+,9+	ST+,4+	ST+,7+	ST+,3+	ST+,7+	ST+,5+	ST0,1+	ST0,2+	ST+,0	ST+,0
6.	<i>Lactarius vellereus</i>	ST+,3+	ST+,2+	ST+,7+	ST+,2+	ST+,8+	ST+,2+	ST+,6+	ST+,2+	ST+,1+	ST+,2+	ST0,0	ST+,0
7.	<i>Russula acrifolia</i>	ST+,1+	ST+,3+	ST+,5+	ST+,5+	ST+,5+	ST+,4+	ST+,5+	ST+,5+	ST0,0	ST0,1+	ST+,0	ST+,0
8.	<i>Russula coerulea</i>	ST+,4+	ST+,6+	ST+,4+	ST+,4+	ST+,6+	ST+,5+	ST+,6+	ST+,6+	ST+,0	ST+,2+	ST+,0	ST+,0
9.	<i>Russula delica</i>	ST0,4+	ST+,2+	ST+,5+	ST+,4+	ST+,5+	ST+,3+	ST+,5+	ST+,2+	ST+,0	ST+,2+	ST+,0	ST+,0
10.	<i>Russula integra</i>	ST+,4+	ST+,3+	ST+,6+	ST+,4+	ST+,2+	ST+,4+	ST+,6+	ST+,5+	ST+,0	ST+,2+	ST+,0	ST+,0
11.	<i>Russula olivacea</i>	ST+,6+	ST+,4+	ST+,6+	ST+,7+	ST+,6+	ST+,4+	ST+,5+	ST+,4+	ST+,0	ST+,3+	ST+,0	ST+,0
12.	<i>Hydnum repandum</i>	ST0,3+	ST+,2+	ST+,2+	ST+,2+	ST+,4+	ST+,2+	ST+,5+	ST+,4+	ST+,0	ST+,1+	ST+,0	ST+,0
13.	<i>Hypholoma sublateritium</i>	ST+,9+	ST+,7+	ST+,11+	ST+,8+	ST0,6+	ST0,3+	ST+,10+	ST+,5+	ST+,1+	ST0,0	ST+,0	ST+,0
14.	<i>Sarcodon imbricatus</i>	ST+,1+	ST+,0	ST+,3+	ST+,3+	ST+,0	ST+,1+	ST+,0	ST+,3+	ST+,0	ST0,0	ST+,0	ST+,0
	Detekovatelné skupiny	Steroly	Steroly	Steroly	Steroly	Steroly, Steroidy, Triterpeny	Steroly, Steroidy, Triterpeny	Steroidy, Fenoly, Těkavé látky	Steroidy, Fenoly, Těkavé látky	Tuky	Tuky	Alkaloidy	Alkaloidy

Tab. 19: Pozitivní reakce na detekce u sledovaných taxonů

Číslo taxonu	Taxon	D4, S1	D4, S2	D6, S1	D6, S2	D17, S1	D17, S2	D18, S1	D18, S2	D19, S1	D19, S2	D20, S1	D20, S2
1.	<i>Leccinum quercinum</i>	ST+,0	ST+,2+	ST+,0	ST+,2+	ST0,0	ST+,0	ST+,1+	ST+,1+	ST+,0	ST+,1+	ST+,0	ST0,0
2.	<i>Albatrellus ovinus</i>	ST0,2+	ST0,1+	ST+,0	ST+,3+	ST0,2+	ST+,1+	ST+,3+	ST+,2+	ST+,0	ST+,1+	ST+,0	ST+,1+
3.	<i>Panus conchatus</i>	ST+,1+	ST+,3+	ST+,0	ST+,3+	ST0,0	ST0,0	ST+,0	ST+,2+	ST+,0	ST+,2+	ST+,0	ST+,0
4.	<i>Lactarius blennius</i>	ST+,4+	ST+,1+	ST+,2+	ST+,3+	ST0,1+	ST+,1+	ST+,5+	ST+,3+	ST+,0	ST+,2+	ST+,0	ST+,1+
5.	<i>Lactarius deterrimus</i>	ST+,3+	ST+,3+	ST+,0	ST+,5+	ST0,2+	ST+,1+	ST+,3+	ST+,3+	ST+,1+	ST+,2+	ST+,0	ST+,1+
6.	<i>Lactarius vellereus</i>	ST+,7+	ST+,1+	ST+,4+	ST+,5+	ST0,2+	ST+,1+	ST+,6+	ST+,4+	ST+,0	ST+,2+	ST+,0	ST+,1+
7.	<i>Russula acrifolia</i>	ST+,4+	ST+,5+	ST+,0	ST+,6+	ST0,0	ST0,0	ST+,0	ST+,3+	ST+,1+	ST0,2+	ST+,0	ST+,1+
8.	<i>Russula coerulea</i>	ST+,1+	ST+,2+	ST+,0	ST+,5+	ST0,0	ST+,1+	ST+,1+	ST+,3+	ST+,1+	ST+,3+	ST+,0	ST+,1+
9.	<i>Russula delica</i>	ST0,1+	ST+,1+	ST+,0	ST+,5+	ST0,0	ST0,0	ST+,1+	ST+,3+	ST+,1+	ST+,1+	ST+,0	ST+,1+
10.	<i>Russula integra</i>	ST+,0	ST+,4+	ST+,0	ST+,5+	ST0,0	ST0,0	ST+,1+	ST+,3+	ST+,1+	ST+,2+	ST+,0	ST+,1+
11.	<i>Russula olivacea</i>	ST+,3+	ST+,4+	ST+,0	ST+,3+	ST0,0	ST+,0	ST+,4+	ST+,2+	ST+,3+	ST+,4+	ST+,0	ST+,1+
12.	<i>Hydnum repandum</i>	ST0,2+	ST+,1+	ST+,3+	ST+,4+	ST0,1+	ST0,1+	ST+,3+	ST+,1+	ST+,0	ST+,0	ST+,0	ST+,0
13.	<i>Hypholoma sublateritium</i>	ST+,2+	ST+,4+	ST+,3+	ST+,5+	ST0,0	ST0,0	ST0,3+	ST0,3+	ST+,2+	ST0,1+	ST+,0	ST+,0
14.	<i>Sarcodon imbricatus</i>	ST+,0	ST0,1+	ST+,0	ST+,5+	ST0,0	ST0,0	ST+,0	ST+,1+	ST+,0	ST+,1+	ST+,0	ST+,0
	Detekovatelné skupiny	Sacharidy	Sacharidy	Sacharidy	Sacharidy	Sacharidy	Sacharidy	Sacharidy	Sacharidy	Organické kyseliny	Organické kyseliny	Organické kyseliny	Organické kyseliny

V. DISKUSE

Tato práce je pokračováním studie širšího fytochemicko-farmakologického výzkumu taxonů hub oddělení Eumycota prováděného na katedře farmaceutické botaniky a ekologie. Cílem této studie je zjistit u vybraných taxonů Basidiomycet antioxidační aktivitu sumárních extraktů za použití klasického DPPH testu metodou SIA na přístroji FIA. Mou snahou bylo pomocí literární rešerže dohledat údaje o obsahových látkách hub, analyzovat pomocí tenkovrstvé chromatografie obsahové látky z hlediska skupinových strukturních typů a změřit antioxidační aktivitu extraktů vybraných taxonů hub. Lyofilizační metodu, vypracovanou na katedře farmaceutické botaniky a ekologie jsem prováděla v rámci své diplomové práce. Příprava extraktů pro mé účely v této práci proto spočívala jen v navázení potřebného množství již hotového lyofilizátu a přidání vhodného rozpouštědla.

Testováno bylo celkem čtrnáct taxonů hub náležících do různých čeledí a rodů. Nejvíce zastoupeny jsou zde rod *Russula* a rod *Lactarius* z čeledi Russulaceae.

Metoda SIA pracuje s malými diskrétními objemy vzorků a činidel, výhodou je také její flexibilita daná snadnou změnou parametrů měření. Se vzrůstajícími potřebami kontroly kvality životního prostředí, potravin a léčiv, s požadavky na rychlost a spolehlivost diagnostických metod v medicíně a biologickém výzkumu, a na racionalizaci řízení technologických procesů se jeví SIA jako jedna z nadějných alternativ, umožňujících provádět analýzy velkých sérií vzorků s vysokou produktivitou a dostatečnou spolehlivostí.⁶⁸

Stanovení antioxidační aktivity u přírodních látek je přínosem k využití těchto látek jako materiálu pro výrobu potravin pro zvláštní účely. Takovou látkou je např. β -glukan. Má silné antioxidační, imunostimulační (stimuluje makrofágy a tím zvyšuje aktivitu imunitního systému) a podle studií i značné protinádorové účinky. Zároveň je bezpečný a netoxický. Lze jej izolovat z kvasnic, ova, ječmene ale i z hub. Uplatnění

nachází v oblasti zvyšování imunity a preventivní péče. Je součástí kosmetických produktů, neboť působí také proti stárnutí pleti, stimuluje tvorbu kolagenu a elastinu a zabraňuje vlivu volných radikálů, které narušují vazivová vlákna, čímž dochází k ochablosti pleti.

Pokud je oxidační poškození příčinou stárnutí, lze očekávat, že jeho projevy budou během života jedince stále výraznější. V podstatě byly popsány tři typy oxidačních změn závislých na věku: hromadění konečných produktů oxidačního stresu, modifikace biologických struktur a vyčerpání složek antioxidační ochrany. Reaktivní formy kyslíku a dusíku jsou fyziologickou součástí životních dějů a významnými ochrannými prostředky organismu. Patologická nadprodukce těchto látek má však destrukční účinky a rázem se tak stávají pro organismus jedovaté. Snahou je terapeutické a preventivní použití inhibitorů oxidačního stresu, tedy antioxidantů a vitamínů.⁶⁶ Jednou z mnoha skutečností, které podporují preventivní význam antioxidantů je tzv. Francouzský paradox. U Francouzů, přesto, že jejich strava obsahuje velké množství nenasycených tuků, je nízký výskyt aterosklerózy a malá úmrtnost na nemoci srdce, které s tímto onemocněním tepen úzce souvisejí. Může za to pravidelná konzumace červeného vína, které obsahuje antioxidačně účinné flavonoidy.

Z hlediska antioxidační aktivity je zajímavá houba *Albatrellus ovinus*. V japonské studii 3-hydroxyneogrifolin a 1-formyl-3-hydroxyneogrifolin, látky obsažené v její plodnici, vykazovaly silnější antioxidační aktivitu než α – tokoferol nebo BHA.¹⁴

Při použití metody SIA pro stanovení antioxidační aktivity DPPH testem byly použity koncentrace sumárních extraktů 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml a 0,1 mg/ml. Standardem byl Trolox měřený při koncentracích 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml a 0,025 mg/ml. Žádný z extraktů nevykazoval významnější antioxidační aktivitu než Trolox. Nejvýznamnější hodnoty poklesu absorbance při nejvyšší koncentraci dosáhl taxon *Leccinum quercinum*, 51,16 % a *Hypholoma sublateritium*, 49,75 %. Hodnoty poklesu absorbance při nejvyšší koncentraci u *Sarcodon imbricatus*, *Albatrellus ovinus* a *Russula olivacea* se pohybovaly v rozmezí 36 – 27 %. Ostatní extrakty měly antioxidační aktivitu nízkou.

Standart, Trolox, je však látka v čistém stavu, v případě houbových extraktů se jedná o sumární extrakt, který obsahuje antioxidační látky v několika málo procentech. Proto výsledky u dvou taxonů s hodnotou okolo 50 % jsou nadějně pro další studium.

Výčet obsahových látek je bohatý zejména u hub *Albatrellus ovinus*, *Lactarius blenius*, *L.vellereus*, *Russula delica*, *Hypholoma sublateritium* (viz. 2.9. Sekundární metabolity). Byly tedy prozkoumány mnohem důkladněji než ostatní taxony v mé práci. U ryzců je zřejmé, že jejich plodnice roní po utržení či jiném poranění latex. Ten také mívá ostrou a palčivou příchut'. Příčinou je skupina seskviterpenů marasmanové nebo laktaranové struktury. Další výzkum se zabývá možností, že by seskviterpeny byly součástí chemického obranného systému ryzců.^{22, 25} V Japonsku se podařilo objevit v *Naematoloma sublateritium* (syn. *Hypholoma sublateritium*) strukturní typ sloučenin s protektivním účinkem na kyselinu hyaluronovou, což vede k praktickému využití v prevenci a léčbě nemocí způsobených abnormálním rozkladem této kyseliny.⁴² Houby by mohly být považovány za hyperakumulátory rozkladných produktů radioaktivního štěpení a využívány k dlouhodobému radioekologickému monitorování kontaminovaných oblastí jako je oblast Černobyli po havárii v roce 1986.⁴⁶

O biologické aktivitě pojednává kapitola 3. v teoretické části. Až na pár výjimek nebyla v dostupných literárních zdrojích prakticky žádná zmínka o biologické aktivitě sledovaných taxonů. Ve screeningu z roku 2002 vykazoval taxon *Russula delica* a *Russula olivacea* antibakteriální aktivitu na *Bacillus subtilis* ev. na *E. coli* a rovněž molluscicidní aktivitu na *Biomphalaria glabrata*. *Sarcodon imbricatus* měl antibakteriální aktivitu na *Bacillus subtilis* i na *E. coli* a zároveň aktivitu antioxidační a antiradikálovou srovnatelnou s referenční látkou.⁴⁷ Kultura taxonu *Hypholoma sublateritium* měla ve výzkumu Mikrobiologického ústavu ČSAV antibiotickou aktivitu.¹ Sekundární metabolit isovelleral pocházející z *Lactarius vellereus* byl označen jako prokazatelný mutagen.⁴⁸ Izolace chemické sloučeniny nazvané repandiol potvrdila předešlou domněnku o potenciální protinádorové aktivitě zástupců rodu *Hydnum*.⁴⁹ Výzkum na univerzitě v Ljubljani ukázal, že methanolové extrakty *Lactarius vellereus* mají vysoce protektivní účinek proti IQ (mutagen; 2-amino-3-methylimidazo(4,5-f)chinolin) indukovanému poškození DNA v savčích buňkách. *L. vellereus* může být pokládán za přírodní zdroj antimutagenů s potenciálním farmakologickým uplatněním v prevenci rakoviny.⁵¹ Je zvláštní, že *Lactarius vellereus* obsahuje mutagen isovelleral a zároveň v jiných studiích extrakty z jeho plodnic vykazují antimutagenní aktivitu.

K hodnocení obsahových látek z hlediska skupinových strukturních typů pomocí tenkovrstvé chromatografie byly zvoleny, shodně s předešlými diplomovými a rigorózními pracemi zabývajícími se touto problematikou, dvě chromatografické soustavy. Soustava S1 (toluen + HCOOEt + HCOOH = 50 + 40 + 10) je vhodná pro látky mírně až středně polární, soustava S2 (PrOH + voda = 90 + 10) dělí nejlépe látky polární. Pro detekci bylo použito celkem dvacet čtyři činidel D1 – D24, tedy oproti jiným pracím byl počet detekčních činidel rozšířen o dalších osm. Přičemž pozitivním výsledkem byl vznik různě barevných skvrn a hodnotil se počet těchto skvrn.

Z primárních metabolitů byly hodnoceny sacharidy (detekce D4, D6, D17, D18) a aminokyseliny (detekce D12 a D14). Obsah sacharidů byl jednoznačně prokázán pomocí D6 (difenylamin – anilin – kys. fosforečná) po vyvíjení v soustavě S2 (obr. 31), kdy všechny lyofilizáty, obzvláště zástupci čeledi Russulaceae a druhy *Hypholoma sublateritium* a *Sarcodon imbricatus*, jeví četné barevné reakce jak na startu tak na dráze. V soustavě S1 (obr. 30) byla pozitivní reakce na dráze pouze u čtyř hub. Detekce D4 (anisaldehyd) rovněž prokázala obsah sacharidů ve všech sledovaných taxonech. S nově zkoušeným činidlem D17 (2,4-dinitrofenylhydrazin; obr. 52, 53) reakce neprobíhaly tak, aby se dalo usuzovat na téměř samozřejmý obsah sacharidů, proto bych jeho použití v dalších studiích nedoporučovala. Naopak činidlo D18 (Anthron; obr. 54, 55) se osvědčilo a v obou soustavách byl touto detekcí opět potvrzen obsah všudypřítomných sacharidů. Nejvýraznější výskyt aminokyselin byl potvrzen detekcí D14 (ninhydrin – kolidin), (obr. 46, 47). Všechny taxony vykazují pozitivní reakci s oběma soustavami na startu i na dráze. S činidlem D12 (isatin), (obr. 42, 43) byla reakce méně patrná. V soustavě S1 reagovaly všechny druhy pozitivně na startu a pouze druh *Lactarius deterrimus* i na dráze. V soustavě S2 reagovala zřetelněji většina lyofilizátů kromě druhu *Albatrellus ovinus*.

Z hlediska sekundárních metabolitů byla pozornost věnována základním skupinám látek, které mohou být v těchto houbách přítomny. Hodnoceny byly fenoly, aminy, organické kyseliny, alkaloidy, laktony, steroly, steroidy, triterpeny.

V případě alkaloidů je pozitivní reakce při detekci D7 (Dragendorffovo činidlo), soustava S2 (obr. 33) pozorována u všech taxonů na startu. Při použití soustavy S1 nedošlo u dvou taxonů *Albatrellus ovinus* a *Lactarius vellereus* k žádné reakci.

Přítomnost fenolických látek se výrazně projevuje u druhů *Albatrellus ovinus*, *Russula acrifolia*, *Russula coerulea*, *Russula olivacea*, detekce D15 (kys. sulfanilová), soustava S1, S2 (obr. 48, 49). Při detekci činidlem D5 (2,6-dibromchinonchlorimid) poměrně shodně reagovali zástupci čeledi Russulaceae a *Panus conchatus* (Pleurotaceae) a to jak v soustavě S1 tak v soustavě S2 (obr. 28, 29). S činidlem D8 (Fast Blue B salt), detekce na fenoly a aminy, v soustavě S1 (obr. 32) jeví pozitivní reakci na dráze pouze tři taxony *Albatrellus ovinus*, *Russula coerulea*, *Hypholoma sublateritium*. V polárnější soustavě S2 (obr. 33) vykazuje pozitivní reakci na startu i na dráze všech čtrnáct lyofilizátů. Činidlo D21 (chlorid železitý) neprokázalo tak výrazně výskyt fenolických látek, v soustavě S1 (obr. 60) pozitivně reagovaly kromě *Albatrellus ovinus* všichni zástupci na startu a jen *Lactarius vellereus*, *Russula coerulea*, *Russula olivacea* a *Sarcodon imbricatus* reagovaly s detekčním činidlem nepatrně i na dráze. V soustavě S2 (obr. 61) vytvořil barevnou skvrnu na dráze jen jeden taxon *Russula coerulea*. Po detekci na fenoly s činidlem D22 (4-aminoantipyrin-ferrikyanid draselný) reagovaly vznikem jedné skvrny na dráze shodně druhy *Albatrellus ovinus*, *Russula coerulea*, *Russula olivacea* (obr. 62, 63), ostatní taxony neprojevily výraznější reakce. Pomocí činidla D10 (hexakyanoželezitan draselný - chlorid železitý) lze dokázat obsah redukujících sloučenin (mj. také látky fenolické). V obou soustavách mají na startu všechny houby až na *Hydnum repandum* pozitivní reakci, na dráze většina hub kromě čtyř (S1, obr. 38), resp. tří (S2, obr. 39).

Hydroxámový test při detekci D11 (hydroxylamin - chlorid železitý) a použití S1 a S2 (obr. 38, 39) poskytl výraznější reakci pouze na startu u druhů *Leccinum quercinum*, *Panus conchatus*, *Lactarius deterrimus*, *Russula acrifolia*, *Russula olivacea*, *Hypholoma sublateritium* a *Sarcodon imbricatus*. Ačkoli u druhu *Lactarius vellereus* je patrná zřetelná skvrna s vysokou hodnotou R_f a na startu naopak žádná reakce.

Nejvýznamnější výsledky byly získány při detekcích na steroly a triterpeny použitím činidel D3 (acetanhydrid - kys. sírová), (obr. 24, 25), D13 (1,2-naftochinon-4-sulfonová kys. - kys. chloristá), (obr. 44, 45), D23 (fosfomolybdenová kyselina), (obr. 64, 65) a D24 (Berberinové činidlo), (obr. 66, 67). Pozitivní reakce jsem zaznamenala téměř u všech taxonů v soustavě S1 i S2. Hojný výskyt steroidů, fenolů a těkavých látek dokazují detekce s činidlem D16 (vanilin-kys. sírová), (obr. 50, 51). Kdy vycházejí pozitivní reakce v obou soustavách na startu i po dráze u všech čtrnácti taxonů s výjimkou *Sarcodon imbricatus*, který v soustavě S1 neprojevil žádnou reakci na dráze.

Co se týče výskytu organických kyselin, nevychází detekce D9 (glukóza - anilin) na karboxylové kyseliny u žádného z mnou testovaných lyofilizátů pozitivně. Kromě druhu *Leccinum quercinum*, kde je reakce na startu při použití obou soustav pozitivní (obr. 34, 35).

Obsah aromatických organických kyselin se podařilo odhalit po postřiku činidlem D19 (peroxid vodíku) a vložením chromatogramu pod UV lampu. Lze konstatovat, že u všech taxonů byl obsah těchto kyselin prokázán, zřetelněji je výsledek patrný po vývoji chromatogramu v soustavě S2 (obr. 57). Alifatické organické kyseliny se detekovaly pomocí činidla D20 (bromkresolová zeleň). V soustavě S1 by důkaz rušila kyselina mravenčí obsažená v mobilní fázi, chromatogram jsem alespoň zkusila před samotnou detekcí důkladně vysušit. Všechny taxony pak projevily pozitivní reakci na startu (obr. 58). Po vyvíjení v soustavě S2 a následném postřiku se objevily alifatické organické kyseliny v podobě modrých skvrn na stratu i na dráze prakticky u všech sledovaných taxonů (obr. 59).

VI. SOUHRN

Tato práce si kladla za cíl provést základní fytochemický výzkum vybraných 14 taxonů hub oddělení Eumycota. Pojednávané druhy hub patří celkem do sedmi čeledí: Boletaceae, Hydnaceae, Pleurotaceae, Polyporaceae, Russulaceae, Strophariaceae a Telephoraceae. Nejpočetněji je zde zastoupena čeleď Russulaceae kam náleží osm hub ze sledovaných 14 druhů.

Příprava extraktů pro účely v této práci spočívala jen v navážení potřebného množství již hotového lyofilizátu a přidání vhodného rozpouštědla. Práce se zabývala dvěma experimentálními základy. Tenkovrstvou chromatografií se skupinovými reakcemi a stanovením antioxidační aktivity pomocí DPPH testu s použitím metody SIA. Literární rešerže byla zaměřena jak na informace o obsahových látkách sledovaných taxonů tak na údaje o jejich biologické aktivitě a případné toxicitě.

Z hlediska antioxidační aktivity se zdá být zajímavá houba *Albatrellus ovinus*. Ve studii 3-hydroxyneogrifolin a 1-formyl-3-hydroxyneogrifolin, látky obsažené v její plodnici, vykazovaly silnější antioxidační aktivitu než α – tokoferol nebo BHA. ¹⁴

Při použití metody SIA pro stanovení antioxidační aktivity DPPH testem byly použity koncentrace sumárních extraktů 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml a 0,1 mg/ml. Standardem byl Trolox měřený při koncentracích 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml a 0,025 mg/ml. Žádný z extraktů

nevykazoval významnější antioxidační aktivitu než Trolox. Nejvyšší hodnotu poklesu absorbance přesahující 50 % při nejvyšší koncentraci dosáhl taxon *Leccinum quercinum* (jedlý), druhou nejvyšší hodnotu měl druh *Hypholoma sublateritium* (nejedlý). *Sarcodon imbricatus*, *Albatrellus ovinus* a *Russula olivacea* s hodnotami poklesu absorbance o něco nižšími lze považovat za relativně antioxidačně aktivní. Ostatní taxony vykazovaly antioxidační aktivitu nízkou. Výsledky u dvou taxonů *Leccinum quercinum* a *Hypholoma sublateritium* jsou nadějně pro další studium.

Obsahové látky jsou v práci rozděleny na primární a sekundární metabolity.

Výčet obsahových látek je bohatý zejména u hub *Albatrellus ovinus*, *Lactarius blenius*, *L.vellereus*, *Russula delica*, *Hypholoma sublateritium*. Příčinou ostré a palčivé příchutě latexu obsaženého v houbách rodu *Lactarius* jsou seskviterpeny marasmanové nebo laktaranové struktury. Další výzkum se zabývá možností, že by seskviterpeny byly součástí chemického obranného systému ryzců. V *Naematoloma sublateritium* (syn. *Hypholoma sublateritium*) byl objeven strukturní typ sloučenin s protektivním účinkem na kyselinu hyaluronovou, což vede k praktickému využití v prevenci a léčbě nemocí způsobených abnormálním rozkladem této kyseliny. Houby by také mohly být považovány za hyperakumulátory rozkladných produktů radioaktivního štěpení a využívány k dlouhodobému radioekologickému monitorování kontaminovaných oblastí.

Až na pár výjimek nebyla v dostupných literárních zdrojích prakticky žádná zmínka o biologické aktivitě sledovaných taxonů. *Russula delica* a *Russula olivacea* vykazovaly antibakteriální aktivitu na *Bacillus subtilis* ev. na *E. coli* a rovněž molluscicidní aktivitu na *Biomphalaria glabrata*. *Sarcodon imbricatus* měl antibakteriální aktivitu na *Bacillus subtilis* i na *E. coli* a zároveň aktivitu antioxidační a antiradikálovou srovnatelnou s referenční látkou. Kultura taxonu *Hypholoma sublateritium* měla ve výzkumu aktivitu antibiotickou. Sekundární metabolit isovelleral pocházející z *Lactarius vellereus* byl označen jako prokazatelný mutagen. Izolace chemické sloučeniny nazvané repandiol potvrdila předešlou domněnku o potenciální protinádorové aktivitě zástupců rodu *Hydnum*. Výzkum s methanolovými extrakty *Lactarius vellereus* ukázal, že mají vysoce protektivní účinek proti IQ (mutagen; 2-amino-3-methylimidazo(4,5-f)chinolin) indukovanému poškození DNA v savčích buňkách. *L. vellereus* může být pokládán za přírodní zdroj antimutagenů s potenciálním farmakologickým uplatněním v prevenci rakoviny. Je zvláštní, že *Lactarius vellereus* obsahuje mutagen isovelleral a zároveň v jiných studiích extrakty z jeho plodnic vykazují antimutagení aktivitu.

K hodnocení obsahových látek z hlediska skupinových strukturních typů pomocí tenkovrstvé chromatografie byly zvoleny, shodně s předešlými diplomovými a rigorózními pracemi na katedře farmaceutické botaniky a ekologie, dvě chromatografické soustavy. Soustava S1 (toluen + HCOOEt + HCOOH = 50 + 40 + 10) je vhodná pro látky mírně až středně polární, soustava S2 (PrOH + voda = 90 + 10) lépe dělí látky polární. Pro detekci bylo použito celkem dvacet čtyři činidel D1 – D24, tedy oproti jiným pracím byl počet detekčních činidel rozšířen o dalších osm. Přičemž pozitivním výsledkem byl vznik různě barevných skvrn a hodnotil se počet těchto skvrn.

Z primárních metabolitů byly hodnoceny sacharidy (detekce D4, D6, D17, D18) a aminokyseliny (detekce D12 a D14). Obsah sacharidů byl jednoznačně prokázán pomocí D6 po vyvíjení v soustavě S2, kdy všechny lyofilizáty, obzvláště zástupci čeledi Russulaceae a druhy *Hypholoma sublateritium* a *Sarcodon imbricatus*, jeví četné barevné reakce. Detekce D4 rovněž prokázala obsah sacharidů ve všech sledovaných taxonech. S nově zkoušeným činidlem D17 reakce neprobíhaly tak optimálně. Naopak činidlo D18 se osvědčilo. Nejvýraznější výskyt aminokyselin byl potvrzen detekcí D14. Všechny taxony vykazují pozitivní barevnou reakci s oběma soustavami na startu i na dráze. S činidlem D12 byla reakce méně patrná. Z hlediska sekundárních metabolitů byla pozornost věnována základním skupinám látek, které mohou být v těchto houbách přítomny. Hodnoceny byly fenoly, aminy, organické kyseliny, alkaloidy, laktony, steroly, steroidy, triterpeny. V případě alkaloidů je pozitivní reakce při detekci D7, soustava S2, pozorována u všech taxonů na startu. Přítomnost fenolických látek se výrazně projevuje u druhů *Albatrellus ovinus*, *Russula acrifolia*, *Russula coerulea*, *Russula olivacea*, detekce D15. Při detekci činidlem D5 poměrně shodně reagovali zástupci čeledi Russulaceae a *Panus conchatus*. S činidlem D8, detekce na fenoly a aminy, v soustavě S1 jeví pozitivní reakci na dráze pouze tři taxony *Albatrellus ovinus*, *Russula coerulea*, *Hypholoma sublateritium*. V polárnější soustavě S2 vykazují pozitivní reakci na startu i na dráze všech čtrnáct lyofilizátů. Činidlo D21 neprokázalo tak výrazně výskyt fenolických látek. Po detekci na fenoly s činidlem D22 reagovaly vznikem jedné skvrny na dráze shodně druhy *Albatrellus ovinus*, *Russula coerulea*, *Russula olivacea*, ostatní taxony neprojeví výraznější reakce. Pomocí činidla D10 lze dokázat obsah redukujících sloučenin (mj. také látky fenolické). V obou soustavách mají lyofilizáty převážně pozitivní reakce. Hydroxámový test při detekci D11 a použití S1 a S2 poskytl výraznější reakci pouze na startu u druhů *Leccinum quercinum*, *Panus conchatus*, *Lactarius deterrimus*, *Russula acrifolia*, *Russula olivacea*, *Hypholoma sublateritium* a *Sarcodon imbricatus*. Nejvýznamnější výsledky byly získány při detekcích na steroly a triterpeny použitím činidel D3, D13, D23 a D24. Pozitivní reakce byly zaznamenány téměř u všech taxonů

v soustavě S1 i S2. Hojný výskyt steroidů, fenolů a těkavých látek dokazují detekce s činidlem D16. Co se týče výskytu organických kyselin, nevychází detekce D9 na karboxylové kyseliny u žádného z testovaných lyofilizátů pozitivně. Kromě druhu *Leccinum quercinum*, kde je reakce na startu při použití obou soustav pozitivní. Obsah aromatických organických kyselin se podařilo odhalit po postřiku činidlem D19 a vložením chromatogramu pod UV lampu. Lze konstatovat, že u všech taxonů byl obsah těchto kyselin prokázán, zřetelněji je výsledek patrný po vývoji chromatogramu v soustavě S2. Alifatické organické kyseliny se detekovaly pomocí činidla D20. Po vyvíjení v soustavě S2 a následném postřiku se objevily alifatické organické kyseliny v podobě modrých skvrn na stratu i na dráze prakticky u všech sledovaných taxonů.

LITERATURA

1. Semerdžieva, M., Veselovský, J.: Léčivé houby dříve a nyní, Nakladatelství ČSAV, Praha 1986, 177 s.
2. Váňa, J.: Systém a vývoj hub a houbových organismů, Universita Karlova v Praze, Praha 1996, 164 s.
3. Gerhardt, E.: Houby (Pilze, BLV München-Wien-Zürich), BETA-Dobrovský a Ševčík, Praha-Plzeň 1999, 288 s.
4. Kluzák, Z., Smotlacha, J., Erhart, J., Erhartová, M.: Poznáváme houby, Svépomoc, Brno 1985, 374 s.
5. Veselý, R., Kotlaba, F., Pouzar, Z.: Přehled československých hub, Nakladatelství ČSAV, Praha 1972, 424 s.
6. Svrček, M., Erhart, J., Erhartová, M.: Holubinky, Nakladatelství ČSAV, Praha 1984, s. 168
7. Hubík, J. a kol.: Farmakognosie I., Obecná část, Primární látky, Praha 1989, SPN
8. Hrdina, V., Hrdina, R., Jahodář, L., Martinec, Z., Měrka, V.: Přírodní toxiny a jedy, Galén a Universita Karlova v Praze, Praha 2004, 302 s.

9. Cole, R. J., Jarvis, B. B., Schweikert, M. A.: Handbook of Secondary Fungal Metabolites, Academic press An imprint of Elsevier Science, Vol. 2, 2003, s. 10, 43-48, 56
10. Rapior, S., Marion, Ch., Pelissier, Y., Bessire, J.-M.: Volatile composition of fourteen species of wild mushrooms (Boletales). Journal of Essential Oil Research 9(2), 1997, s. 231-234
11. Bresinsky, A., Besl, H.: Giftpilze, Ein Handbuch für Apotheker, Ärzte und Biologen, Vissenschaftliche Verlagsgessellschaft mbH Stuttgart, 1985, 295 s.
12. Dekermendjian, K., Shan, R., Nielsen, M., Stadler, M., Sterner, O., Witt, M. R.: The affinity to the brain dopamine D1 receptor in vitro of triprenyl phenols isolated from the fruit bodies of *Albatrellus ovinus*. European Journal of Medicinal Chemistry 32(4), 1997, s. 351-356
13. Vrkoc, J., Budesinsky, M., Dolejs, L.: Phenolic meroterpenoids from the basidiomycete *Albatrellus ovinus*. Phytochemistry 16(9), 1997, s. 1409-11
14. Nukata, Makiko, Hashimoto, Toshihiro, Yamamoto, Isao et al.: Neogrifolin derivatives possessing anti-oxidative activity from the mushroom *Albatrellus ovinus*. Phytochemistry 59(7), 2002, s. 731-737
15. Kis, Z., Clossé, A., Sigg, H. P., Hruban, L., Snatzke, G.: Structure of panepoxydone and relate fungus metabolites. Helvetica Chimica Acta 53(7), 1970, 1577-97
16. Shotwell, J. B., Hu, S., Medina, E., Abe, M., Cole, R., Crews, C. M., Wood, J. L.: Efficient stereoselective syntheses of isopanepoxydone and panepoxydone: a re-assignment of relative configuration. Tetrahedron Letters 41(49), 2000, s. 9639-9643
17. Spitteller, P., Steglich, W.: Blennione, a green aminobenzoquinone derivative from *Lactarius blnnius*. Journal of Natural Products 65(5), 2002, s. 725-727
18. Vidari, G., De Bernardi, M., Vita-Finzi, P., Fronza, G.: Fungal metabolites. Part 3. Sesquiterpenes from *Lactarius blennius*. Phytochemistry (Elsevier) 15(12), 1976, s. 1953-1955
19. De Bernardi, M., Fronza, G., Mellerio, G., Vidari, G., Vita-Finzi, P.: Fungal metabolites. Part 4. New sesquiterpene hydroxylactones from *Lactarius* species. Phytochemistry (Elsevier) 18(2), 1979, s. 293-298

20. De Bernardi, M., Fronza, G., Mellerio, G., Vidari, G., Vita-Finzi, P.: Fungal metabolites. Part 7. Stereochemistry of blennin A and blennin D from *Lactarius blennius*. *Phytochemistry* (Elsevier) 19(1), 1980, s. 99-101
21. Koul, S. K., Taneja, S. C., Ibrahim, S. P., Dhar, K. L., Atal, C. K.: A C-formylated azulene from *Lactarius deterrimus*. *Phytochemistry* (Elsevier) 24(1), 1985, s. 181-182
22. Bergendorff, O., Sterner, O.: The sesquiterpenes of *Lactarius deliciosus* and *Lactarius deterrimus*. *Phytochemistry* 27(1), 1988, s. 97-100
23. List, P. H., Hackenberg, H.: Sharp-tasting substance from *Lactarius vellereus*. *Zeitschrift fuer Pilzkunde* 39(1-2), 1973, s. 97-102
24. Sterner, O., Bergman, R., Kesler, E., Magnusson, G., Nilsson, L., Oluwadiya, J., Wickberg, B.: Velutinal esters of *Lactarius vellereus* and *L. necator*. The preparation of free velutinal. *Tetrahedron Letters* 24(13), 1983, s. 1415-1418
25. Sterner, O., Bergman, R., Kihlberg, J., Wickberg, B.: The sesquiterpenes of *Lactarius vellereus* and their role in a proposed chemical defense system. *Journal of Natural products* 48(2), 1985, s. 279-288
26. Daniewski, W., Kroszczyński, W., Skibicki, P., De Bernardi, M., Fronza, G., Vidari, G., Vita-Finzi, P.: Normarasmane sesquiterpenes from *Lactarius vellereus*. *Phytochemistry* 27(1), 1988, s. 187-191
27. Daniewski, W., Gumulka, M., Skibicki, P., Krajewski, J., Gluzinski, P.: Constituents of higher fungi. Part 24. 2(3)-8(9)-Bisanhydrolactarorufin A and highly oxygenated furanol from *Lactarius vellereus*. *Phytochemistry* 30(4), 1991, s. 1326-1328
28. Daniewski, W., Gumulka, M., Ptaszynska, K., Skibicki, P., Krajewski, J., Gluzinski, P.: Constituents of higher fungi. Part 25. Marasmane lactones from *Lactarius vellereus*. *Phytochemistry* 31(3), 1992, s. 913-915
29. Daniewski, W., Gumulka, M., Ptaszynska, K., Skibicki, P., Jacobsson, U., Norin, T.: 3-Deoxy-3-epi-lactaroscrobiculide B, a sesquiterpene from *Lactarius vellereus*. *Phytochemistry* 31(11), 1992, s. 3933-3936
30. Daniewski, W., Gumulka, M., Skibicki, P., Anczewski W., Jacobsson, U., Norin, T.: New constituents of *Lactarius vellereus*. *Natural Product Letters* 5(2), 1994, s. 123-130
31. Iten, P. X., Märki-Danzig, H., Koch, H., Eugster, C. H.: Isolierung und Struktur von Pteridinen (Lumazinen) aus *Russula* sp. (Täublinge, Basidiomycetes), *Helvetica chimica Acta*, Vol. 67, 1984, č. 63 s. 550

32. Li, Y., Wang, R., Zhou, Y.: Extraction and identification of endogenous hormones from *Russula delica*. *Zhejun Xuebao* 7(4), 1988, s. 239-44 (Journal written in Chinese)
33. Clericuzio, M., Fu, J., Pan, F., Pang, Z., Sterner, O.: Structure and absolute configuration of protoilludane sesquiterpenes from *Russula delica*. *Tetrahedron* 53(28), 1997, s. 9735-9740
34. Clericuzio, M., Han, F., Pan, F., Pang, Z., Sterner, O.: Stearoyldelicone, an unstable protoilludane sesquiterpenoid from intact fruit bodies of *Russula delica*. *Tetrahedron Letters* 38(47), 1997, s. 8237-8240
35. Clericuzio, M., Han, F., Pan, F., Pang, Z., Sterner, O.: The sesquiterpenoid contents of fruit bodies of *Russula delica*. *Acta Chemica Scandinavica* 52(11), 1998, s. 1333-1337
36. Yaoita, Y., Ono, H., Kikuchi, M. : A New sesquiterpenoid from *Russula delica* Fr., *Chemical&Pharmaceutical Bulletin* 51(8) , 2003, s. 1003-1005
37. Yaoita, Y., Watanabe, N., Takano, D., Kikuchi, M.: Sesquiterpenoids from the fruit bodies of *Russula delica*. *Natural Medicines* 58(5), 2004, s. 235
38. Morelli, I., Pistelli, L., Catalano, S.: Some constituents of *Clitocybe nebularis* and of *Hydnum repandum*. *Fitoterapia* 52(1), 1981, s. 45-7
39. Vetter, J.: Trypsin inhibitor activity of basidiomycetous mushrooms. *European Research and Technology* 211(5), 2000, s. 346-348
40. Backens, S., Steffan, B., Steglich, W., Zechlich, L., Anke, T.: Antibiotics from Basidiomycetes, XIX. Neamatolin and naematolone, two caryophyllane derivatives from cultures of *Hypholoma* species (Agyricales). *Lieblings Annalen der Chemie* (7), 1984, s. 1332-1352
41. De Bernardi, M., Mellerio, G., Vidari, G., Vita-Finzi, P., Fronza, G., Kocor, M., Pyrek, J. S.: Fungal metabolites. IX: Triterpenes from *Naematoloma sublateritium*. *Journal of Natural Products* 44(3), 1981, s. 351-356
42. Sakai, S., Sayo, T., Inoue, S., Kamio, M., Kawagishi, H., Hosokawa, S.: Ergosterol glycosides from *Naematoloma sublateritium*, hyaluronic acid decomposition inhibitors, pharmaceuticals and cosmetics containing them. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 1999 (Patent written in Japanese)
43. Vokurka, M., Hugo, J.: *Praktický slovník medicíny*, MAXDORF, Praha 2000

44. Yaoita, Y., Matsuki, K., Iijima, T., Nakano, S., Kakuda, R., Machida, K., Kikuchi, M: Studies on the Constituents of mushrooms. Part XII. New sterols and triterpenoids from four edible mushrooms. *Chemical&Pharmaceutical Bulletin* 49(5), 2001, s. 589-594
45. Molik-Weigiel, J.: Phytochemical studies on *Sarcodon imbricatum*. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 7(2), 1974, s. 215-22
46. Grodzinskaya, A. A., Berreck, M., Haselwandter, K., Wasser, S. P.: Radiocesium contamination of wild-growing medicinal mushrooms in Ukraine. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 5(1), 2003, s. 61-86
47. Keller, C., Maillard, M., Keller, J., Hostettmann, K.: Screening of European Fungi for Antibacterial, Antifungal, Larvicidal, Molluscicidal, Antioxidant and Free-Radical Scavenging Activities and Subsequent Isolation of Bioactive Compounds, *Pharmaceutical Biology*, Vol. 40, č. 7, 2002, s. 518-525
48. Sterner, O., Bergman, R., Kesler, E., Magnusson, G., Nilsson, L., Wickberg, B., Zimerson, E., Zetterberg, G.: Mutagens in larger fungi. I. Forty-eight species screened for mutagenic activity in the Salmonella/microsome assay. *Mutation Research* 101(4), 1982, s. 269-281
49. Takahashi, A., Endo, T., Nozoe, S.: Repandiol, a new cytotoxic diepoxide from the mushrooms *Hydnum repandum* and *H. repandum* var. *album*. *Chemical &Pharmaceutical Bulletin* 40(12), 1992, s. 3181-4
50. Filipic, M., Umek, A., Mlinaric, A.: Screening of Basidiomycete mushroom extracts for antigenotoxic and bio-antimutagenic activity. *Die Pharmazie* 57(6), 2002, s. 416-20
51. Mlinaric, A., Kac, J., Fatur, T., Filipic, M.: Anti-genotoxic activity of the mushroom *Lactarius vellereus* extract in bacteria and in mammalia cells in vitro. *Pharmazie* 59(3), 2004, s. 217-221
52. Internetové stránky; http://users.skynet.be/dr.bosko/pages_JJW/Leccinum_quercinum_2.html
53. Internetové stránky; http://www.pilzgalerie.de/Hydnum_repandum.htm
54. Internetové stránky; http://home.att.net/~mushroomhunt/Panus_conchatus.htm
55. Internetové stránky; http://www.grzby.pl/gatunki/albatrellus_ovinus.htm
56. Internetové stránky; http://users.skynet.be/yyw.myco.mons/Lactarius_blennius_3.html
57. Internetové stránky; <http://www.mycosoc.dk/FNE/Lacdeterrimus.htm>

58. Internetové stránky; http://www.grzby.pl/Gatunki/Lactarius_vellereus.htm
59. Internetové stránky; http://www.swefungi.sc/PAGES_PZ/Russula_acrifolia.html
60. Internetové stránky; http://www.bk.tudelft.nl/users/Kap/internet/nem/russula_coerulea.htm
61. Internetové stránky; http://www.funghi.garganoverde.com/russula_delica/russula_delica.htm
62. Internetové stránky; http://membres.lycos.fr/sms/champignons/russula_integra.htm
63. Internetové stránky; http://www.mycoweb.com/CAF/species/Russula_olivacea.html
64. Internetové stránky; http://digilander.libero.it/stipo/funghi/h_sublateritium.html
65. Internetové stránky; http://www.bk.tudelft.nl/users/kap/internet/nem/sarcodon_imbricatus.html
66. Štípek, S., Borovanský, J., Čejková, J., Homolka, J., Klener, P., Lukáš, M., Špičák, J., Tesař, V., Zeman, M., Zima, T., Žák, A.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci, Grada Publishing, Praha 2000, 314 s.
67. Jordán, V., Hemzalová, M.: Antioxidanty zázračné zbraně, vitamíny, aminokyseliny, stopové prvky, minerály a jejich využití pro zdravý život, Jota, Brno 2001, 160 s.
68. Paseková, H., Polášek, M., Solich, P.: Sekvenční injekční analýza, Chem. Listy 93, 354 – 359 (1999)
69. Dapkevicius, A., van Beek, T. A., Niederländer, H. A. G.: Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates, J. Chromatogr. A, 912 (1), 73-82 (2001)
70. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C.: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm.-Wiss. Technol., 28 (1), 25-30 (1995)
71. Ozcelik, B., Lee, J., Min, D. B.: The effects of chlorophyll, light and oxygen on the stability of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical in acetone and soybean oil; http://ift.confex.com/ift/2001/techprogram/paper_8201.htm
72. Opletal, L., Drašar, P.: Fytochemické metody, 1. Izolace obsahových látek (laboratorní technika), Univerzita Karlova v Praze, Praha 1994, 142 s., ISBN 80-7066-912-8

73. Stahl, E.: Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook, Springer Berlin, Berlin-Heidelberg-New York 1969, 1042 s., ISBN 3-540-04736-0
74. Šaršúnová, M., Schwarz, V. (ed.): Chromatografia na tenkých vrstvách vo farmácii a v klinickém biochémmi, 2. Vyd., Osveta, Martin 1977, 520 s.
75. York.....**doplnit!**
76. Vůjtěch, S.: Základní fytochemický výzkum některých taxonů oddělení Eumycota s ohledem na studium trombocytární agregační aktivity III. Rigorózní práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy Hradec Králové, 2004, 99 s.
77. Škorpíková, M.: Základní fytochemický výzkum některých taxonů oddělení Eumycota s ohledem na studium antioxidační aktivity IV. Rigorózní práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy Hradec Králové, 2005, 115 s.
78. Mrvíková, H.: Diplomová práce, 2005
79. Opletal, L.: Ústní sdělení